



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**

TESIS

***ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO Y MOLECULAR DEL TRATAMIENTO
SINÉRGICO DE CIRROSIS HEPÁTICA EN HÁMSTERES CON
DOXAZOSINA, CARVEDILOL Y CURCUMINA.***

PRESENTA:

IBQ. BRUNO JESÚS VÁZQUEZ LÓPEZ

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

TUTORES:

DR. JAVIER VENTURA JUÁREZ

DR. MARTÍN HUMBERTO MUÑOZ ORTEGA

ASESOR:

DR. JOSÉ ROBERTO MACÍAS PÉREZ (UASLP)

Aguascalientes, Ags. a Julio de 2018.

DATOS GENERALES DEL PROYECTO.

Título del Proyecto

*Análisis Histopatológico Y Molecular Del Tratamiento Sinérgico De Cirrosis Hepática En
Hámsteres Con Doxazosina, Carvedilol Y Curcumina.*

Datos del Alumno

IBQ Bruno Jesús Vázquez López

ID: 87942

E-mail: *bruno.vazquez.ibq@gmail.com*

Comité Tutorial:

Tutor- Dr. Martin Humberto Muñoz Ortega

- Profesor Investigador SNI I, nivel B perteneciente al departamento de Química
- Universidad Autónoma de Aguascalientes

Co-tutor- Dr. Javier Ventura Juárez

- Profesor Investigador SNI II, Nivel C perteneciente al departamento de Morfología
- Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Asesor- Dr. José Roberto Macías Pérez

- Profesor Investigador SNI, nivel V perteneciente al departamento de Química Clínica
- Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca
- Universidad Autónoma de San Luis Potosí

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
PRESENTE

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **BRUNO JESUS VÁZQUEZ LÓPEZ** con ID 87942 quien realizó la tesis titulada: **ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO Y MOLECULAR DEL TRATAMIENTO SINÉRGICO DE CIRROSIS HEPÁTICA EN HÁMSTERES CON DOXAZOSINA, CARVEDILOL Y CURCUMINA**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 17 de Agosto, 2018.

Martin Humberto Muñoz Ortega

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega
Tutor de tesis

Dr. Javier Ventura Juárez
Cotutor de tesis

Dr. José Roberto Macías Pérez
Asesor de tesis



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

BRUNO JESUS VÁZQUEZ LOPEZ
MAESTRÍA EN CIENCIAS AREA TOXICOLOGÍA
P R E S E N T E.

Estimado alumno:

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: "**ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO Y MOLECULAR DEL TRATAMIENTO SINÉRGICO DE CIRROSIS HEPÁTICA EN HÁMSTERES CON DOXAZOSINA, CARVEDILOL Y CURCUMINA**", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

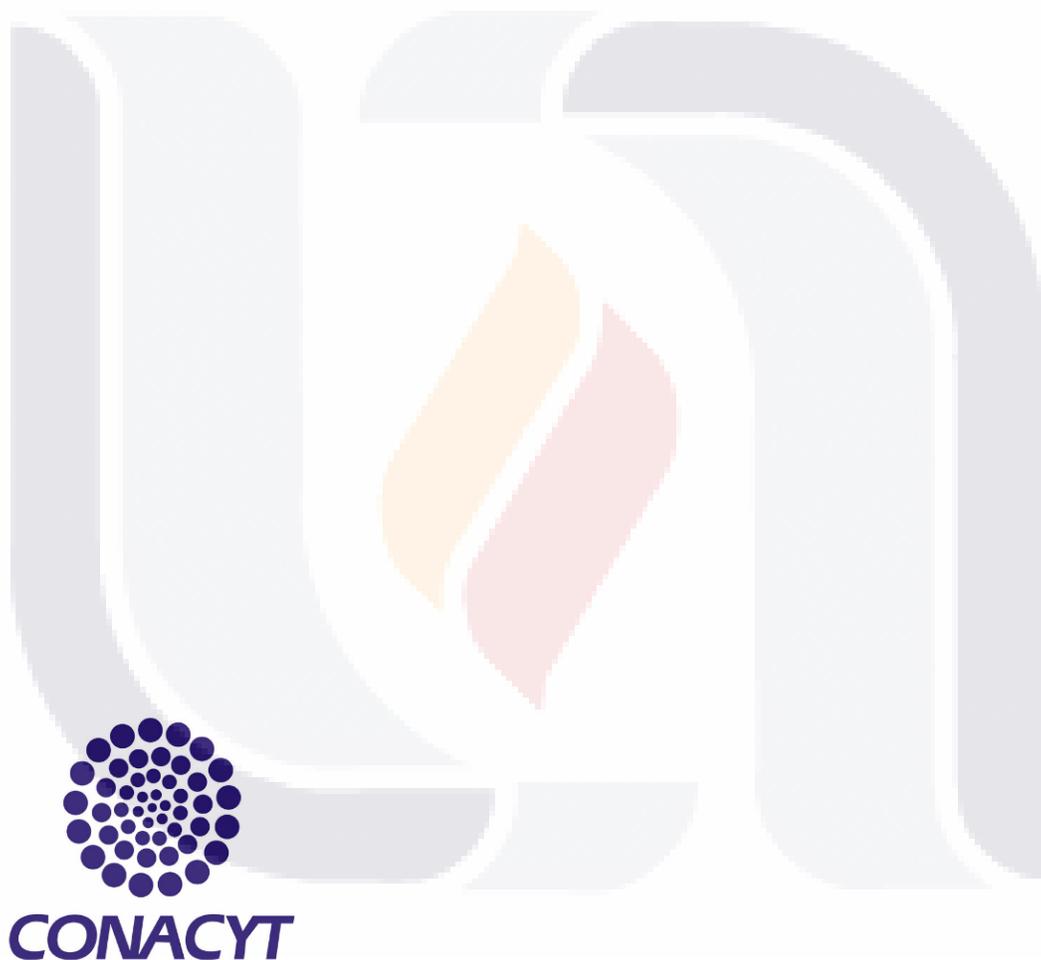
Aguascalientes, Ags., a 24 de agosto de 2018

"Se lumen proferre"

EL DECANO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'José de Jesús Ruiz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



Este trabajo fue financiado por:
CONACYT Ciencia Básica: (No. 241312)
Proyecto interno: (PIBB-15-10N)

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca financiada (767221) como parte del programa de Maestría en Ciencias en el Área de Toxicología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

AGRADECIMIENTOS

- Dr. Javier Ventura Juárez por ayudarme, apoyarme y no dudar de mí para poder lograr este proyecto.
- Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega, por enseñarme parte de todo lo que sabe y por tener la paciencia y tolerancia para lograr este proyecto.
- Dr. José Roberto Macías Pérez por todo su conocimiento brindado, apoyo y ayuda en cada una de las partes que conformaron este trabajo.
- Dra. Liseth Aldaba Muruato por su gran ayuda y enseñanza en este trabajo.
- Dra. Sandra Luz Martínez Hernández, por su ayuda, sus consejos, regaños, y pláticas que me enseñaron a esforzarme día a día por sacar un excelente trabajo.
- A mi estimado alumno, Miguel Ángel Pérez Moreno.
- Al Dr. Manuel Ávila, por sus conocimientos técnicos y ayuda.

Agradezco también a todos mis compañeros de maestría y doctorado que hicieron que estos dos años de posgrado fueran excelentes, en especial a Caty, Ale y Miguel (el chino), por ser grandes amigos y compañeros de trabajo.

A los de laboratorio, Jessy, Viry, Lupita, Diana, Angelito, Julietita, Marina, y Sandra ya que de todos y cada uno de ellos he aprendido algo a lo largo de este camino.

A mi familia, abuelitas, tios y primos Polo, Pepe, Marco, Edgar, Claudita, Rodolfo y Omarín por todos sus consejos, pláticas, ayuda y ánimos para llegar cada día más lejos.

A mis amigos, Gisela, Esther, Ezequiel, Gigio, Cachi, Puga, Alfredo, Marlene y a todos mis hermanos del “G” por todo el apoyo que me dieron.

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico con todo mi corazón y amor a:

A mis padres, Jesús Vázquez Gonzalez y Lorena López Reyes por su amor y apoyo incondicional en cada decisión y etapa de mi vida que he tomado, los amo mucho, son mis pilares y maestros más grandes en cada éxito y cada derrota.

A mis hermanos, Cristofer Jonathan Vázquez López, Lorena Estefania Vázquez López y a su esposo Alberto por estar siempre conmigo echándome porras para lograr mis objetivos.

A Alicia Chairez Olmos, por que desde antes de entrar al posgrado, me apoyaste a lograrlo, por confiar en mi, por escucharme, entenderme, motivarme y ayudarme a salir adelante cuando sentía que claudicaría. Gracias por todo el apoyo y confianza incondicional, por los regaños por desvelarme y por fumar demasiado; por soportarme ni cuando yo mismo lo hacía, de verdad gracias infinitas.

A Abel González Ledesma, Carlos Alberto Gómez Pérez y a Arturo Escobar Pérez, por cada desahogo, platicas, desveladas, cervezas, whiskys, tequilas, mezcales y cigarros que compartimos, los quiero mucho.

De todos en esta vida se aprende algo que honramos para siempre.

“Sí he visto más lejos que otros, es por que he estado sentado sobre los hombros de gigantes.”

Isaac Newton (1643-1727)

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN ----- 10

ABSTRACT ----- 11

1 Introducción----- 13

 1.1 Anatomía del Hígado ----- 13

 1.1.1 Lobulillo hepático----- 14

 1.1.2 Acino Hepático o de Rappaport----- 15

 1.1.3 Bilis y Vías Biliares Hepáticas ----- 16

 1.1.4 Estroma Hepático. ----- 17

 1.2 Morfología del Hígado.----- 17

 1.3 Funciones del Hígado----- 18

 1.4 Mecanismos Celulares de Daño Hepático ----- 19

 1.5 Mecanismos de Respuesta Inmunitaria ante el Daño Celular. ----- 20

 1.6 Fibrogénesis hepática ----- 23

 1.6.1 Fibrosis y Cirrosis----- 24

 1.6.2 Fases de la Fibrosis. ----- 26

 1.7 Biomarcadores De Daño Hepático e Inflamatorio. ----- 27

 1.7.1 Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF).----- 28

 1.7.2 Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF-β).----- 29

 1.7.3 Colágeno. ----- 30

 1.7.4 Metaloproteinasas (MMPs). ----- 31

 1.7.5 Inhibidores Tisulares de las Metaloproteinasas (TIMPs). ----- 31

 1.7.6 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α).----- 32

 1.7.7 Factor Nuclear Kappa B (NF-κB). ----- 33

 1.7.8 Factor Nuclear Derivado de Eritroide 2 (Nrf2). ----- 34

 1.8 Hepatotoxicidad por tetracloruro de carbono (CCl₄). ----- 34

 1.8.1 Mecanismo de citotoxicidad del CCl₄. ----- 35

2. Antecedentes ----- 39

 2.1 Tratamientos de Reversión de la Cirrosis Hepática.----- 39

3. Planteamiento del Problema ----- 45

 3.1 Pregunta de investigación ----- 45

4. Justificación ----- 47

5. Hipótesis----- 49

6. Metas----- 51

7. Objetivos ----- 53

 7.1 Objetivo general ----- 53

 7.2 Objetivos específicos. ----- 53

8. Metodología ----- 55

 8.1 Diseño Experimental.----- 55

 8.1.1 Inducción de Cirrosis----- 56

 8.1.1.1 Tratamientos con Doxazosina, Carvedilol y Curcumina. ----- 57

 8.1.2 Grupos SHAM ----- 58

 8.2 Obtención y Tratamiento de Muestras Biológicas. ----- 59

8.2.1 Sangre.-----	59
8.2.2 Tejidos.-----	60
8.2.3 Procesamiento de Tejidos para técnicas histológicas.-----	60
8.2.3.1 Tinción Hematoxilina-Eosina.-----	60
8.2.3.2 Tinción Rojo Sirio.-----	60
8.3 Técnicas Moleculares-----	61
8.3.1 Extracción de proteínas.-----	61
8.3.2 Cuantificación de Proteínas.-----	61
8.3.3 Identificación de proteínas por Dot-blot-----	61
8.4 Extracción de ARN-----	62
8.4.1 Retrotranscripción de ARN-----	62
8.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).-----	63
8.5 Análisis Estadístico.-----	63
9. Resultados-----	65
9.1 Eficiencia de los α/β adrenobloqueadores en conjunto con la Curcumina en el tratamiento de la cirrosis hepática.-----	65
9.1.1 Evaluación del peso de los hámsteres tratados con CCl ₄ y con Petrolato líquido.-----	65
9.1.2 Descripción macroscópica de la arquitectura hepática de hámsteres intactos y cirróticos.-----	66
9.1.3 Pruebas de Función Hepática.-----	67
9.1.3.1 Glucosa-----	67
9.1.3.2 Proteínas totales.-----	69
9.1.3.3 Albúmina.-----	71
9.1.3.4 Bilirrubina total.-----	73
9.1.3.5 Aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT).-----	75
9.1.3.6 Fosfatasa alcalina.-----	77
9.1.4 Análisis Histológico y Alteraciones Morfológicas en el Tejido Hepático de los Grupos de Estudio.-----	79
9.1.5 Evaluación De Colágeno Tipo I y III En Cirrosis Hepática En Hámsteres con Los Diferentes Tratamientos.-----	82
9.1.6 Análisis estadístico de la Concentración de Colágeno en Tejidos Cirróticos y en tejidos con los Diferentes Tratamientos.-----	83
9.1.7 Evaluación del Nivel de Expresión de los Factores de Transcripción Anti-oxidante (Nrf2) y Pro-inflamatorio (NF κ B).-----	85
9.1.7.1 NF κ B.-----	85
9.1.7.2 Nrf-2.-----	87
9.1.7.3 Cociente del nivel de expresión de Nrf2-NF κ B en el proceso inflamatorio.-----	89
9.1.8 Evaluación de la peroxidación lipídica en los diferentes tratamientos a través de la detección del 4-hydroxinonenal (4-HNE)-----	91
9.2 Hámsteres SHAM, tratados con Petrolato para evaluar la Toxicidad de los α/β Adrenobloqueadores en Conjunto con la Curcumina.-----	93
9.2.1 Descripción Macroscópica De La Arquitectura Hepática, Cambios Físicos Del Hígado Bajo Tratamientos Del Hámster.-----	93
9.2.2 Pruebas de Función Hepática.-----	94

9.2.3 Análisis Histológico Morfológico en Hámsteres Inducidos con Petrolato. ----- 97
9.2.4 Evaluación de colágeno tipo I en cirrosis hepática en hámsteres y en los
diferentes tratamientos. ----- 98
9.2.5 Evaluación Estadística de la Concentración de Colágeno en Tejidos Cirróticos en
Hámsteres y bajo Diferentes Tratamientos. ----- 99
10. Discusiones ----- 103
11. Conclusiones ----- 113
12. Bibliografía----- 115
ANEXOS ----- 138



ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Segmentación del hígado a partir de las divisiones principales de la vena porta y de la arteria hepática	13
Figura 2: Principales Vasos sanguíneos que irrigan el hígado	14
Figura 3: Estructura conformacional del hígado (A-B)	15
Figura 4: Organización del Acino de Rappaport	16
Figura 5: Esquema general de las células hepáticas	18
Figura 6: Representación esquemática de las células inmunitarias del hígado	21
Figura 7: Comunicación molecular y celular en la activación de las células estelares y generación de colágeno	24
Figura 8: Fisiología de la hipertensión portal	25
Figura 9: Interacción entre HGF y TGF- β 1	30
Figura 10: Estructura química del CCl ₄	34
Figura 11: Reacciones de bioactivación del CCl ₄	35
Figura 12: Metabolismo del CCl ₄ por CYP450 y mecanismo de daño hepático	36
Figura 13: Procesos de muerte celular inducidos por el CCl ₄	37
Figura 14: Estructura química de la Curcumina	42
Figura 15: Distribución de los hámsteres y división por grupos bajo la inducción de CCl ₄	55
Figura 16: Distribución y división de los hámsteres en el grupo de estudio SHAM	56
Figura 17: Cambios observados a raíz del daño hepático inducido con CCl ₄	66
Figura 18: Morfología de los animales tratados	67
Figura 19: Estructura histológica de hígados cirróticos tratados con α/β adrenobloqueadores y Curcumina	81
Figura 20: Estructura del colágeno tipo I y III en el estroma hepático, alrededor de vena porta y triadas portales	83
Figura 21: Identificación de 4-hidroxinonenal (4-HNE) mediante Dot-blot	92

Figura 22 A-C: Estructura morfológica macroscópica de hígado cirrótico, intacto y SHAM de hámster. **94**

Figura 23: Estructura histológica de hígados inducidos con petrolato tratados con α/β adrenobloqueadores y Curcumina. **97**

Figura 24: Estructura del colágeno tipo I y III alrededor de los tejidos hepáticos, vena porta y triadas portales **99**



ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Principales biomarcadores de fibrosis hepática	28
Tabla 2: Separación de peso de hámsteres para inducción de CCl ₄	57
Tabla 3: Distribución de los sujetos de estudio bajo los diferentes grupos de tratamiento	58
Tabla 4: Distribución de los sujetos de estudio pertenecientes al grupo SHAM	59
Tabla 5: Relación de las concentraciones de Glucosa	68
Tabla 6: Relación de las concentraciones de Proteína Total	70
Tabla 7: Relación de las concentraciones de Albúmina	72
Tabla 8: Relación de las concentraciones de Bilirrubina Total	74
Tabla 9: Relación de las concentraciones de AST y ALT	76
Tabla 10: Relación de las concentraciones de Fosfatasa Alcalina	78
Tabla 11: Relación de las áreas medidas de colágeno y porcentaje de colágeno medido	84
Tabla 12: Relación de los niveles de expresión del factor de transcripción NFκB	86
Tabla 13: Relación de los niveles de expresión de factor de transcripción Nrf2	88
Tabla 14: Relación de los cocientes entre Nrf2/ NFκB	90
Tabla 15: Relación de los cocientes entre 4-HNE/Actina	92
Tabla 16: Resultados de la estadística de las pruebas de función hepática	95
Tabla 17: Relación de las áreas medidas de colágeno y porcentaje de colágeno medido hámsteres inducidos con petrolato	100

INDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1: Promedio del peso de los hámsteres durante cada semana de inducción con CCl ₄ y petrolato. Animales tratados con CCl ₄	65
Gráfico 2: Evaluación de la concentración de Glucosa en sangre en los animales con los diferentes tratamientos	69
Gráfico 3: Evaluación de concentración de Proteína Total en suero	71
Gráfico 4: Evaluación de la concentración de albúmina en los diferentes tratamientos.	73
Gráfico 5: Evaluación de la concentración de Bilirrubina total en sangre.	75
Gráfico 6 A-B: Evaluación de la concentración de enzimas hepáticas en suero (AST y ALT).	77
Gráfico 7: Evaluación de la concentración de fosfatasa alcalina en suero.	79
Gráfico 8: Porcentaje del colágeno medido sobre área de estudio.	85
Gráfico 9: Evaluación de la expresión del factor de transcripción NFκB en tejidos hepáticos.	87
Gráfico 10: Evaluación del Factor de Transcripción Nrf-2 en muestras hepáticas.	89
Gráfico 11: Evaluación del cociente entre Nrf-2 y NFκB en muestras hepáticas.	91
Gráfico 12: Evaluación morfométrica de la presencia de 4-HNE	93
Gráfico 13: Evaluación de pruebas de funcionamiento hepático en suero, Grupo SHAM	96
Gráfico 14: Evaluación del colágeno tipo I y III en tejidos hepáticos inducidos con petrolato	101

ACRÓNIMOS

4-HNE	4-Hidroxinonenal
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ALT	Alanina aminotransferasa
ARE	Elemento de Respuesta Antioxidante
AST	Aspartato aminotransferasa
BEC	Célula Endotelial Biliar
C-IAPs	Inhibidores de Apoptosis
CAT	Catalasa
CCl ₄	Tetracloruro de Carbono
CD	Células Dendríticas
CEH	Células Estelares Hepáticas
CK	Células de Kupffer
CXC-3	Quimiocina 3
CXCL9	Quimiocina (motivo C-X-C) 9
CYP450	Citocromo P450
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FCF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
G3BP	Factor de Ensamblaje de Gránulos 3
GSH	Glutación
H	Hepatocitos
HGF	Factor de Crecimiento Hepatocitario
IgF-1	Factor de Crecimiento Insulínico-1
IL-10	Interleucina-10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
INF- α	Interferón alfa
INF- β	Interferón beta

INF- γ	Interferón gamma
LDL	Colesterol de Baja Densidad
MCP-1	Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1
MEC	Matriz Extracelular
MFAP4	Proteína Asociada a Microfibrillas 4
MMP	Metaloproteinasas
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleósido Fosfato
NF κ B	Factor Nuclear kappa de las células B activadas
NK	Células Asesinas Naturales
NKT	Células Asesinas Naturales T
Nrf2	Factor Nuclear derivado de eritroide 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PMN	Célula Polimorfonuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Revoluciones por Minuto
SD	Espacio de Disse
SOD	Superóxido Dismutasa
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante beta
TIMP	Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TRAF	Receptor Asociado al Factor TNF
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

RESUMEN

La cirrosis hepática es una enfermedad crónica que afecta a una quinta parte del mundo siendo en México la tercera causa de mortalidad. Durante varios años se han intentado desarrollar tratamientos, que puedan llegar a revertir esta enfermedad, se ha puesto atención en los estímulos responsables de la activación de las células fibrogénicas hepáticas y como atenuar esta activación para lograr la disminución del proceso de la cirrosis hepática, así mismo se ha demostrado la presencia de adrenoreceptores en las Células Estelares Hepáticas (CEH) activadas, por lo que se propone en el presente trabajo un posible tratamiento con actividad neuroinmune que disminuya la capacidad fibrogenica de las CEH.

En este estudio se desarrolló un modelo de cirrosis hepática en hámsteres utilizando tetracloruro de carbono como hepatotóxico durante 19 semanas, una vez desarrollada la enfermedad, se utilizaron Doxazosina y Carvedilol (fármacos con actividad neuroinmune) para revertir el daño generado. Varios estudios sugieren una toxicidad generada por el metabolismo de ambos fármacos por lo que a su vez fue utilizada la Curcumina como hepatoprotector para atenuar los daños generados por estos fármacos, así como ayudar a disminuir el proceso inflamatorio generado por el tetracloruro de carbono.

La eficiencia de estos medicamentos junto con el hepatoprotector fueron medidas realizando pruebas de funcionamiento hepático en suero sanguíneo, muestras histológicas para observar la recuperación del hígado y la cantidad de colágeno presente; y el análisis molecular de factores de transcripción pro y anti inflamatorios involucrados en la activación de las células estelares hepáticas y en el desarrollo de la enfermedad hepática.

Los resultados obtenidos mostraron una mejoría importante en las pruebas de funcionamiento hepático, sin afectar la morfología de los hepatocitos, disminución del proceso inflamatorio, disminución de la cantidad del colágeno presente, así como disminución NFkB y promoción de NRF-2.

Este análisis sugiere que la combinación de Doxazosina, Carvedilol y Curcumina como tratamiento, son una excelente opción para revertir la cirrosis hepática y atenuar el proceso inflamatorio derivado del aclaramiento de estos fármacos.

ABSTRACT

Liver cirrhosis is a chronic disease that affects a fifth of the world, being Mexico the third cause of mortality. For several years they have tried to develop treatments that can reverse this disease, attention has been paid to the stimuli responsible for the activation of hepatic fibrogenic cells and how to attenuate this activation to achieve a reduction in the process of liver cirrhosis, as well The presence of adrenoreceptors has been demonstrated in activated Hepatic Stem Cells (HSC), so a possible treatment with neuroimmune activity that reduces the fibrogenic capacity of HSCs is proposed in the present work.

In this study, a liver cirrhosis model was developed in hamsters using carbon tetrachloride as hepatotoxic for 19 weeks. Once the disease was developed, Doxazosin and Carvedilol (drugs with neuroimmune activity) were used to reverse the damage generated. Several studies suggest a toxicity generated by the metabolism of both drugs, which is why Curcumin was used as a hepatoprotector to attenuate the damages generated by these drugs, as well as helping to reduce the inflammatory process generated by carbon tetrachloride.

The efficiency of these drugs together with the hepatoprotector were measured by performing liver function tests in blood serum, histological samples to observe the recovery of the liver and the amount of collagen present; and the molecular analysis of pro and anti inflammatory transcription factors involved in the activation of hepatic stellar cells and in the development of liver disease. The results obtained showed an important improvement in the liver function tests, without affecting the morphology of the hepatocytes, decrease in the inflammatory process, decrease in the amount of collagen present, as well as decrease in NFkB and promotion of NRF-2.

This analysis suggests that the combination of Doxazosin, Carvedilol and Curcumin as treatment are an excellent option to reverse liver cirrhosis and attenuate the inflammatory process derived from the clearance of these drugs.



CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

1 Introducción

1.1 Anatomía del Hígado

El hígado es la glándula de mayor tamaño del cuerpo humano. En el adulto, posee un peso de 2500 g. Está situado detrás de las costillas y cartílagos costales, separado de la cavidad pleural y de los pulmones por el diafragma (Moreno-Gomes *et al.*, 2006). La proyección de esta glándula, comienza desde el hipocondrio derecho, una pequeña parte pasa por el esternón, hasta llegar al hipocondrio izquierdo (Boyer *et al.*, 2012).

Anatómicamente, el hígado se divide en lóbulos derecho e izquierdo por el ligamento falciforme, es un pliegue peritoneal que conecta al hígado con la pared abdominal anterior. El lóbulo derecho se subdivide más abajo y posteriormente en dos lóbulos más pequeños: los lóbulos caudado y cuadrado. De igual forma algunos autores han reportado otra subdivisión funcional del hígado la cual consiste en ocho segmentos con suministro vascular y biliar independiente (figura 1), la cual es una consideración importante cuando se requiere la resección hepática (Boyer *et al.*, 2012).

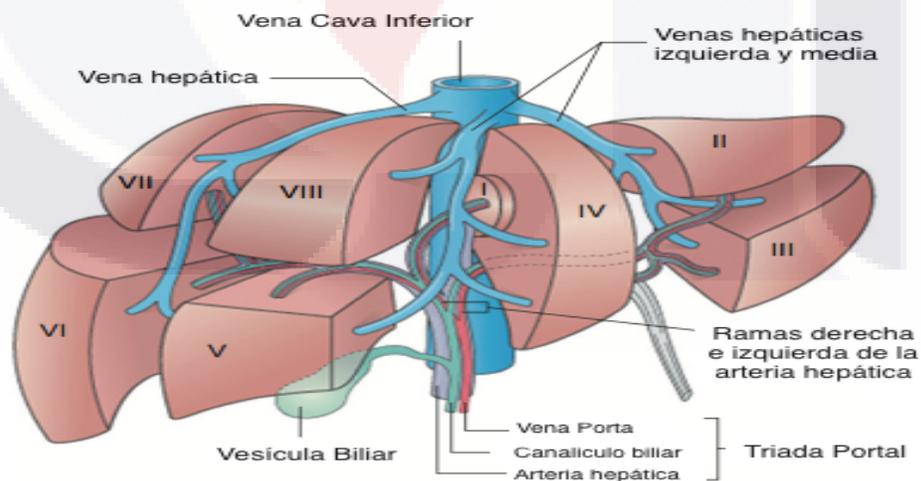


Figura 1: Segmentación del hígado a partir de las divisiones principales de la vena porta y de la arteria hepática. (Modificado de Boyer *et al.*, 2012)

El flujo sanguíneo hepático es de aproximadamente 1.5 L/minuto, que representa del 15 al 20% del gasto cardíaco (Huet *et al.*, 1986; Boyer 1986). Un tercio de este flujo lo provee la

arteria hepática y dos tercios provienen del sistema venoso portal (figura 1). En los sinusoides hepáticos el flujo sanguíneo arterial tiene una presión elevada con altas concentraciones de oxígeno y se mezcla con el flujo sanguíneo venoso portal, que tiene una presión baja y una concentración baja de oxígeno, pero rico en nutrientes (Kapoor *et al.*, 2002). La vena porta proviene del tubo digestivo y de órganos abdominales importantes como el páncreas y el bazo.

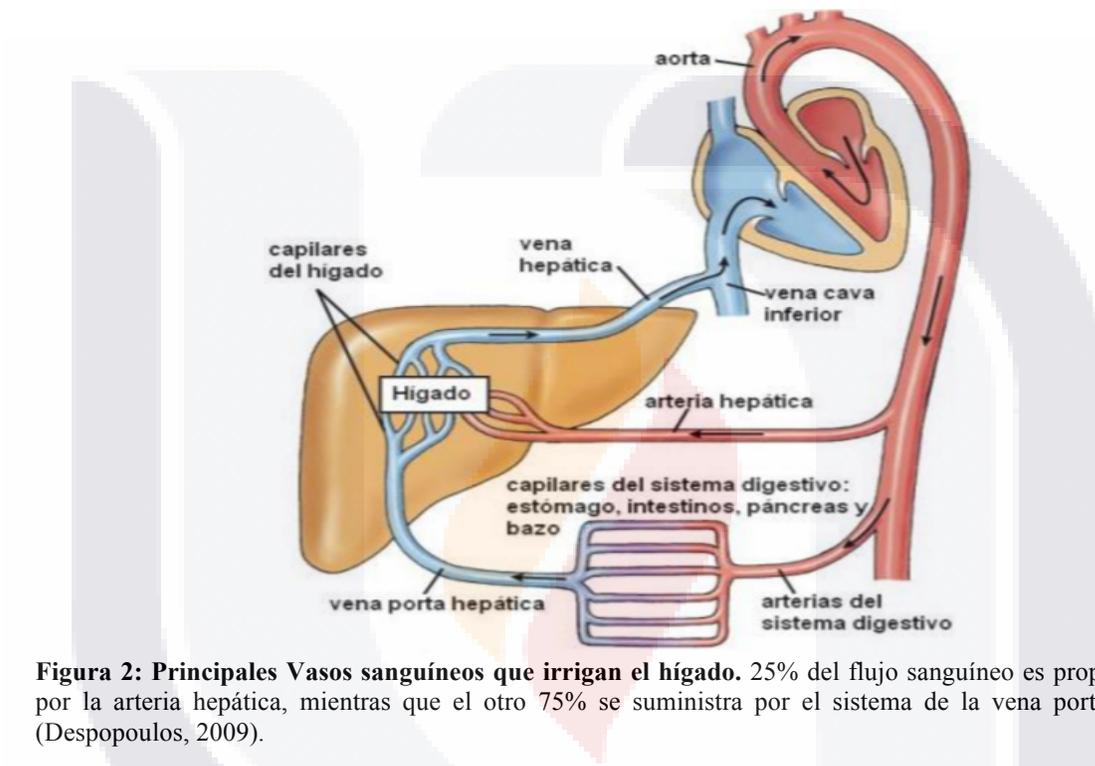


Figura 2: Principales Vasos sanguíneos que irrigan el hígado. 25% del flujo sanguíneo es proporcionado por la arteria hepática, mientras que el otro 75% se suministra por el sistema de la vena porta hepática (Despopoulos, 2009).

1.1.1 Lobulillo hepático

El lobulillo hepático es la unidad estructural y funcional del hígado. Consta de una disposición aproximadamente hexagonal y placas de 15 a 25 hepatocitos de longitud (figura 3a). La sangre fluye desde el tracto portal hasta la vena centrolobulillar (figura 3b), a través del sinusoides.

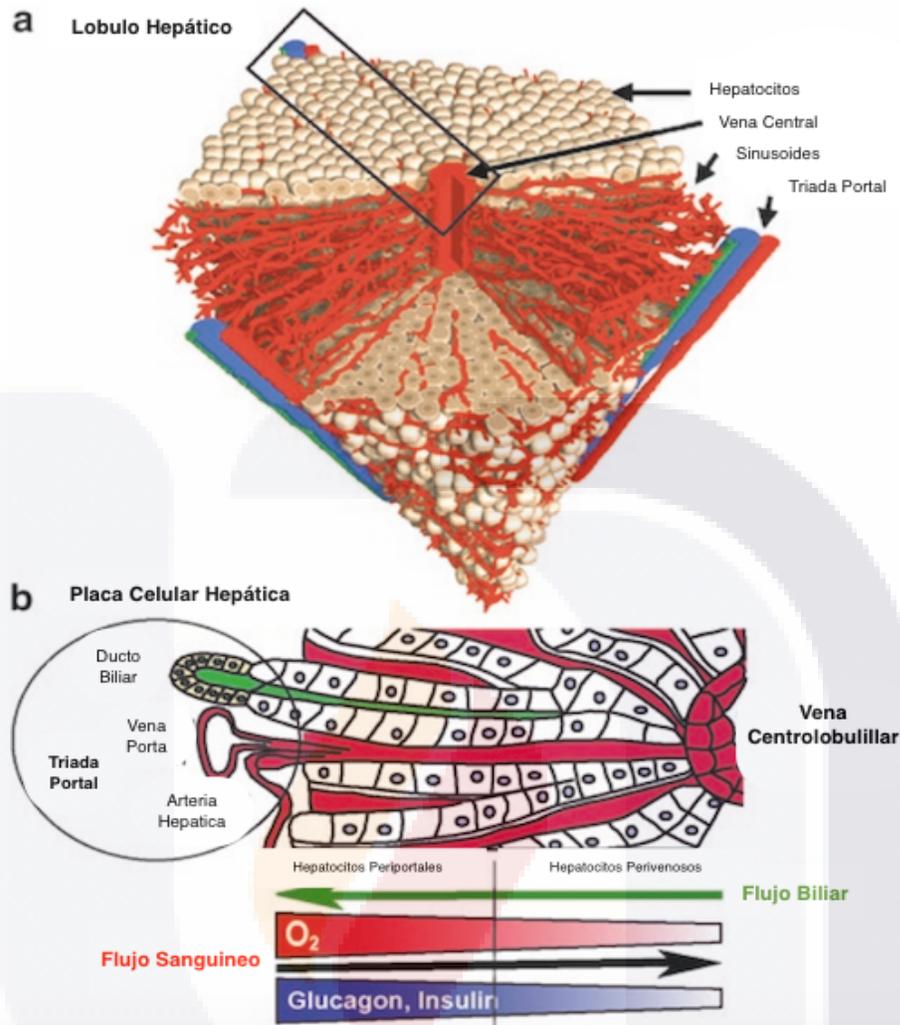


Figura 3: Estructura conformacional del hígado; A: Estructura tridimensional del lóbulillo hepático, se centra alrededor de una rama de la vena centrolobulillar, cada extremo está constituido por una rama de la vena porta, la arteria hepática y un conducto biliar también conocido como triada portal (modificado de Hoehme *et al.*, 2010). B: Placa celular hepática, el flujo sanguíneo, así como las ciertas hormonas metabólicas van desde el área periportal hasta el área perivenosa, por su parte el flujo biliar va en sentido contrario al sanguíneo (modificado de Nagy, 2011).

1.1.2 Acino Hepático o de Rappaport

El acino hepático se centra en las funciones metabólicas de los hepatocitos (derivado de la irrigación de los mismos). Posee una forma de rombo y puede ir desde dos triadas portales hasta dos venas centrolobulillares, también opuestas entre si dejando en el centro las venas y las arteriolas terminales. Conforme la sangre arterial se acerque más a las venas

centrolobulillares, la sangre disminuye su calidad nutritiva, por lo que se distinguen tres zonas en cada uno de ellos (figura 4).

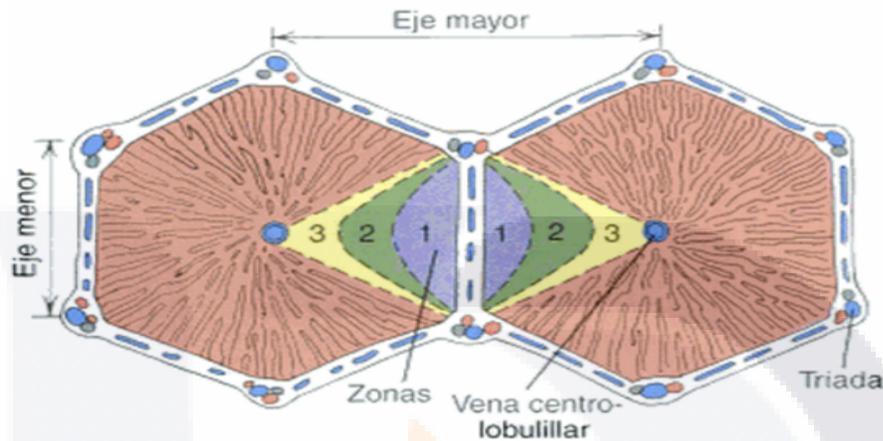


Figura 4: Organización del Acino de Rappaport. Interpretación funcional de la estructura del hígado. Está dividida en sectores contiguos separados por vasos sanguíneos de distribución. La zona 1, o zona periportal presenta una mayor irrigación por lo cual presenta una elevada concentración de oxígeno, nutrientes y xenobióticos, mientras que las demás zonas son de características contrarias (Tello., 2016).

1.1.3 Bilis y Vías Biliares Hepáticas

La bilis es una de las sustancias más importantes, ya que su formación permite, metabolizar y transformar en productos más solubles a las sustancias que se van a eliminar. Participa en la solubilidad de lípidos que ayudan con la absorción de los mismos en el intestino delgado, tanto de los que se eliminan con la bilis, como de los que se ingieren en los alimentos (Chiang, 2004).

Los hepatocitos secretan bilis dentro de diminutos canales que se distribuyen como una red minúscula de túbulos o canalículos entre las células hepáticas. Esta bilis constituye el 70% de la producción diaria en adultos y la secreción de los conductos biliares contribuye el 30% restante (Strazzabosco *et al.*, 2005).

1.1.4 Estroma Hepático.

El estroma está compuesto por una cápsula de tejido conectivo fibroso no modelado en el que podemos encontrar fibras musculares lisas y vasos arteriales, venosos y linfáticos. La principal estructura que representa al estroma es la cápsula de Glisson, la cual periféricamente esta revestida por un mesotelio y además a partir de esta sale tejido conectivo que penetra por los espacios interlobulillares sirviendo de sostén al sistema vascular hepático y a los conductos biliares. Las bandas de tejido conectivo interlobulillar son delgadas y pueden rodear las células del parénquima, mientras que en los sinusoides se presenta una fina red de fibras de reticulina (Sossai *et al.*, 1990).

1.2 Morfología del Hígado.

Las células que se encuentran formando parte de las paredes del sinusoides hepático son las células endoteliales sinusoidales, asociadas a ellas se encuentran los hepatocitos, células de Kupffer, células estelares hepáticas (CEH) y células asesinas naturales (NK) (figura 5). Los hepatocitos son las células más abundantes del hígado, representan el 80% de la población celular del parénquima hepático, realizan funciones básicas, tales como la síntesis de proteínas, metabolismo de nutrientes, entre otros (Moreno-Gomes *et al.*, 2006).

Las células de Kupffer son macrófagos móviles, pueden representar del 80 al 90% de la población de macrófagos residentes del órgano, llevan a cabo funciones inmunitarias como es la fagocitosis de agentes infecciosos, la activación de factores de transcripción y liberación de citocinas pro-inflamatorias (Blanc *et al.*, 2002).

Por su parte, las CEH estas representan el 33% de las células no parenquimatosas, existiendo una por cada 12 a 20 hepatocitos (Bonacini, 1992), se encuentran ubicadas entre las células endoteliales y los hepatocitos en una zona conocida como el espacio de Disse (Cole *et al.*, 1982). La mayor importancia de estas células deriva de su papel en la patogénesis de la cicatrización y fibrogénesis en diversas enfermedades hepáticas y su capacidad para promover y amplificar la respuesta inflamatoria (Crawford *et al.*, 1998).

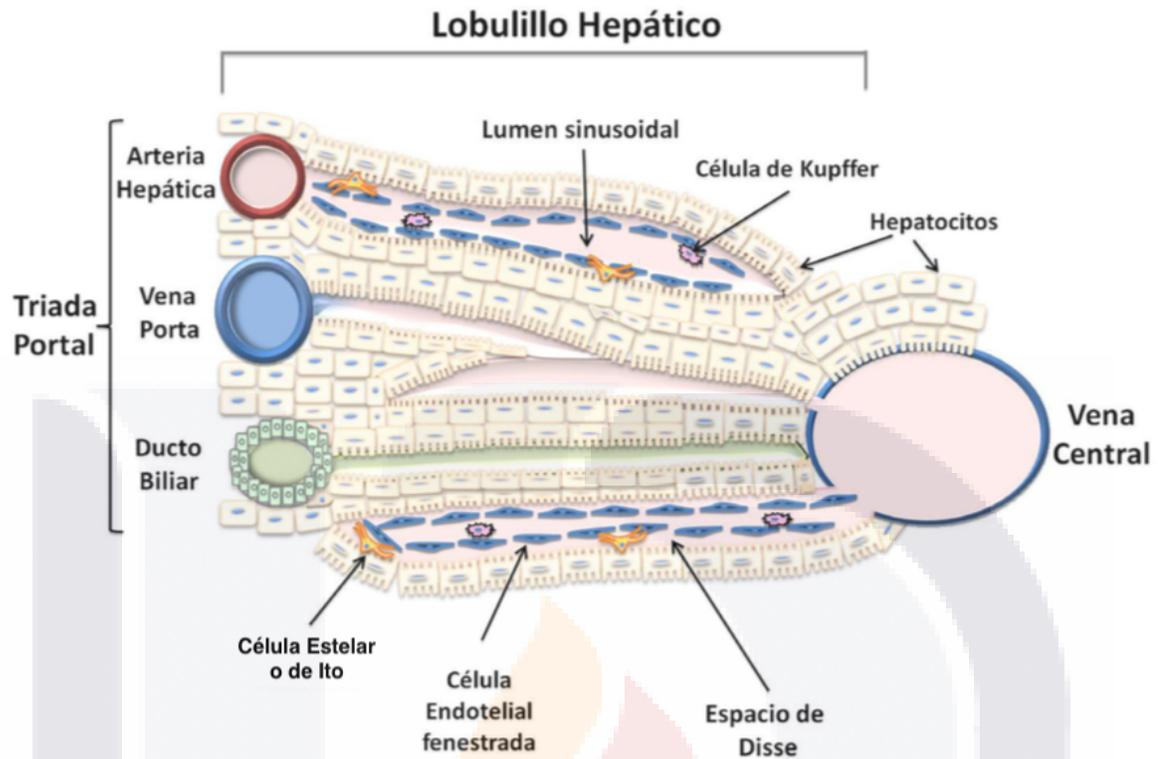


Figura 5: Esquema general de las células hepáticas. La triada portal consiste en conducto biliar, arteria hepática y vena porta. La sangre fluye hacia la vena central desde la vena porta y arteria hepática entre los hepatocitos a través de los sinusoides cubiertos por las células sinusoidales endoteliales. La bilis generada por los hepatocitos se colecta en los conductos biliares a través de los canalículos biliares. En la luz de la pared sinusoidal se encuentran las células de Kupffer (macrófagos hepáticos), mientras que las células estelares o de Ito se encuentran dentro del espacio de Disse (espacio entre los hepatocitos y el sinusoides). Las células que conforman los conductos biliares se denominan colangiocitos (modificada de: Ishibashi *et al.*, 2009)

1.3 Funciones del Hígado

El hígado posee más de 500 funciones, donde algunas de las más importantes son: la síntesis y secreción de bilis, la síntesis de proteínas específicas, la desintoxicación de sustancias en el organismo a través de enzimas como la Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y la familia del Citocromo P450 (CYP450), (Cequera *et al.*, 2014) entre otras; por otro lado también mantiene la homeostasis de la glucosa generando glucógeno o degradándolo, (Boyer *et al.*, 2012) por tanto, el hígado está interpuesto directamente en el trayecto de sustancias que se absorben a través del tubo digestivo, siendo el principal receptor de sustratos metabólicos, sustancias nutritivas y tóxicos absorbidos (Roos *et al.*, 2007).

1.4 Mecanismos Celulares de Daño Hepático

El hígado es un órgano que se afecta en numerosos procesos como infecciones virales, toxicidad por fármacos, metabopatías, procesos autoinmunes y distintos defectos genéticos, por tanto, la hepatotoxicidad se define como la lesión o daño hepático causado por la exposición a otros agentes no farmacológicos (Tejada-Cifuentes, 2010). En el proceso de regeneración a estos daños, existe también la magnificación del daño al tejido por la misma acción de las células en este proceso.

El hígado es capaz de regular su crecimiento ya sea por la proliferación o por apoptosis dependiendo de la situación en la que se encuentre. Para que se realicen estos procesos no solo están implicados los hepatocitos y las células madre, también se encuentran las células de Kupffer, las células endoteliales y las CEH, que proporcionan citocinas (Interferón alfa, (IFN- α), Interferón beta (IFN- β), Interferón gamma (IFN- γ), Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Insulínico -1 (IgF-1,)) y factores necesarios para la replicación (Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF), Factor de Crecimiento Transformante (TGF), Factor de Crecimiento Epidermico (EGF), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6)), o la muerte celular programada (Sarem *et al.*, 2006; Concepción-Osorio, *et al.* 2014).

La exposición de los hepatocitos a agentes citotóxicos hace que liberen sustancias con actividad mitogénica que puede favorecer la inducción de colágeno tipo I. Además la destrucción parcial del parénquima y la apoptosis de los hepatocitos son mecanismos que participan en la activación de células como las CEH (Concepción-Osorio, *et al.* 2014). La apoptosis y necrosis se distinguen por una serie de parámetros morfológicos y bioquímicos. En la apoptosis la célula se ve afectada sin alterar de forma relevante su metabolismo celular, con la activación secuencial de proteasas llamadas caspasas, que conllevan a la fragmentación del DNA y la alteración de la arquitectura celular, acompañada de cambios morfológicos como la condensación del DNA nuclear, disminución del volumen celular y la generación de cuerpos apoptóticos, sin liberación del contenido celular (Pérez-Carreras,

2003).

Por otra parte la necrosis, resulta de la perturbación extrema del equilibrio celular que afecta el metabolismo celular con una disminución drástica del contenido energético en forma de ATP, incremento del volumen mitocondrial y celular, con activación de proteasas intracelulares, culminando con la ruptura de la membrana celular y liberación del contenido celular que promueve una reacción inflamatoria secundaria (Kim *et al.*, 2001). En el hígado la apoptosis posee una distribución focal, mientras que la necrosis presenta una distribución zonal. Aunque existe una clara diferencia entre estos dos mecanismos en el hígado suelen coexistir ambos ya que un mismo estímulo puede inducir a cualquier daño celular, según el tipo celular afectado, el grado de exposición el estado metabólico celular y el mecanismo que participa en la muerte celular (Muntané *et al.*, 2007).

1.5 Mecanismos de Respuesta Inmunitaria ante el Daño Celular.

El hígado tiene mecanismos propios y especializados para defenderse de agentes infecciosos, toxinas y otros productos bacterianos. La complejidad del sistema inmune hepático está dada por la presencia de tipos celulares convencionales y no convencionales, y por su función en la respuesta inmune producida en el hígado (Aguilar *et al.*, 2010). El sistema inmune innato o natural es la primera línea de defensa contra diferentes factores ya sea derivado por infecciones bacterianas, lesiones físicas o químicas que alteren los tejidos. Este sistema incluye mecanismos de defensa como son los epitelios, elementos celulares (eosinófilos, basófilos, neutrófilos, y plaquetas), el sistema del complemento, citocinas (IL-6, IL-8, TNF- α) y factores específicos de crecimiento tumoral, factores de coagulación y proteínas como la fibronectina (Paniagua *et al.*, 2003). El sistema inmune innato está involucrado de mediar el proceso inicial de la inflamación, la cual en el caso del hígado los daños ocurridos por el alcohol, enfermedades virales, exceso de grasa y colestasis, promueven el proceso inflamatorio que parece ser un aspecto benéfico para la regeneración tisular del mismo. Sin embargo, cuando la inflamación es crónica propicia al desarrollo de fibrosis, cirrosis y en última instancia cáncer hepatocelular (Luedde, y Schwabe, 2011). La respuesta inmune innata consta de varios tipos de células en las cuales se encuentran los monocitos,

macrófagos, células dendríticas (CD), leucocitos polimorfonucleares (PMN), células NK y NKT, y están presentes en la detección de patógenos, receptores y antígenos que puedan afectar al hígado (figura 6) (Szabo y Dolganiuc, 2008).

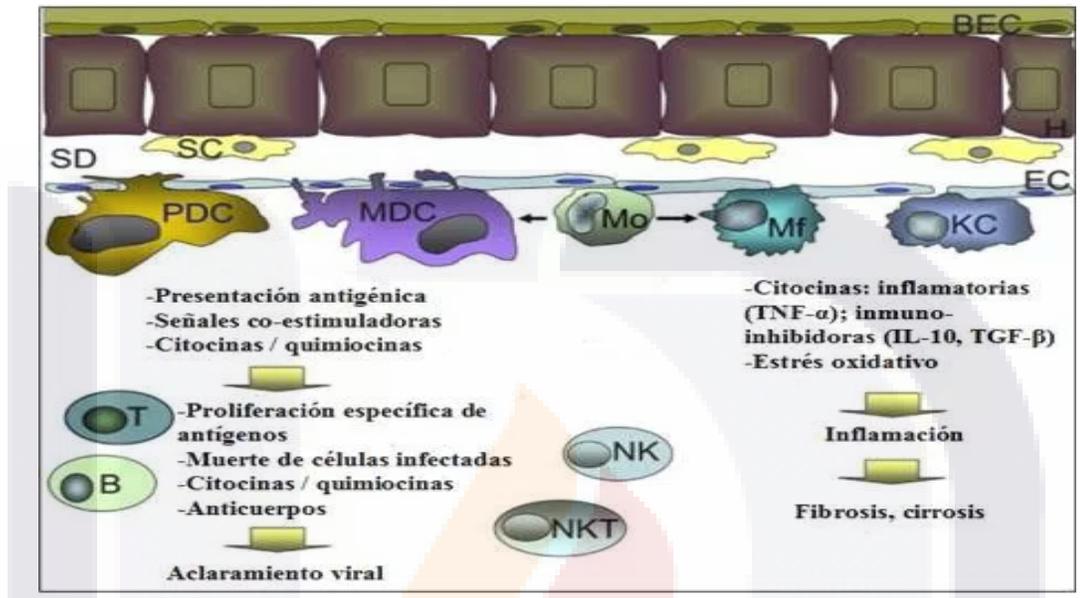


Figura 6: Representación esquemática de las células inmunitarias del hígado; H: hepatocitos; BEC: células endoteliales biliares; SC: células estelares; SD: espacio de Disse; PDC y MDC: células dendríticas de origen plasmocitoide y mieloides; Mo: monocitos; MF: macrófagos; KC: células de Kupffer; NK: células asesinas naturales (Szabo G, Dolganiuc A., 2008).

En lo que respecta a las células NK juegan un papel importante en la modulación de daño hepático, al balancear la producción local de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias una vez que son activadas (Salazar-Mather *et al.*, 1998). En modelos *in vivo* realizados en ratones han mostrado evidencia que sugiere que las células NK tienen actividades antifibróticas en parte, a través de la destrucción de las CEH activadas y produciendo interferón γ (IFN- γ) (Muhanna *et al.*, 2011). Sin embargo un estudio realizado en ratones mostró que las funciones antifibróticas de las células NK se ven suprimidas durante el estado avanzado de la fibrosis hepática (Jeong *et al.*, 2011).

El reclutamiento de neutrófilos en la respuesta inmediata/temprana a la lesión hepática esta precedido por una regulación positiva de adhesión en las CEH dentro del espacio de Disse, mientras que, en organismos en etapas de recuperación de la fibrosis hepática, la inflamación está precedida por la apoptosis de los fibroblastos hepáticos activados (Knittel *et al.*, 1999).

Las células NK suprimen la fibrosis a través de la destrucción de los miofibroblastos activados posiblemente dependiendo de los mecanismos dependientes del ligando inducido por apoptosis relacionado con TNF (TRAIL). Esto puede explicar por qué algunas de las lesiones hepáticas se pueden resolver sin cicatrización (Melhem *et al.*, 2006; Dunn *et al.*, 2007).

Por su parte, las células NKT poseen la capacidad de producir cantidades de IFN- γ e IL-4, se considera que estas células están relacionadas con la polarización de la respuesta inmune adaptativa local y sistémica tanto en el sentido pro como anti-inflamatorio (Roland *et al.*, 1993). La activación también implica la rápida producción de IFN γ , que estimula a los hepatocitos y a las CEH a secretar la quimiocina CXCL9 y a través de esta reclutar células T al hígado.

Las células de Kupffer son el mayor grupo de macrófagos residentes del hígado y se derivan de los monocitos circulantes. Están situadas en la luz sinusoidal y predominan en el espacio periportal, por lo que son las primeras células que son expuestas a sustancias absorbidas por el tracto gastrointestinal (Jeong *et al.*, 2011). Estas son capaces de liberar citocinas importantes en la modulación de la proliferación y diferenciación de otras células, además, en respuesta a concentraciones fisiológicas, estas células producen factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e Interleucina 10 (IL-10) (Racanelli *et al.*, 2006), estas citocinas toman importancia en el proceso pro-inflamatorio hepático y en la fibrogénesis activando a las células estelares hepáticas. La activación de las células de Kupffer por agentes patógenos resulta en la liberación de mediadores inflamatorios, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno (ERO), que es necesaria para el funcionamiento fisiológico normal del hígado, como la eliminación o tolerancia a patógenos, así como en la lesión hepática aguda (Ishibashi, H., *et al* 2009).

Por tanto, las células del sistema inmune innato (NK y NKT) en adición con las células dendríticas (CD) y las células de Kupffer (CK) forman un sistema que dan una respuesta inmune a los antígenos, toxinas, residuos metabólicos y células tumorales en el hígado (figura 6) (Jeong *et al.*, 2011).

1.6 Fibrogénesis hepática

La fibrogénesis hepática es una respuesta para la cicatrización, con el propósito principal de limitar el daño producido al tejido por lesiones hepáticas crónicas sea cual sea la etiología (Páramo-Hernández *et al.*, 2010).

Como ya se mencionó anteriormente, el hígado está integrado por células parenquimatosas y células no parenquimatosas, siendo las CEH parte importante en la fibrogénesis, la producción de MEC y por lo tanto en la progresión a cirrosis (Páramo-Hernández *et al.*, 2010). Cualquier estímulo agresivo que medie el proceso de activación de las CEH, las transformará en células totalmente distintas, morfológicamente parecidas a los miofibroblastos con múltiples funciones adicionales como la producción de matriz extracelular (MEC). Existen varios mecanismos de activación de las CEH tales como la activación por quimiotaxis o el modelo de cascada que producen la transformación de su estado quiescente a miofibroblastos (Leija *et al.*, 2007).

En el comienzo del proceso fibrótico, las CEH muestran actividades fibrogénicas y de contracción propiciada por la estimulación de factores como el factor de crecimiento derivado de plaquetas β (PDGF), al factor de crecimiento transformador β (TGF- β) y al factor de crecimiento epidérmico (EGF). Después, las CEH depositan proteínas de la matriz extracelular, tales como elastina, colágeno fibrilar I, II y V y colágeno no fibrilar IV y VI (Muñoz-Ortega *et al.*, 2016). Los colágenos I y III son el marco principal de la MEC, que sustituyen las estructuras similares a las membranas basales encontradas en los sinusoides y entre placas hepatocelulares. En el espacio de Disse es donde se localizan las CEH, y está constituido por una MEC de colágeno tipo IV, asociada a componentes no colagenosos, como la laminina. En estados de fibrosis avanzada, el depósito de MEC es demasiado denso como para tener similitudes a una membrana celular (figura 7) (Leija *et al.*, 2007).

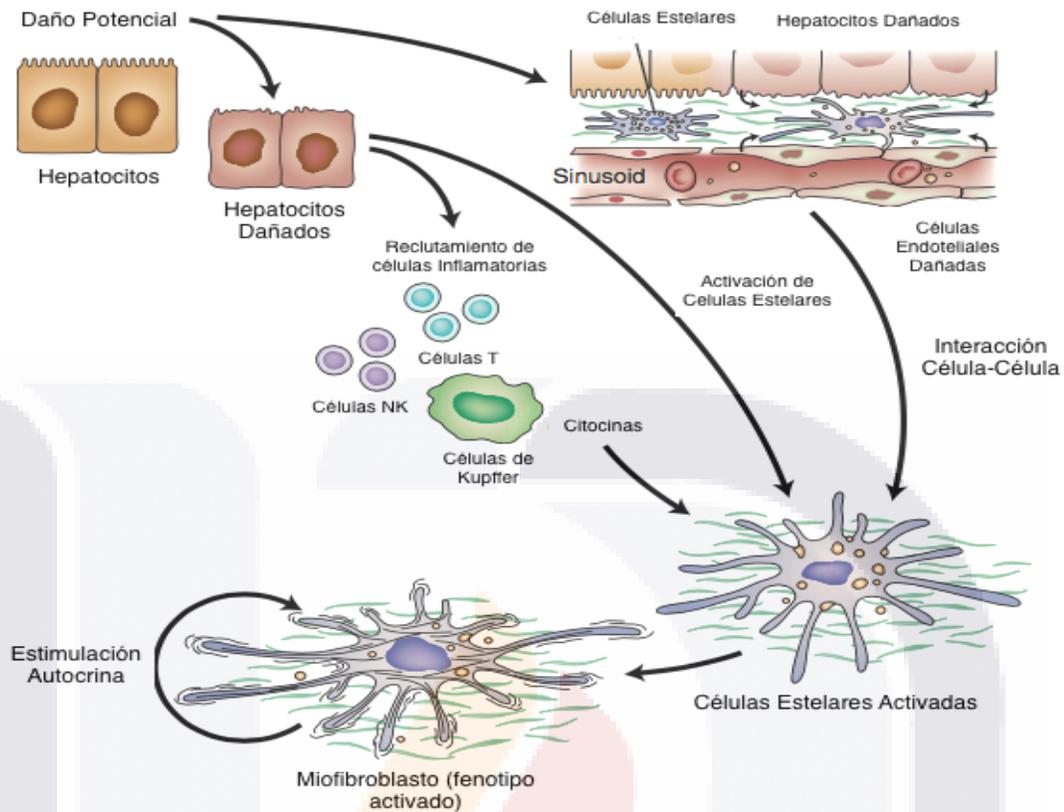


Figura 7: Comunicación molecular y celular en la activación de las células estelares y generación de colágeno. Cualquier daño que afecte a los hepatocitos, generará la activación de las células del sistema inmune las cuales liberarán citocinas que activarán a las CEH, cambiando su fenotipo a miofibroblastos que generarán colágeno (imagen modificada de Boyer *et al.*, 2002).

No está claro por completo que es lo que sucede con las CEH durante la resolución de la fibrosis. Ciertos estudios indican que estas células se programan para muerte celular (Zhou *et al.*, 2014) o que pueden volver a un estado quiescente (Leija *et al.*, 2007).

1.6.1 Fibrosis y Cirrosis

Como anteriormente se ha mencionado, la fibrogénesis hepática es una respuesta a procesos inflamatorios crónicos que llevan a la cicatrización, con el propósito principal de limitar el daño (Páramo-Hernández *et al.*, 2010). La composición de la cicatriz fibrosa hepática es similar, independientemente del origen de la causa (Dubuisson *et al.*, 2002). La pérdida de tejido hepático por lesión conlleva a la producción de fibrosis, regeneración e hiperplasia de las células hepáticas y angiogénesis (formación de vasos sanguíneos) inducida por

reguladores del crecimiento que incluyen citocinas y factores de crecimiento hepáticos. La acumulación de proteínas de la MEC distorsiona la arquitectura hepática formando una cicatriz fibrosa y el desarrollo subsiguiente de nódulos de hepatocitos regeneradores. En consecuencia, se produce disfunción hepatocelular y aumento de la resistencia intrahepática al flujo sanguíneo, lo que resulta en insuficiencia hepática e hipertensión portal, respectivamente (Schinoni *et al.*, 2006).

Por tanto, la cirrosis se puede definir como una etapa avanzada de la fibrosis. La cirrosis es una consecuencia de la enfermedad hepática crónica que se caracteriza por el reemplazo del tejido hepático por tejido fibroso denso modificando la arquitectura del parénquima hepático (Páramo-Hernández *et al.*, 2010). Además, durante este proceso, la hipertensión portal es la complicación más común de la cirrosis hepática y se desarrolla en la gran mayoría de los pacientes con afecciones hepáticas crónicas. Se caracteriza por un aumento en la presión de la vena porta, y conduce al desarrollo de várices gastroesofágicas, ascitis, disfunción renal, así como encefalopatía hepática (Figura 8) (Yang *et al.*, 2003).

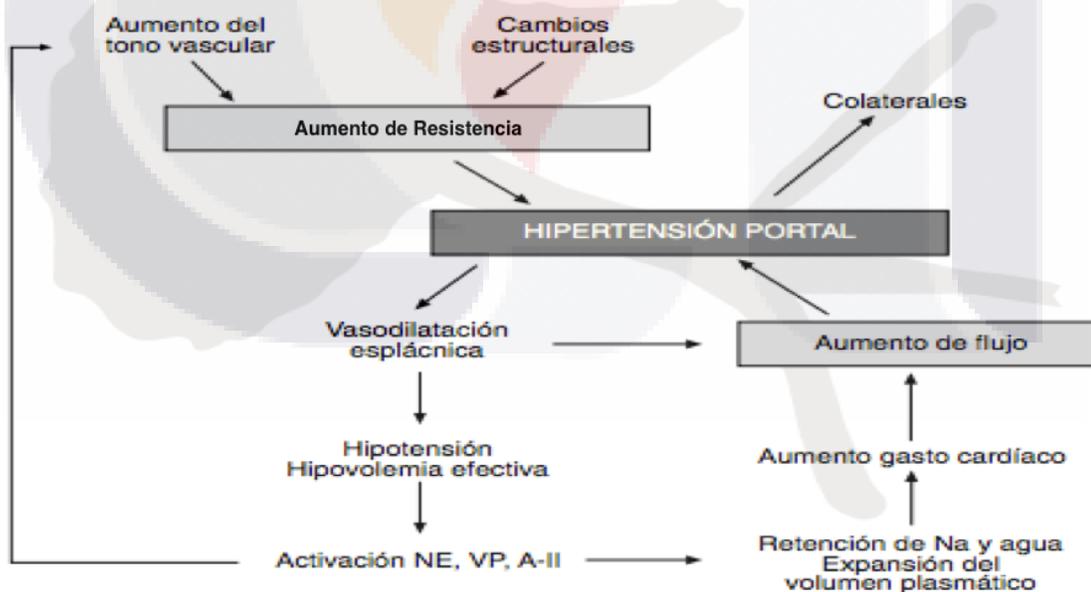


Figura 8: Fisiología de la hipertensión portal (Abralde, J. G., *et al.* 2006).

1.6.2 Fases de la Fibrosis.

La fibrosis hepática es el resultado de un proceso crónico de inflamación y reparación tisular, con acumulación de tejido conectivo (Muñoz-Ortega, *et al.* 2016). Cualquier perturbación crónica de la homeostasis hepática, puede provocar las señales necesarias para estimular la fibrogénesis. La fase inflamatoria está formada de factores como la endotelina y óxido nítrico, que regulan la contractilidad de las CEH y los productos de peroxidación lipídica y las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que tienen efectos directos e indirectos sobre las células de Kupffer y CEH, además también de regular la producción de otros mediadores importantes, incluyendo TGF- β y PDGF. Las células de Kupffer y la captación hepática de células apoptóticas promueven la fibrogénesis, a través de la producción de ERO (Friedman, 2008; Cagle, 2010).

La fibrogénesis hepática, consta de varias etapas en donde intervienen una serie de diversos factores desde la cadena de señalización que conduce a la activación de las CEH, hasta su resolución y muerte de las mismas.

La primera etapa, está referida a los cambios fenotípicos de las células estelares las cuales brindan una mayor respuesta a los factores de crecimiento y a un incremento en la síntesis de moléculas involucradas en la matriz extracelular. En la segunda etapa o perpetuación, intervienen cambios como la proliferación que es resultado del incremento de la secreción de factores de crecimiento y citocinas con poder mitogénico. El PDGF es uno de los más potentes factores mitogénicos para las células estelares. La tercera etapa, conocida como quimiotaxis, se refiere a la migración de las células estelares a los sitios de lesión hepatocelular, por la acción de PDGF y otras sustancias atrayentes como la Proteína Quimioatrayente de Monocitos (MCP-1) y la familia quimiocinas CXC3. La siguiente fase corresponde a la activación de las células estelares, que se acompaña de la pérdida de los retinoides. Anteriormente se mencionó que las CEH son el depósito del 80% de la vitamina A en forma de retinol y sus esteroides. El cambio morfológico de la pérdida de los retinoides es una condición necesaria para la modificación del citoesqueleto de las CEH activadas, continuando con la fibrogénesis, etapa que se caracteriza por una serie de pasos que conducen

al incremento de la matriz extracelular la cual incluye diferentes proteínas como la elastina, y colágenos de tipo fibrilar y no fibrilar conjugados en forma de proteoglicanos y glicoproteínas estructurales y glicosaminoglicanos. El proceso de cambios estructurales de la matriz, su depósito y la formación final de septos fibrosos, es un proceso activo influenciado por la actividad de las CEH, fibroblastos, factores de crecimiento y angiogénicos (generadores de vasos sanguíneos), así como el tipo de daño y la persistencia del mismo. La contractibilidad es una característica de las CEH en los aumentos de resistencia portal, tanto en las etapas tempranas como tardías de la fibrosis. En estadios tempranos muestran fenotipo parecido al de células musculares, este fenotipo contráctil es mediado por receptores que interactúan con la matriz extracelular, la endotelina y el óxido nítrico son los principales agonistas que controla la contractibilidad de las células estelares junto con la angiotensina II, trombina, agonistas alfa y beta adrenérgicos. Como última etapa, después del daño y generación de MEC, intervienen los elementos principales de la remodelación de la matriz extracelular y modulación de la cantidad del colágeno hepático; estas son una familia de enzimas conocidas como metaloproteinasas, las cuales son dependientes de calcio y son capaces de degradar colágenos y substratos no colágenos. Después de la activación y generación de colágeno de las CEH, así como su degradación por las metaloproteinasas (MMP), la apoptosis de las CEH está mediada por factores como el CD95, el ligando inducido por apoptosis relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y por las células NK (Páramo-Hernández *et al.*, 2010).

1.7 Biomarcadores De Daño Hepático e Inflamatorio.

Las lesiones hepáticas necesitan ser reparadas rápida y eficientemente. La activación, proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de las células en el hígado son controladas por un gran número de factores de crecimiento y citocinas que se expresan en el sitio de la lesión o llegan al hígado a través del sistema circulatorio (Böhm *et al.*, 2010). En los últimos años el interés por identificar y describir la fibrosis hepática mediante el uso de marcadores no invasivos ha ido en aumento constante. La fibrosis puede ser determinada en dos formas, una mediante marcadores en suero y la segunda a través de medios físicos como la medición de la rigidez del hígado por ultrasonido, sin embargo, los biomarcadores en suero

han sido los de mayor importancia para determinar el inicio y desarrollo de la fibrosis en el hígado (tabla 1). Durante este proceso se han logrado identificar biomarcadores: a) directos, que reflejan el depósito o eliminación de la matriz extracelular hepática, e b) indirectos, que incluyen moléculas liberadas a la sangre inducidas por la inflamación, como consecuencia de la alteración de la función hepática (Cequera *et al.*, 2014).

Tabla 1: Principales biomarcadores de fibrosis hepática (Cequera *et al.*, 2014).

Marcadores	
Pruebas de Función Hepática	Aminotransaminasas (AST, ALT, γ -glutamiltanspeptidasa, bilirrubina, albúmina.
Variables Hematológicas	Recuento de plaquetas, y tiempos de protrombina
Otras	Glucosa, insulina, apolipoproteína, colesterol, angiotensina-II, ALT, AST entre otras.
Colágeno, moléculas y enzimas de la MEC.	ácido hialurónico, colágeno tipo IV, laminina, fibronectina, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2, MMP-9
Citocinas	HGF, TGF- β , TNF- α .
Marcadores de Proteómica	Proteína de unión a galectina-3 (G3BP), proteína 4 asociada a microfibrillas (MFAP4), tropomiosina
Genéticos	SNP de AZIN1, TRPM5, AQP2, STXBP5L
Factores de Transcripción	NF- κ B, Nrf2

1.7.1 Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF).

Anteriormente se había mencionado que las células estelares, están localizadas debajo de las células sinusoidales y que producen matriz extracelular y varias citocinas incluyendo el HGF, el cual se produce en forma inactiva (pro-HGF) por fibroblastos, células del mesénquima, células endoteliales y células del hígado (excepto parénquima) (Michalopoulos, 2007).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

HGF tiene una participación crítica en el desarrollo de células hepáticas, regeneración de órganos y diferenciación de células madres hacia hepatocitos (Shams *et al.*, 2015). Es un inductor de la regeneración hepática por estimular la síntesis de ADN en hepatocitos. Algunos estudios muestran que su elevación sérica corresponde a que es un marcador de severidad en la cirrosis, en la insuficiencia hepática aguda y en la hepatitis crónica (Barreto *et al.*, 2017).

1.7.2 Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β).

Es una de las moléculas más ampliamente estudiadas como agente fibrogénico por su efecto estimulante en la síntesis de la matriz extracelular, incluyendo los colágenos tipo I y III en las células estelares activadas (Davis, 2005). La expresión de TGF- β se incrementa marcadamente en los modelos experimentales de fibrosis hepática (Friedman, 2007), así como en la cirrosis humana (Karin *et al.*, 2002). Este se sintetiza tanto por las células de Kupffer como por las CEH activadas (figura 9). Algunos autores mencionan que los hepatocitos que se encuentran apoptóticos inducen la síntesis de TGF- β (de Bleser *et al.*, 2008). Otro mecanismo por el cual TGF- β promueve la fibrosis es por la influencia en las expresiones de metaloproteínasas (MMPs) de matriz extracelular y por los inhibidores de metaloproteínasas (TIMPs). Por un lado el TGF- β 1 inhibe la producción de MMP tales como la colagenasa y estromelisina y por el otro lado, estimulando la síntesis del inhibidor del activador del plasminógeno y TIMPs (Galle *et al.*, 2014).

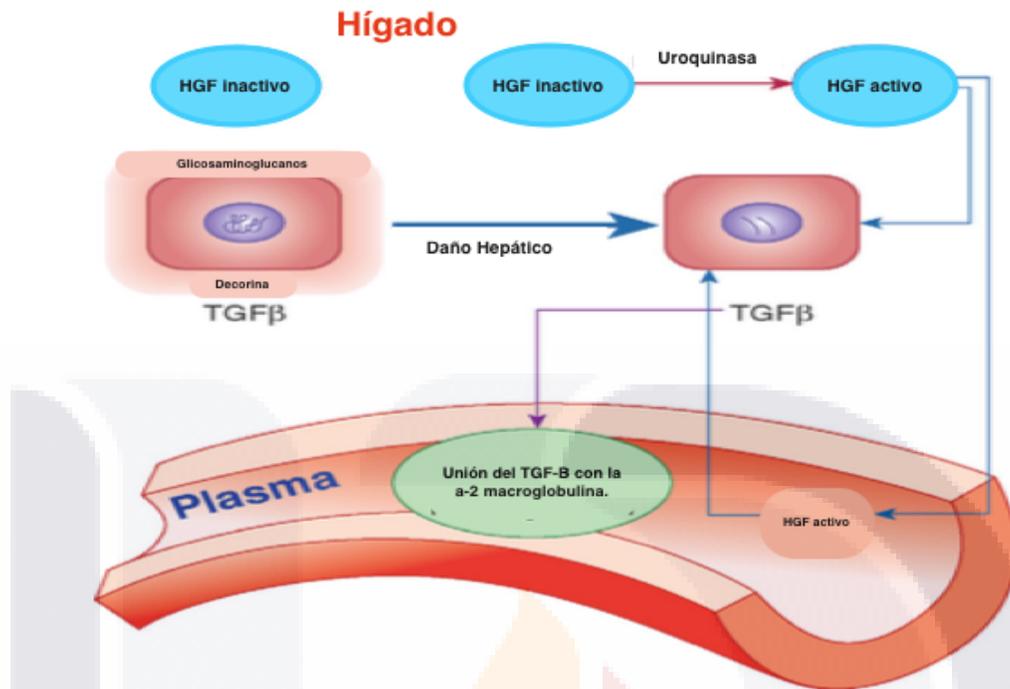


Figura 9: interacción entre HGF y TGF-β1. El HGF es un mitógeno para los hepatocitos, mientras que TGF-β1 se conoce como un inhibidor mitogénico. El HGF se une a glucosaminas y el TGF-β1 a la decorina, ambos presentes en la matriz pericelular que rodea a los hepatocitos. El HGF es liberado y activado por la uroquinasa, donde puede tener un efecto mitogénico sobre los hepatocitos. Las concentraciones de HGF y TGF-β1 aumentan rápidamente en el plasma después de un daño al hígado. El TGF-β1 se neutraliza por su unión a α-2 macro globulina. El equilibrio entre HGF y TGF-β1 en las etapas tempranas de regeneración hepática es clave de los estímulos que conducen a la proliferación de los hepatocitos, el efecto anti-apoptótico y la degradación de la matriz extracelular en la etapa compensatoria, o a los efectos inversos en la etapa descompensatoria (adaptación de Michalopoulos, 2010; Schuppan y Pinzani, 2012).

1.7.3 Colágeno.

El colágeno es una de las principales proteínas presentes del tejido conjuntivo y es la de mayor presencia en los organismos, estas fibras son parte importante del desarrollo fibrogénico, y los tipos de colágeno I y III son el marco principal de la denominada matriz extracelular, que sustituye gradualmente las estructuras similares a las membranas en los sinusoides y placas hepatocelulares. El espacio de Disse, está constituido por colágeno tipo IV asociado con compuestos no colagenosos como la laminina (Giannelli *et al.*, 2003). La mayoría de los tipos de colágeno tipo III y IV son sintetizados por las células estelares hepáticas y células endoteliales sinusoidales, mientras que los demás tipos de células sintetizan pequeñas cantidades de colágeno tipo I (Leija *et al.*, 2007). Los colágenos tipo I y

III son degradados por proteólisis, el colágeno tipo IV se deposita en la matriz extracelular y su presencia en suero refleja si existe degradación. Esta presencia tiene una relación con el grado de fibrosis hepática en pacientes con hepatitis viral crónica y enfermedad hepática alcohólica, ya que es un indicador sensible a la presencia de cirrosis (Cequera *et al.*, 2014). El equilibrio entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular dependen en gran medida, de proteínas encargadas de la degradación de la misma (MMPs) y de sus inhibidores presentes (TIMPs).

1.7.4 Metaloproteinasas (MMPs).

Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc (de ahí el prefijo metalo), que desempeñan una gran variedad de procesos biológicos (Ozyigit *et al.*, 2005), desde receptores de la superficie celular y moléculas de adhesión, hasta factores de crecimiento y citocinas pro-inflamatorias (G *et al.*, 2016). Estas se clasifican respecto a su estructura y especificidad del sustrato en la matriz extracelular. Las MMP-1, MMP-8, MMP-13, son de características antifibróticas debido a su capacidad para degradar el colágeno, mientras que las MMP-3, MMP-10 y MMP-11 poseen similitud con las colagenasas, sin embargo, son incapaces de llevar a cabo la degradación del colágeno. Las MMP-2 y MMP-9, degradan el colágeno desnaturalizado, así como el colágeno tipo IV y las MMP-7 y MMP-25 degradan componentes como la laminina y la entactina (Guzmán-Hernández *et al.*, 2015).

La regulación de la actividad de las MMPs se debe a la presencia de varios procesos pero principalmente por los inhibidores como los TIMPs. Las células estelares producen TIMPs-1 y -2 y su producción puede ser constante en estadios de daño, provocando la acumulación de la matriz extracelular (Páramo-Hernández *et al.*, 2010).

1.7.5 Inhibidores Tisulares de las Metaloproteinasas (TIMPs).

Los inhibidores específicos de MMPs son los TIMPs, enzimas que modulan la degradación de la MEC por la acción de las MMPs (Bohórquez-Sierra, 2006). Se han identificado cuatro TIMPs en humanos los cuales están anclados en la matriz extracelular o pueden ser secretados en el espacio extracelular. Entre las cuatro, inhiben todas las MMPs conocidas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hasta el momento, difiriendo entre ellas en cuanto a su solubilidad, regulación y en su interacción específica (Angosto *et al.*, 2010). Se unen de forma reversible a los sitios activos de las MMP y el grado neto de degradación de la matriz es una función de los niveles de TIMP y las MMP activadas (Cagle, 2010).

Los TIMP-1 y -2 son de importancia general ya que son producidos por las CEH y son altamente reguladas en estados de fibrosis. En particular se ha observado que los ratones que han sido expuestos a tóxicos como el CCl₄ aumentan la expresión de TIMP 1 lo que conlleva a un aumento de los niveles de fibrosis (Cagle, 2010).

1.7.6 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α).

El TNF- α es una potente citocina pleiotrópica con múltiples funciones celulares, se ha relacionado de manera crítica con la patogénesis de diversas enfermedades crónicas inflamatorias, esta citocina es secretada por los macrófagos en respuesta a la inflamación, infecciones y cáncer. El TNF- α desempeña un papel importante en la inflamación de los tejidos y su remodelación mediante la estimulación de la producción de colagenasa, las respuestas celulares al TNF- α se inician por unión a receptores de superficie celular de alta afinidad. Por tanto, afecta entonces la regulación de genes que estimulan a varias interleucinas (IL) como la 6 y 1, e inhibe el gen de colágeno tipo I (Brenner *et al.*, 1989). En el caso de la hepatitis alcohólica aguda, así como la afecciones hepáticas crónicas, tienen aumento de los niveles séricos de interleucina-1 (IL-1), TNF- α e IL-6 (Wilmer *et al.*, 1992). Los niveles de TNF- α se relacionan con una mayor disfunción y estrés oxidativo mitocondrial en hepatocitos, donde el estrés oxidativo es un factor determinante en la progresión de la fibrogénesis hepática en daños crónicos, sin embargo, se ha observado que daños en los que la Glutación (GSH) se ve reducida en los hepatocitos, lo que conduce a una muerte celular por TNF- α (Bulló-Bonet *et al.*, 2000; Pérez-Carreras, 2003).

1.7.7 Factor Nuclear Kappa B (NF- κ B).

El NF- κ B es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN. El NF- κ B se encuentra en la mayoría de tipos de células animales y está implicado en la respuesta celular frente a estímulos como el estrés, las citocinas, radiación ultravioleta, LDL oxidadas y antígenos bacterianos o virales (Gilmore, 2006). Es un regulador transcripcional clave de la respuesta inflamatoria y juega un papel importante en la regulación de la misma. Se encuentra presente en todas las afecciones hepáticas y regula múltiples funciones esenciales de los hepatocitos, células de Kupffer y células estelares hepáticas. El NF- κ B realiza una contribución esencial en la homeostasis del hígado y la reparación del daño tisular (Luedde y Schwabe, 2011). Su activación en células no parenquimatosas promueve la inflamación, fibrosis y hepatocarcinogénesis, además tiene una gran importancia en varias enfermedades hepáticas, incluyendo hepatitis, fibrosis hepática, cirrosis y carcinoma hepatocelular (Aldaba *et al.*, 2012).

NF- κ B tiene una amplia gama de funciones que influyen en la supervivencia del hepatocito, procesos inflamatorios en células de Kupffer y la activación e inflamación de las CEH. NF- κ B media por medio de diversas subfamilias tanto pro-inflamatoria (RelA, c-Rel, RelB) como antiapoptóticamente (c-IAPs, TRAF1, TRAF2 y XIAP) a los mediadores tales como el TNF- α que son tóxicos para el hepatocito (Karin *et al.*, 2002).

NF- κ B modula la fibrogénesis hepática mediante diferentes mecanismos: a) la regulación de la lesión hepatocitaria, b) la regulación de las señales inflamatorias en macrófagos, c) otras células inflamatorias del hígado y, d) por la regulación de respuestas fibrogénicas de las CEH. Una actividad de NF- κ B disminuida o ausente en hepatocitos puede conducir a un aumento en la lesión hepatocelular y fibrosis posterior. El incremento de NF- κ B puede significar efectos protectores en el hígado mediante la prevención de la muerte de los hepatocitos (Luedde y Schwabe, 2011).

1.7.8 Factor Nuclear Derivado de Eritroide 2 (Nrf2).

El Nrf2 es un factor de transcripción clave que controla muchos aspectos de la homeostasis celular en respuesta al daño oxidativo y tóxico. En particular, Nrf2 media la transcripción basal e inducida de proteínas antioxidantes, responsables del aclaramiento de las especies de ERO, proporcionando protección contra la acumulación de metabolitos tóxicos. La vía de señalización mediada por el Nrf2-ARE desempeña un papel importante en la protección contra la toxicidad crónica por Xenobióticos (García-Ruiz, 1997). La inducción de enzimas citoprotectoras en respuesta al estrés químico es regulada primariamente por esta vía. Existen evidencias que muestran que los niveles de proteínas, así como del ARNm de Nrf2, se encuentran elevados en tejido hepático y en los hepatocitos de animales tratados de manera crónica con CCl_4 , también existen reportes que adjudican un papel importante de Nrf2 en la protección contra el daño hepático inducido por CCl_4 (Ronis *et al.*, 2005).

1.8 Hepatotoxicidad por tetracloruro de carbono (CCl_4).

El CCl_4 (figura 10) es una de las sustancias químicas sintéticas que no se presenta de forma natural en el ambiente. Es un líquido de olor dulce que puede ser detectado a bajos niveles, se encuentra frecuentemente en el aire en forma de gas incoloro y es parte importante de algunos plaguicidas y fungicidas, así como un potente desengrasante, ya que elimina grasas y aceites con facilidad (Faroon *et al.*, 1994). Cuando esta sustancia es ingerida o inhalada, los órganos más afectados por su toxicidad son el hígado y los riñones (IPCS, 1999), de los cuales el hígado es el que se ve más severamente afectado.

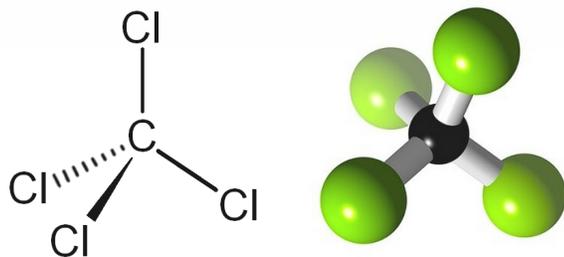


Figura 10: Estructura química del CCl_4 . (imágenes modificadas de www.lookfordiagnosis.com, 2017, www.Quimica.seed.pr.gov.br, 2017).

Cuando un xenobiótico entra en el organismo ocurre el proceso de biotransformación, la cual es principalmente llevada a cabo por el hígado a partir del sistema de monoxigenasas dependiente del CYP450. El CCl_4 se une con el CYP450 subfamilia 2E1, formándose el complejo enzima-sustrato, haciendo que el CCl_4 sea deshalogenado y reducido por la CYP450 reductasa y NADPH (Repetto *et al.*, 2010). En específico, la reacción de deshalogenación es realizada por la isoforma CYP2E1 al radical triclorometilo (CCl_3), este compuesto posee un potencial tóxico más elevado que el CCl_4 , el cual comienza una cascada de lipoperoxidación caracterizada por la sustracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso de la membrana celular, proceso conocido como peroxidación lipídica (de Minicis *et al.*, 2006).

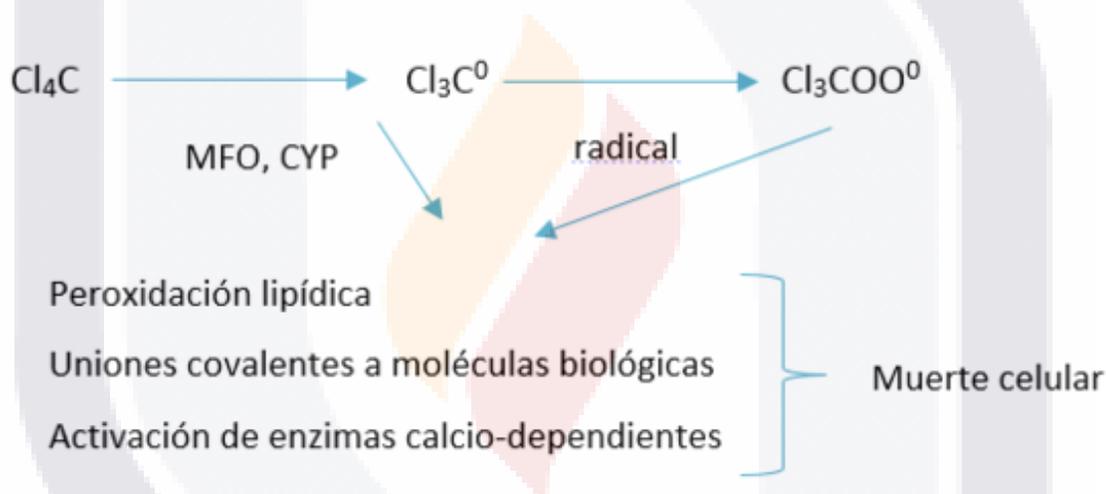


Figura 11: Reacciones de bioactivación del CCl_4 (imagen modificada de Repetto *et al.*, 2010).

1.8.1 Mecanismo de citotoxicidad del CCl_4 .

En el hígado, diversos tipos celulares generan ERO a través de diferentes mecanismos después de la exposición al CCl_4 . Los hepatocitos usan mecanismos para producir ERO como el CYP2E1, alteraciones en la cadena mitocondrial entre otros. En el citosol el metabolismo del CCl_4 es realizado por CYP2E1 generando ERO (figura 12). Además, la formación de estos compuestos incrementa el daño mitocondrial (Cunningham *et al.*, 1999).

La isoforma de la familia del CYP450, el CYP2E1, tiene una elevada actividad de la NADPH oxidasa, esto permite una producción de cantidades elevadas del radical superóxido y del peróxido de hidrógeno. También CYP2E1 esta correlacionado con la peroxidación lipídica. Por tanto la capacidad de esta isoforma para reducir O_2 en radical superóxido y peróxido de hidrógeno puede considerarse como un factor clave que contribuye al estrés oxidativo durante la exposición crónica al CCl_4 (Boveris *et al.*, 1983).

Por otra parte, también estos radicales participan en el proceso de lipoperoxidación de la membrana celular y mitocondrial lo que resulta en la pérdida de los cofactores de la cadena de transporte de electrones, como el citocromo C, el déficit de ATP, la generación de ácido láctico (Repetto *et al.*, 2010), apoptosis y la pérdida de la homeostasis del calcio, esto conlleva a la muerte celular por necrosis (Gravela *et al.*, 1979).

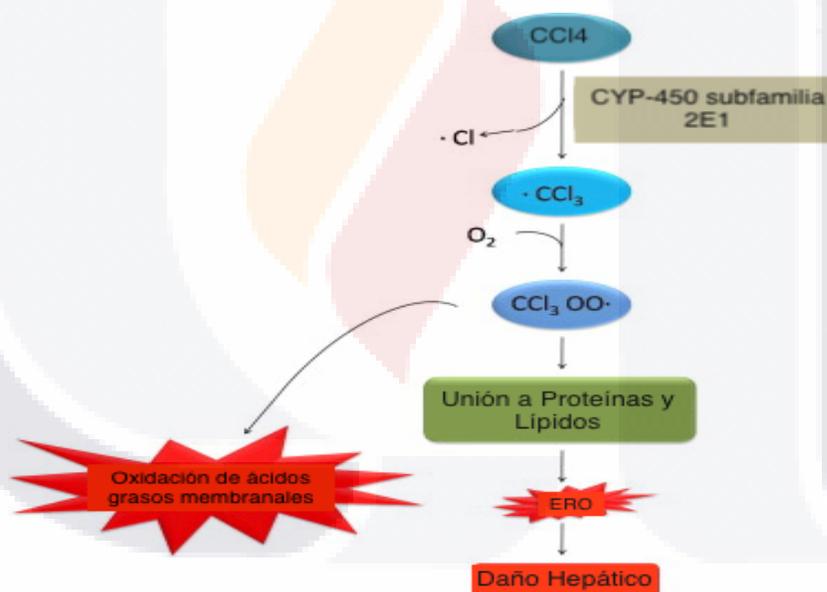


Figura 12: Metabolismo del CCl_4 por CYP450 y mecanismo de daño hepático. El CCl_4 es metabolizado por hepatocitos perisinusoidales y pierde un átomo de cloro generando el radical triclorometil (CCl_3) parte del cual es convertido en el radical peroxi triclorometil ($OOCl_3$) en las regiones centrolobulillares. Este radical se une a lípidos y proteínas de distintos organelos celulares principalmente del retículo endoplásmico y de mitocondrias lo que conlleva a la inhibición de lipoproteínas de baja densidad hacia el plasma sanguíneo, provocando la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos, también conocida como esteatosis (Olivera-Fuentealba, 2008; imagen adaptada de Rashid *et al.*, 2013).

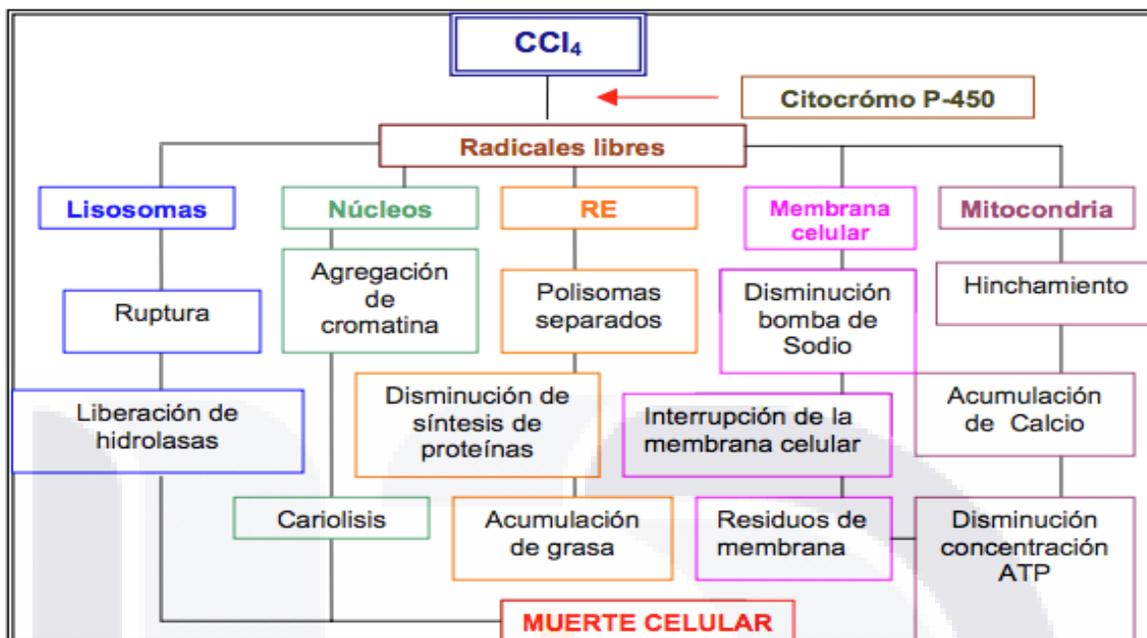


Figura 13: Procesos de muerte celular inducidos por el CCl₄ (Olivera-Fuentealba, 2008).



CAPÍTULO 2
ANTECEDENTES

2. Antecedentes

2.1 Tratamientos de Reversión de la Cirrosis Hepática.

Actualmente la cirrosis hepática es una de las enfermedades con mayor incidencia en el mundo sea cual sea la etiología, la cual, hasta la fecha no cuenta con un tratamiento efectivo para restaurar los niveles hepáticos y de colágeno basales por lo que ha sido tarea de grupos de investigación desarrollar un tratamiento el cual no recurra al único tratamiento por el cual se puede llegar a suprimir esta afección, este es el trasplante hepático, procedimiento quirúrgico que conlleva largos tiempos de recuperación y una disminución de la calidad de vida del paciente.

Durante los últimos años, los investigadores han enfocado sus estudios en la atención de los estímulos responsables de la activación celular fibrogénica hepática (Dubuisson *et al.*, 2002). Oben y Diehl (2004) demostraron, la presencia de $\alpha 1$ y β -adrenoreceptores en cultivos de CEH, donde utilizaron prazosina (10 μ M) y propanolol (10 μ M) (α - y β -adrenobloqueadores) observando una disminución del crecimiento celular del 20% de manera individual, y de manera conjunta en un 50%, por lo que promueven la disminución de la actividad de las CEH.

Estudios similares con α -1 y β -adrenoreceptores, que se han realizado en los últimos años, Hamdy y El-Demerdash (2014), evaluaron los efectos antifibróticos potenciales del carvedilol, (α -1 y β -adrenobloqueador) utilizado en el tratamiento de hepatotoxicidad por CCl₄ en ratones. Carvedilol posee propiedades antioxidantes importantes (Dandona *et al.*, 2007) en ratas tratadas con CCl₄, observando que el Carvedilol contrarresta los efectos generados, y lesiones histopatológicas inducidas por el CCl₄, así como el restablecimiento de enzimas que intervienen en los procesos antioxidantes.

Estudios reportados por Al-Ghamdi (2011), mencionan el efecto del Carvedilol y Propanolol en el proceso de la disminución de la hipertensión portal, demostrando que el Carvedilol es

uno de los medicamentos capaces de participar en la disminución del sangrado visceral, síntoma importante que puede desencadenar hemorragias en la afección hepática.

Estudios más recientes en el tratamiento de afecciones asociadas a la cirrosis hepática, son los realizados por Ding *et al* (2015), quienes utilizaron también adrenobloqueadores como la Doxazosina para el tratamiento de la angiogénesis, generada por el depósito aumentado de MEC en el hígado, ellos mencionan que el uso de los α - y β -adrenobloqueadores como la Doxazosina y el Carvedilol, pueden modular los mecanismos antiangiogénicos inhibiendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VFG).

Muñoz-Ortega *et al* (2016) utilizaron la Doxazosina y el Carvedilol como tratamiento en la de la cirrosis hepática inducida con CCl_4 en hámsteres, observando que los valores de las pruebas de función hepática y de colágeno tipo I fueron reducidos, comprobando que el tratamiento con Doxazosina y Carvedilol participa en el bloqueo de los α -1 y β -adrenoreceptores de las CEH, disminuyendo así, la generación de colágeno y contribuyendo de esta manera a la disminución de la fibrosis. Sin embargo, también el uso de la Doxazosina y Carvedilol parece tener efectos adversos. Por otra parte, Jansen *et al* (1989) estudiaron los efectos de estos fármacos en lípidos, lipoproteínlipasas y en la síntesis de colesterol en hámsteres, comprobando que en el proceso del aclaramiento de Doxazosina y Carvedilol, se afectó su funcionamiento por la inhibición de los adrenoreceptores.

En el caso de la Doxazosina la cual es un antagonista α 1-adrenérgico con acción prolongada (Fulton *et al.*, 1995), se fija competitivamente a los receptores α 1-adrenérgicos del sistema nervioso simpático, generando una vasodilatación periférica reduciendo la resistencia vascular y la presión arterial. Aproximadamente el 65% de la cantidad administrada se elimina en forma de metabolitos por las heces, y menos del 5% del fármaco se encuentra íntegro en la orina. Lo que sugiere una elevada circulación entero hepática (Carretero, 2002). La doxazosina se metaboliza ampliamente en el hígado, principalmente por O-desmetilación del núcleo de quinazolina o hidroxilación del resto de benzodioxano. Los estudios *in vitro* sugieren que la ruta principal para la eliminación es a través de CYP 3A4; sin embargo, las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

vías metabólicas CYP 2D6 y CYP 2C9 también están involucradas en menor medida. Aunque se han identificado varios metabolitos activos de Doxazosina, la farmacocinética de estos metabolitos no se ha caracterizado ampliamente (Doxazosin - FDA prescribing information, side effects and uses, 2017).

El Carvedilol por su parte es un betabloqueante no cardioselectivo, posee propiedades vasodilatadoras por tener también una actividad α 1-bloqueante. Está sometido a un metabolismo hepático por la familia del Citocromo P450, específicamente las subfamilias CYP2D6 mediante hidroxilación siendo su principal metabolito el 4'-hidroxifenilcarvedilol con una biodisponibilidad del 25% uniéndose en un 98% a las proteínas plasmáticas. Los metabolitos de este medicamento son excretados por la bilis principalmente, por heces fecales (www.acofarma.com, 2018). Las enzimas primarias P450 responsables del metabolismo del Carvedilol en microsomas hepáticos humanos fueron CYP2D6 y CYP2C9 y, en menor medida, CYP3A4, 2C19, 1A2 y 2E1. Se cree que CYP2D6 es la principal enzima en la 4'- y 5'-hidroxilación de Carvedilol, con una posible contribución de 3A4 (Coreg®- Carvedilol - FDA prescribing information, side effects and uses, 2005). Ambos medicamentos no deben ser administrados en pacientes con insuficiencia hepática debido a la elevada actividad metabólica que ocurre en el hígado, y por las enzimas que los metabolizan, ya que su aclaramiento genera especies reactivas de oxígeno (ERO) y por tanto favorecen el estrés oxidativo generando un proceso inflamatorio. Por tanto, es necesario mantener los tratamientos bajo dosis definidas o compensar los efectos adversos del tratamiento con otros compuestos que funjan como hepatoprotectores.

Un hepatoprotector, es una sustancia ya sea sintética o natural, que mejora las funciones del hepatocito, deben ser considerados como un co-tratamiento para frenar la afección hepática. Como se menciona, estos agentes tienen la capacidad de apoyar las funciones hepáticas proporcionando materiales útiles y reforzando los canales normales de desintoxicación, los canales normales de excreción e inhibiendo la apoptosis y compuestos nocivos como las ERO (Menon *et al.*, 2007).

Desde hace tiempo y en la actualidad el uso de plantas y sus derivados ha tomado importancia dentro de las ramas farmacológicas, alimenticias y nutraceuticas. La Curcumina

(diferuloilmetano), es un pigmento amarillo de la planta de la Cúrcuma *Cúrcuma Longa*, forma parte de la medicina tradicional hindú como medicamento para enfermedades gastrointestinales e inflamatorias (Menon *et al.*, 2007).

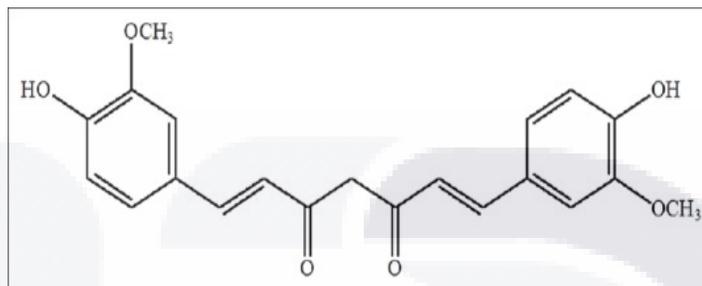


Figura 14: estructura química de la Curcumina o diferuloilmetano. (modificada de Menon, *et al.*, 2007).

La Curcumina está estrechamente asociada en los procesos anti-inflamatorios por el estrés oxidativo, en donde las vías principales son NF- κ β y TNF- α . La Curcumina es un potente antioxidante y puede disminuir el estrés oxidativo y la inflamación posterior. Este polifenol puede inhibir las citocinas inflamatorias tales como las interleucinas, las quimiocinas, así como las enzimas inflamatorias como la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la óxido nítrico sintasa (iNOS).

Estudios recientes como el realizado por Maithili Karpaga en el 2015 han demostrado que la Curcumina exhibe una fuerte actividad antioxidante y desempeña un papel vital contra las enfermedades mediadas por el estrés oxidativo como la diabetes, la obesidad y las enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, Kamalakkannan *et al* (2005), evaluaron el efecto de la Curcumina, en la inducción de hepatotoxicidad inducida en ratas con CCl₄, en donde los niveles de las enzimas antioxidantes aumentaron significativamente. La administración de este compuesto disminuyó los niveles de enzimas marcadoras de daño hepático. También se realizaron estudios histopatológicos donde se encontró que la administración de Curcumina mostró un efecto protector en el daño causado por el CCl₄.

Lee *et al* (2016) también evaluaron el efecto hepatoprotector de la Curcumina, bajo el tratamiento de CCl₄ disminuyendo el estrés oxidativo la inhibición de la lipoperoxidación y

el aumento de la GSH. Ellos encontraron que la Curcumina protege las lesiones hepáticas agudas con la disminución de los niveles de las aminotransferasas séricas y el aumento de la glutatión (GSH), concluyendo en la disminución de la lipoperoxidación. Con ello se ha demostrado el efecto hepatoprotector del polifenol en este tratamiento. Por tanto, es de relevancia el estudio de los bloqueadores adrenérgicos junto con el efecto antioxidante y antiinflamatorio de la Curcumina durante el tratamiento de la reversión de la cirrosis inducida por el CCl₄.

Li *et al* (2014), evaluaron la disminución del daño hepático por la vía Nrf2 en ratas Sprague-Dawley adultas con esteatosis hepática no alcohólica en donde observaron que la administración de Curcumina disminuyó los niveles de esteatosis e inflamación hepática junto con la disminución de aminotransferasas séricas, lípidos y una resistencia menor a la insulina. A nivel molecular encontraron una disminución del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 6 y malondialdehído. Por otra parte encontraron un aumento en la concentración de enzimas hepáticas como la glutatión peroxidasa (GSH) y superóxido dismutasa (SOD); La administración de Curcumina mostró un aumento del factor de transcripción Nrf2 en núcleos hepáticos de las ratas, sugiriendo que estos efectos beneficiosos fueron producidos a través de la activación y la modulación de la vía de señalización Nrf2.



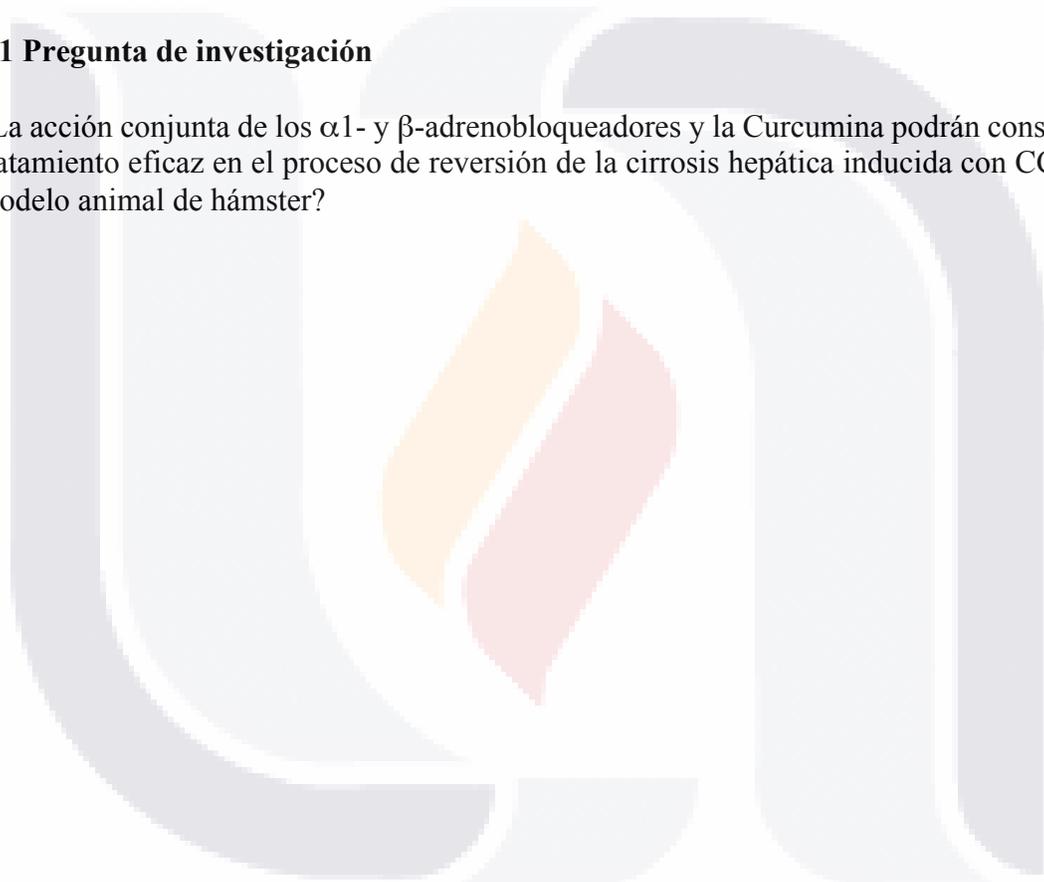
CAPÍTULO 3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3. Planteamiento del Problema

La cirrosis hepática es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en el mundo. La OMS estimó en 2014, que es una de las diez principales causas de muertes a nivel mundial, siendo sus principales motivos el consumo de alcohol y la hepatitis viral C. Aunque se han postulado tratamientos para el control y tratamiento de la cirrosis bajo ciertos métodos, actualmente no existe ninguno para su cura, por lo que mediante este trabajo se pretende demostrar que la acción conjunta de los α - y β - adrenobloqueadores como la Doxazosina, Carvedilol y un hepatoprotector como la Curcumina pueden ser candidatos potenciales para el tratamiento de esta afección hepática.

3.1 Pregunta de investigación

¿La acción conjunta de los α 1- y β -adrenobloqueadores y la Curcumina podrán constituir un tratamiento eficaz en el proceso de reversión de la cirrosis hepática inducida con CCl_4 en el modelo animal de hámster?





CAPÍTULO 4
JUSTIFICACIÓN

4. Justificación

La cirrosis hepática constituye un importante problema de salud de la población mundial formando parte de las primeras causas de muerte. En 2015 la OMS estimó que, en América, existen más de 13 millones de personas infectadas por el virus de hepatitis C y presentan fallos hepáticos por consumo de alcohol. Entre 2008 y 2010 el 3% de todas las muertes en América Latina y Caribe estuvieron asociadas a cáncer, fallo hepático, hepatitis aguda y crónica y cirrosis (Mitchell, 2015). El consumo de alcohol es uno de los generadores de cirrosis hepática, donde cada año se producen 3.3 millones de muertes en el mundo, debido a su consumo, lo que representa un 5.9% de todas las defunciones (WHO, 2017).

En México la cirrosis hepática es considerada como la quinta causa de mortalidad, es decir que cada año, fallecen 30,000 personas por esta enfermedad. Este padecimiento es un problema de salud pública en el país, que se registra comúnmente en la población en etapa reproductiva, y en personas que ingieren bebidas alcohólicas en exceso. Estudios recientes muestran que al menos 5% de los mexicanos son alcohólicos (Hernández, 2008).

A pesar de las varias investigaciones realizadas en años anteriores, en la actualidad no existe un tratamiento certero contra la cirrosis hepática, por lo que este estudio se propone evaluar la reversión de la cirrosis en hámsteres inducida con CCl_4 y el tratamiento con α - y β -adrenobloqueadores y Curcumina para evaluar el nivel de su reversión.



5. Hipótesis

El tratamiento conjunto de α - y β - adrenobloqueadores en sinergia con la Curcumina, pueden ser un tratamiento eficaz para reducir los niveles de matriz extracelular y marcadores enzimáticos e inflamatorios, en la reversión del daño en el modelo de cirrosis hepática con CCl_4 .

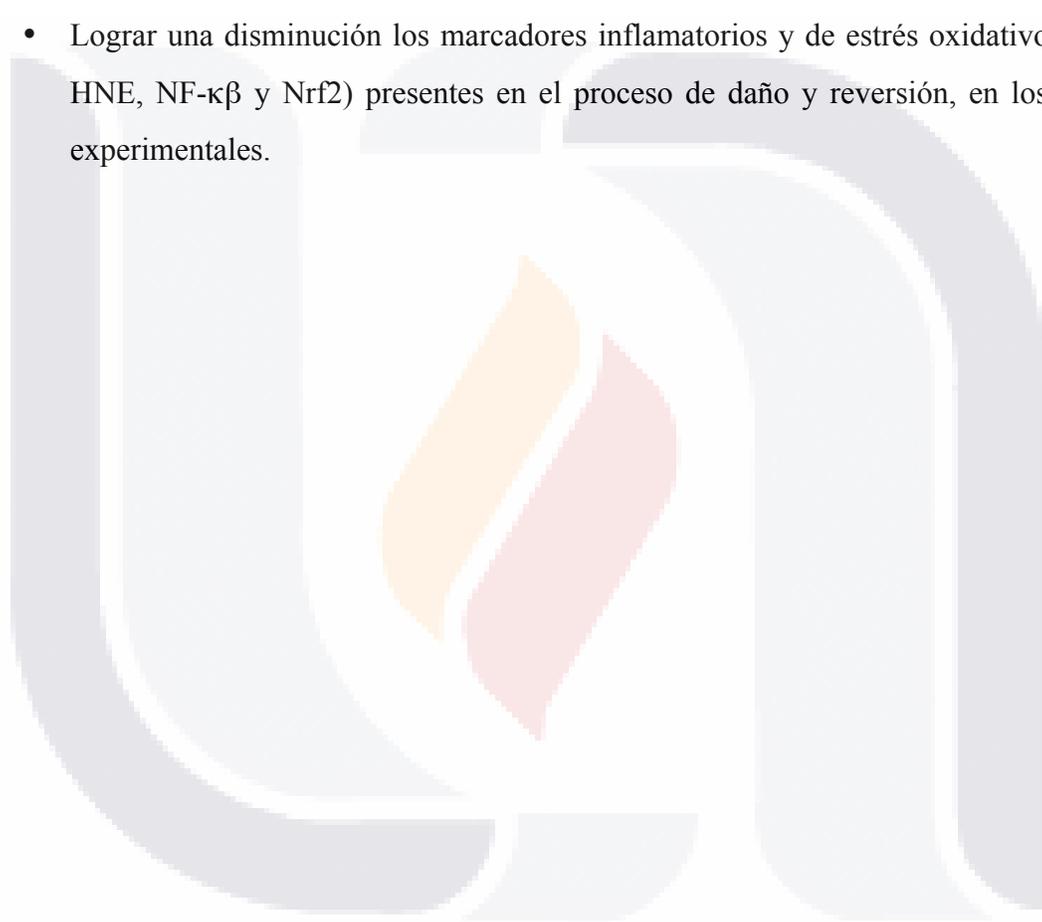




CAPÍTULO 6
METAS

6. Metas

- Inducir cirrosis en hámsteres con el uso del CCl_4 .
- Demostrar que el tratamiento sinérgico de la Curcumina junto con los bloqueadores α - y β - adrenérgicos son capaces de revertir la cirrosis hepática en hámsteres.
- Obtener una disminución de la inflamación del parénquima hepático, derivado del uso de la Curcumina como co-tratamiento.
- Lograr una disminución los marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo del (4-HNE, $\text{NF-}\kappa\beta$ y Nrf2) presentes en el proceso de daño y reversión, en los grupos experimentales.





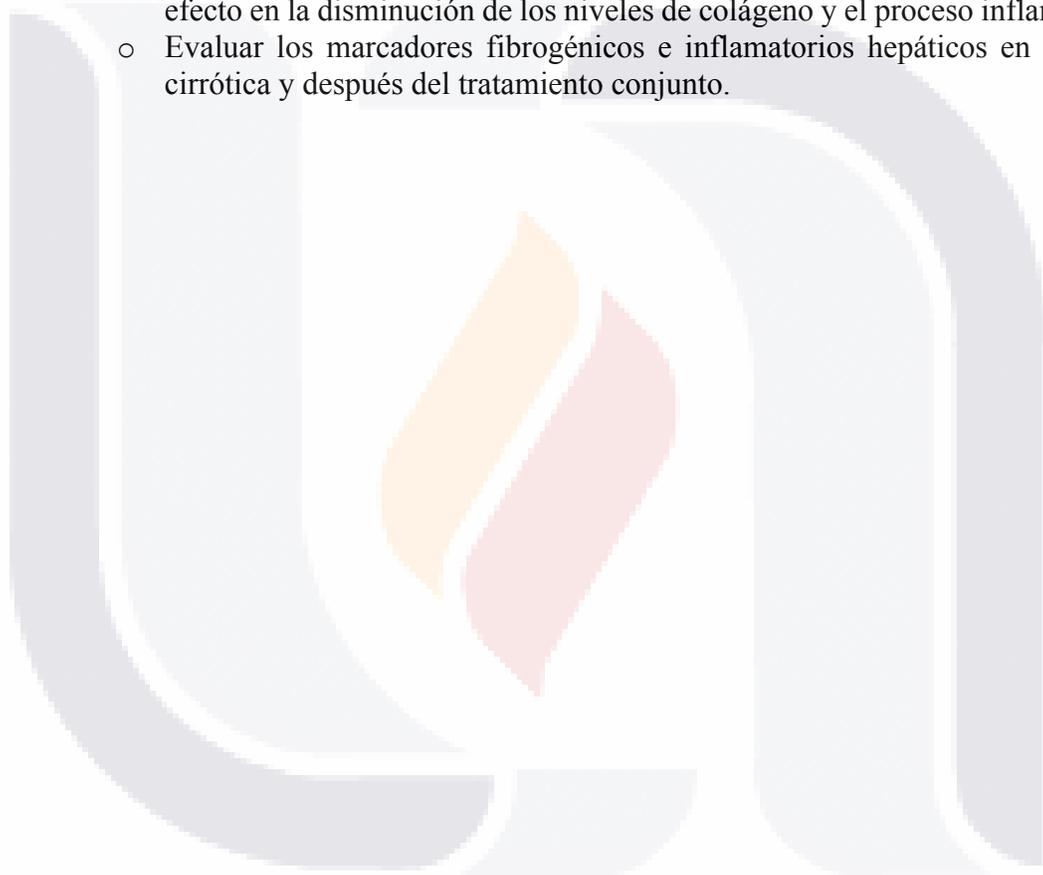
7. Objetivos

7.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto conjunto de la Doxazosina, el Carvedilol, y la Curcumina en el proceso de reversión de la cirrosis inducida con CCl₄.

7.2 Objetivos específicos.

- Establecer un modelo de cirrosis hepática en hámsteres induciendo CCl₄.
- Demostrar el efecto anti-fibrótico y anti-inflamatorio de los α - y β -adrenobloqueadores en co-administración con la Curcumina, así como su efecto en la disminución de los niveles de colágeno y el proceso inflamatorio.
- Evaluar los marcadores fibrogénicos e inflamatorios hepáticos en la etapa cirrótica y después del tratamiento conjunto.





CAPÍTULO 8
METODOLOGÍA

8. Metodología

8.1 Diseño Experimental.

Se utilizaron 68 hámsteres (*Mesocricetus auratus*) machos de entre 100 y 190 g los cuales fueron divididos en dos grupos (50 animales para el estudio de la cirrosis inducida con CCl₄ y 18 para los grupos controles SHAM). Las figuras 15 y 16 describen detalladamente los diferentes grupos formados.

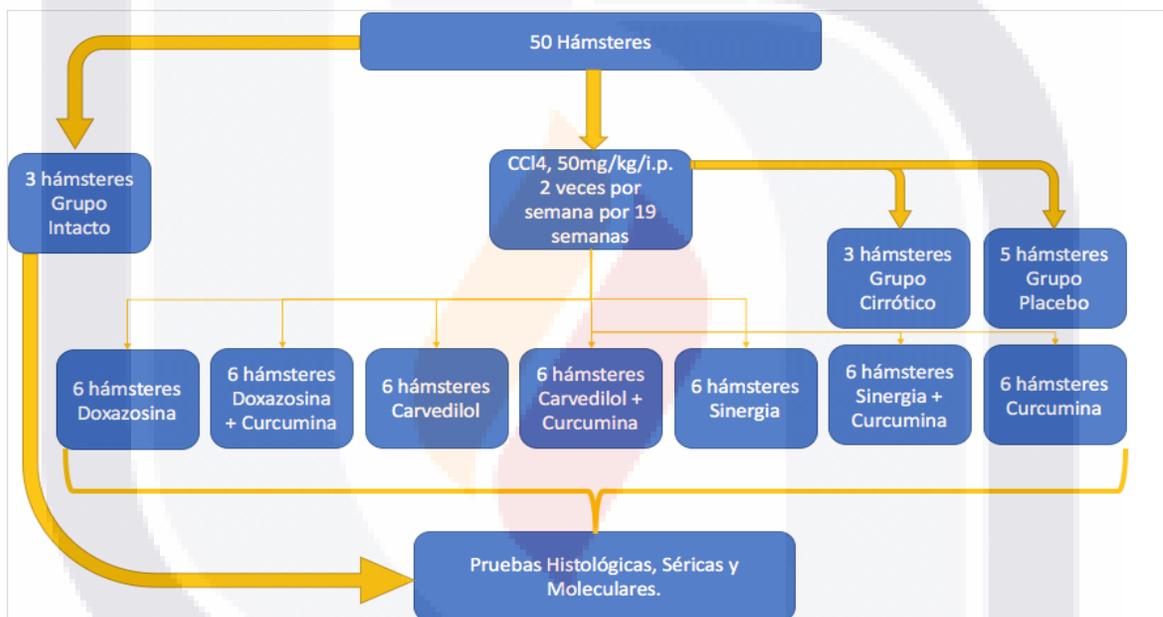


Figura 15: distribución de los hámsteres y división por grupos bajo la inducción de CCl₄.

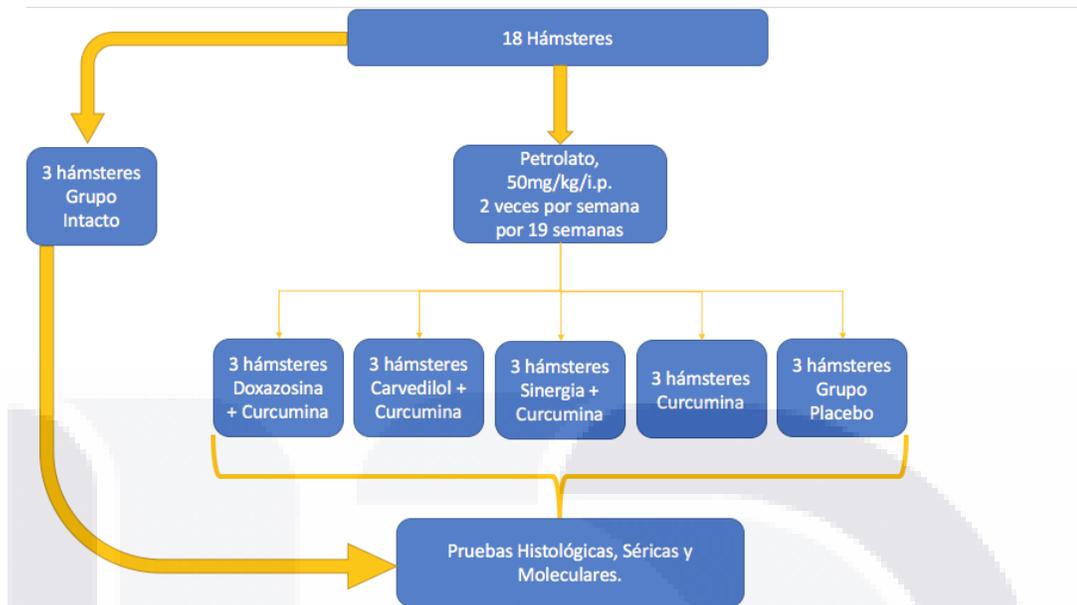


Figura 16: distribución y división de los hámsteres en el grupo de estudio SHAM.

8.1.1 Inducción de Cirrosis

El modelo de inducción de cirrosis fue adaptado de Muñoz Ortega *et al.*, (2016). El cual se realizó con una dosis de 50 mg/kg de CCl₄. Las dosis formuladas (tabla 4) fueron inyectadas vía intraperitoneal utilizando petrolato líquido. Por lo tanto, del primer grupo considerado para evaluar el daño crónico por CCl₄, se separaron tres animales como grupo control intacto, el cual no recibió tratamiento durante toda la fase experimental, mientras que a los otros 47 hámsteres se les indujo la cirrosis hepática, mediante la administración de 50 mg/kg de CCl₄ vía intraperitoneal, dos veces por semana durante 19 semanas (Ver tabla 2), y después de la inducción de la cirrosis, se inició el tratamiento con Curcumina (30 mg/kg), Doxazosina (0.23 mg/kg) y Carvedilol (0.35 mg/kg), vía oral diariamente durante 21 días sin descanso, según correspondiera (ver apartado 8.3 y tabla 3). La tabla 4 muestra los grupos experimentales con la descripción detallada de cada tratamiento:

Tabla 2: Separación por peso de los hámsteres utilizados para la inducción del CCl₄.

No. De Grupo	Rango de peso (g)	Promedio del Grupo	Volumen Administrado de CCl ₄ (ml).
1	100-115	107.5	0.0035
2	115-132	124.2	0.004
3	132-149	141.8	0.0045
4	149-166	157.5	0.005
5	166-183	174.5	0.0055

8.1.1.1 Tratamientos con Doxazosina, Carvedilol y Curcumina.

Los tratamientos con Doxazosina (0.23 mg/kg), Carvedilol (0.35 mg/kg) y Curcumina (30 mg/kg) y los co-tratamientos entre ellos fueron mezclados con agua purificada diariamente y administrados durante 21 días consecutivos (administración vía oral, ver tabla 3).

Tabla 3: distribución de los sujetos de estudio bajo los diferentes grupos de tratamiento.

Grupo	Animales de Estudio	Observaciones
Intacto	3	Controles sanos
Cirrótico	3	Inducción de CCl ₄ y sacrificados después del tiempo de inducción.
Placebo	5	Inducción de CCl ₄ y sacrificados después del periodo de tratamiento.
Doxazosina	5	Tratamiento de 21 días sin descanso después de la inducción de CCl ₄ .
Doxazosina + Curcumina	6	
Carvedilol	5	
Carvedilol + Curcumina	6	
Doxazosina + Carvedilol (Sinergia)	5	
Sinergia + Curcumina	6	
Curcumina	6	

8.1.2 Grupos SHAM

Los grupos SHAM fueron constituido por 18 hámsteres, los cuales fueron pesados y divididos por rangos de peso (en rangos de 10 gramos en aumento) , estos fueron administrados con 200µl de petrolato vía intraperitoneal, dos veces por semana durante 19 semanas. Posteriormente se aplicó el tratamiento con Curcumina (30 mg/kg), Doxazosina (0.23 mg/kg) y Carvedilol (0.35 mg/kg), vía oral diariamente durante 21 días. A su vez, tres animales fueron dispuestos como grupo control intacto para comparaciones futuras, este grupo no recibió tratamiento alguno durante la fase experimental. La tabla 4, describe la conformación de los grupos controles SHAM e Intacto:

Tabla 4: distribución de los sujetos de estudio pertenecientes al grupo SHAM

Grupo de Estudio	Sujetos de Estudio	Observaciones
Intacto	3	Controles sanos
Placebo	3	Inducidos con petrolato, no recibieron tratamiento y sacrificados después del tiempo del tratamiento.
Doxazosina + Curcumina	3	Tratamiento de 21 días sin descanso después de la inducción de petrolato.
Carvedilol + Curcumina	3	
Sinergia + Curcumina	3	
Curcumina	3	

Todos los animales de estudio se alimentaron con purina y agua *ad libitum*, bajo ciclos de luz obscuridad de 12h/12h. 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 (Jayo y Cisneros, 1999).

8.2 Obtención y Tratamiento de Muestras Biológicas.

El sacrificio se realizó utilizando pentobarbital (1.9 mg/kg); y se extrajo mediante punción cardiaca 1 mL de sangre para posteriormente realizar pruebas de funcionamiento hepático, enseguida se realizó la disección del tejido hepático, el cual sirvió para la obtención de muestras para pruebas moleculares e histológicas, y se utilizó la escala Child Pugh para evaluar el estado clínico.

8.2.1 Sangre.

La sangre obtenida de cada animal de estudio fue centrifugada a 10000 RPM durante 10 min para separar el suero, y realizar las pruebas de funcionamiento hepático en el equipo VITROS® 5600.

8.2.2 Tejidos.

El tejido hepático diseccionado fue lavado con solución salina al 0.9%, y se tomó aproximadamente 2 g de tejido por sujeto de estudio y colocados en formalina neutra al 10%, otros 2 g fueron colocados en glutaraldehído al 2.5% para la realización de pruebas histológicas, aproximadamente 1.5 g del tejido para extracción de RNA, 0.5 g para ensayos iniciales y el restante por si fuese necesario realizar repeticiones.

8.2.3 Procesamiento de Tejidos para técnicas histológicas.

Las muestras inicialmente fueron procesadas siguiendo la técnica histológica utilizando el equipo Histoquinet Thermo Scientific Microm STP 120 durante 24 horas. Posteriormente se incluyeron en parafina (Thermo scientific microm EC150-1 y EC150-2) y se realizaron cortes de 5 μm de espesor utilizando micrótomo Leica RM 2125RT (Anexo A).

8.2.3.1 Tinción Hematoxilina-Eosina.

Se trabajó con laminillas de cortes de hígado de 5 μm según la metodología de Megías (2016) con modificaciones. Los cortes fueron deshidratados bajo diferentes concentraciones de etanol y fueron teñidos con hematoxilina durante diez minutos y eosina durante un minuto. Al final fueron montados con Entellan® para su observación en el microscopio. (Anexo B).

8.2.3.2 Tinción Rojo Sirio.

La tinción de rojo Sirio es una técnica específica para distinguir y poder medir fibras de colágeno (Bellón-Caneiro et al., 2005). Los cortes de tejido hepático fueron a su vez teñidos con hematoxilina por diez minutos y después con rojo sirio durante una hora. Al final los cortes fueron montados en Entellan® para observarse por microscopía de luz polarizada. Esta técnica nos permite realizar la identificación del colágeno tipo I y III, además de su cuantificación mediante un análisis morfométrico utilizando el programa Image J Fiji V. 1.0

(Schindelin *et al.*, 2012). El porcentaje de colágeno fue calculado, tomando el área total de estudio dividida entre el área de colágeno medida. (Anexo C).

8.3 Técnicas Moleculares

8.3.1 Extracción de proteínas.

La extracción de proteínas se realizó con 100 mg de tejido hepático el cual se mezcló con 150 μ l de solución de lisis (Tris HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 50 mM) más inhibidores (Iodoacetamida 3 mM, N-ethyl maleimida 3 mM, Tosil-L-lisina clorametil cetona (TLCK) 3 Mm, Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 1 mM) y homogenizado en frío con un homogenizador (Pellet Pestile® Kontes). El material homogenizado fue centrifugado a 15000 rpm durante 10 minutos a 4° C en centrifuga Hanil Micro 17R+. El sobrenadante fue recuperado y conservado a -20°C para su cuantificación (Anexo D).

8.3.2 Cuantificación de Proteínas.

La concentración de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford *et al.*, 1976; Carlsson *et al.*, 2011) con algunas modificaciones. La elaboración de la curva estándar se realizó con albúmina sérica bovina (BSA 1 mg/ml) (0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 μ g/ml). Las muestras fueron medidas en placa de 96 pozos (Corning Costar 2590) y leídas en espectrofotómetro (BioRad iMark Microplate Reader) a 595 nm (Anexo E).

8.3.3 Identificación de proteínas por Dot-blot

Se utilizaron membranas de nitrocelulosa 0.2 μ m (BioRad) donde fueron colocadas 5 μ l de proteína extraída en el sobrenadante. La membrana se bloqueó con leche descremada Svelty® al 5% con TBS-Tween 20 como diluyente durante 24 horas en agitación a 4°C durante 1 hora. Después, se lavaron con TBS-Tween 20, 3 veces durante 5 minutos. Se utilizó anticuerpo primario 4-HNE 1:2000 (Abcam®- Anti-4 Hydroxynonenal antibody ab46545) y el testigo positivo β -Actina 1:5000 (SIGMA-ALDRICH®- Monoclonal Anti- β -Actin, antibody produced in mouse-A5441) los cuales se incubaron durante toda la noche a 4°C y

en agitación. Terminada la incubación se retiró el anticuerpo y las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con TBS-Tween 20. Posteriormente se colocó el anticuerpo secundario para 4-HNE 1:1000 (Abcam®-Goat Anti-Rabbit IgG AP-ab97048) y para β -Actina 1:20000 (SIGMA-ALDRICH®-Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase, antibody produced in goat, A-1862) el cual se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas fueron reveladas con 10 ml de 3,3'-Diaminobenzidina (SIGMA-ALDRICH® BCIP/NBT PCode:1002322161) hasta observar una reacción colorimétrica. Las bandas mostradas fueron medidas con el programa morfométrico Image J Fiji V 1.0 (Schindelin, J., et al. 2012). (Anexo F)

8.4 Extracción de ARN

Las muestras obtenidas de tejido hepático fueron almacenadas en RNA later® a -80°C hasta su utilización. La extracción de ARN se llevó a cabo con el Kit Total RNA Purification Kit (Jena Bioscience no. de catálogo PP-210XS Löbstedter Str. 71 | 07749 Jena, Germany) siguiendo el protocolo del fabricante con ligeras modificaciones (ANEXO G). Los tejidos fueron homogenizados con el homogenizador de tejidos (IKA® T10 basic- homogenizer workcenter). La concentración de ARN se cuantificó utilizando el Nanodrop-2000 (Thermo-Scientific®) y almacenado a -80°C en ultracongelador (Thermo-Scientific® Forma 88000 SERIES).

8.4.1 Retrotranscripción de ARN

Se sintetizó cDNA a partir de RNA utilizando el kit GoScript™ Reverse Transcripción System (Promega®) usando el protocolo del fabricante (Anexo H). Las muestras fueron colocadas en el termociclador (Techne Genius FGEN02TP). Las especificaciones para la retrotranscripción se describen a continuación: Alineación: 25 °C durante 5 minutos, Extensión: 42 °C durante 120 minutos, Inactivación de la Transcriptasa Reversa: 70 °C durante 15 minutos. El cDNA obtenido se cuantificó en el Nanodrop-2000 (Thermo-Scientific®) y almacenado a -80°C en ultracongelador (Thermo-Scientific® Forma 88000 SERIES).

8.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).

El cDNA obtenido se utilizó para cuantificar la expresión relativa de los factores de transcripción Nrf2 y NFκB. Las muestras fueron diluidas en concentraciones de 1:8 para los grupos sin Curcumina, y 1:11 para los tratamientos con Curcumina. Se realizaron mezclas en placas de 96 pocillos para qPCR (Applied Biosystems® MicroAmp® -N8010560), qPCR GreenMaster with UNG (Jena Bioscience GmbH Lößstedter Str. 71 | 07749 Jena, Germany | PCR-303S) y los oligos correspondientes (IBT © 2018 Integrated DNA Technologies, Inc.) en dilución 1:20. (**Nrf2**: Forward: 3' GCAAGATGGAGGAGAACGAG 5', Reverse: 5' CCTCCAGCAGCCTAAGACAC 3', **NFκB**: Forward: 3' CAGGAGCCTCAAACCTGAAG 5' Reverse: 5' CGTCTGTGGGAGAGAAGTCC 3'); como control endógeno se utilizó **Actina** (Forward: 3'GCCCAGAGCAAGAGAGGTAT5' Reverse: 5' CACGCAGCTCGTTGTAGAAG 3'). Las placas se agitaron en microcentrífuga (MPS 1000 Mini PCR Plate Spinner- Labnet International®) y colocadas en el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System para su análisis. Las condiciones de la PCR se describen a continuación: 40 ciclos, alineación: 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 3 minutos, alineamiento: 95°C durante 30 segundos, 62°C durante 40 segundos, elongación 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos. (Anexo I)

8.5 Análisis Estadístico.

Los datos arrojados, fueron analizados comparando los diferentes grupos de estudio, por tanto se realizaron pruebas de ANOVA y Tuckey con el software Graph Pad Prism versión 7, los datos fueron expresados en términos de la media, con una n=5, y una p≤ 0.05 como grado de significancia.



CAPÍTULO 9
RESULTADOS

9. Resultados

9.1 Eficiencia de los α/β adrenobloqueadores en conjunto con la Curcumina en el tratamiento de la cirrosis hepática.

9.1.1 Evaluación del peso de los hámsteres tratados con CCl₄ y con Petrolato líquido.

Durante la inducción con tetracloruro de carbono, los hámsteres mostraron una disminución en su peso. Iniciaron con un promedio de 136.07g y después de la semana 6 se observó un peso promedio de 111.09g. Después se observó un aumento de peso continuo hasta la semana 19 con un peso promedio de 135.76 g (Gráfico 1, línea azul). Esto acompañado de cambios físicos en los sujetos de estudio tales como el aumento de volumen en la zona testicular y abdominal, síntoma conocido como ascitis, patognómico en la cirrosis descompensada (Figura 17).

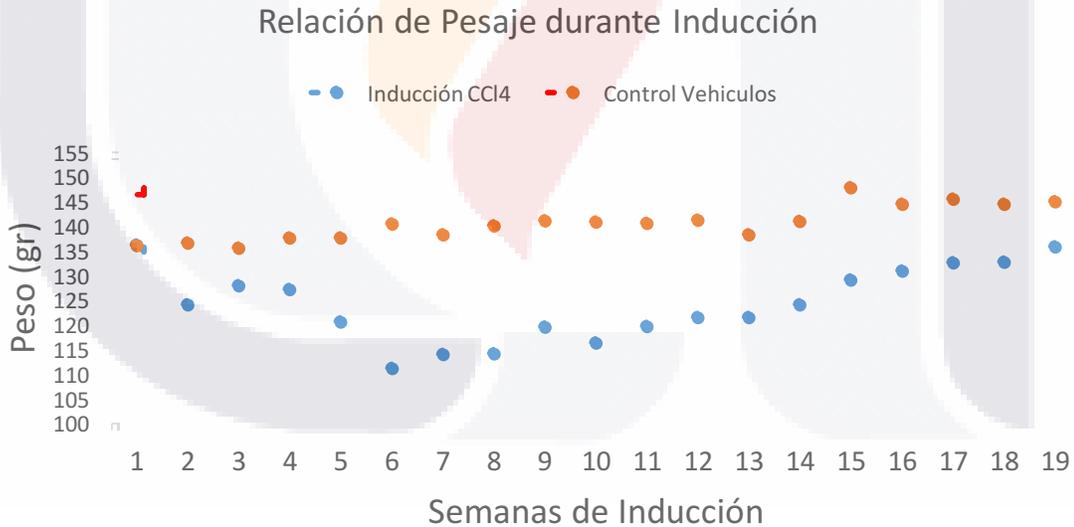


Gráfico 1: Promedio del peso de los hámsteres durante cada semana de inducción con CCl₄ y petrolato. Animales tratados con CCl₄ (azul), hámsteres tratados con petrolato líquido (rojo).

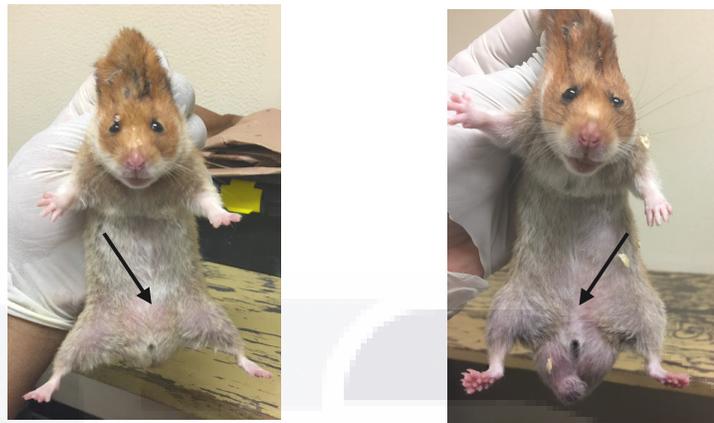


Figura 17: Cambios observados a raíz del daño hepático inducido con CCl₄. Se puede observar a un hámster intacto (izquierda) y a uno cirrótico (derecha) un aumento de volumen de las bolsas testiculares de los hámsteres (flechas negras).

9.1.2 Descripción macroscópica de la arquitectura hepática de hámsteres intactos y cirróticos.

Cambios importantes se encontraron en los hígados cirróticos después de las 19 semanas de inducción y placebos tratados con CCl₄ a las 21 semanas, en donde se pudo observar que, se encontraron con un mayor tamaño y una coloración opaca y pálida comparada con el grupo intacto, se identificó la formación de granulaciones conocidas como nódulos de regeneración en la superficie de todo el hígado. En comparación con los hígados del grupo intacto, estos mostraron coloraciones brillosas y características del órgano, el tejido se observó liso y sin granulaciones en su superficie. Después del tratamiento los hígados pertenecientes a los grupos Doxazosina, Carvedilol y la sinergia de estos fármacos mostraron un menor tamaño, menor presencia de nódulos de regeneración con una tonalidad parecida a la presentada por el grupo intacto y morfológicamente diferente al grupo placebo. Por otra parte, los animales que recibieron los co-tratamientos con Curcumina, mostraron un tamaño parecido al grupo intacto, con baja presencia de granulaciones hepáticas y no se observó cambio en la coloración en el hígado. Lo cual indica que los tratamientos en los cuales fue involucrada la Curcumina ayudaron a la protección y regeneración del daño causado por CCl₄ (Figura 18).

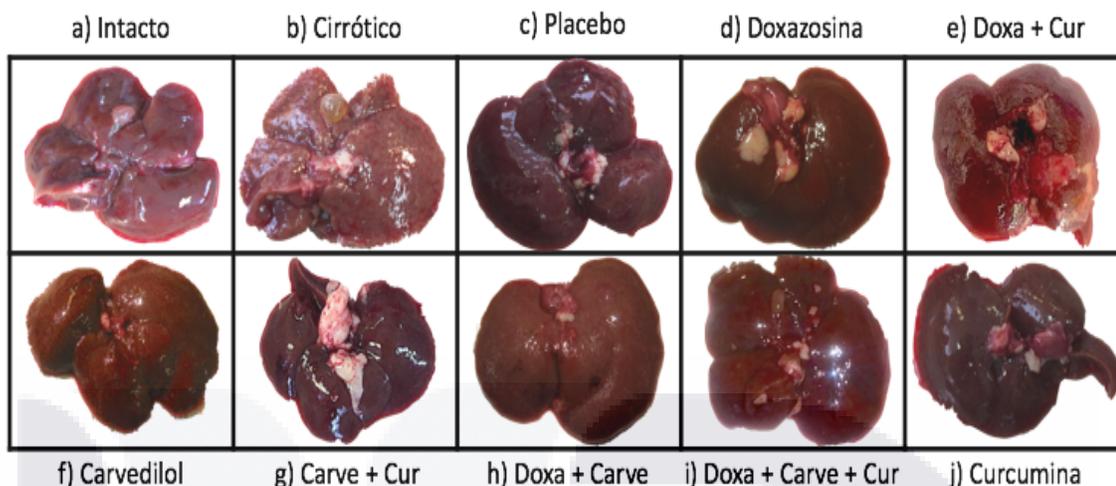


Figura 18: Morfología de los animales tratados. a) se observa el hígado Intacto con coloraciones brillantes rojizas, superficie lisa completamente. b) hígado Cirrótico, se observa de mayor tamaño en comparación al intacto, con nódulos y tonos pálidos. c) hígado Placebo, se observan nódulos de regeneración y una superficie hepática sinuosa con tonalidades pálidas. d) Hígado tratado con Doxazosina, se aprecian pocos nódulos de regeneración con tonalidades rojizas cercanas al intacto. e) Tratamiento con Doxazosina y Curcumina, con un tamaño y tonalidades rojizas muy cercanas al grupo intacto. f) tratamiento con Carvedilol, se aprecian tonalidades rojizas parecidas al grupo intacto, con bajos nódulos de regeneración. g) Carvedilol y Curcumina, se observan tonalidades rojizas marrón cercanas al grupo intacto, se observaron pocos nódulos de regeneración. h) tratamiento con Doxazosina y Carvedilol (sinergia), no se distinguen nódulos, y con tonos rojizos oscuros parecidos a los del grupo intacto. i) tratamiento con sinergia y Curcumina, se observan tonos rojizos iguales al intacto, de tamaño parecido, no se observaron nódulos de regeneración. j) tratamiento con Curcumina, con tonalidades rojizas similares al intacto, no se observaron nódulos de regeneración.

9.1.3 Pruebas de Función Hepática.

Se realizaron pruebas de función hepática donde se evaluó la concentración de glucosa, proteínas totales, albúmina, bilirrubina total, AST, ALT y Fosfatasa Alcalina.

9.1.3.1 Glucosa

Inicialmente se llevó a cabo la cuantificación de glucosa en sangre la cual está directamente relacionada con el metabolismo hepático en rutas tales como la generación de glucógeno y su degradación para su liberación en torrente sanguíneo. Los resultados obtenidos presentaron una disminución importante en la concentración de glucosa en los grupos cirrótico y placebo en comparación con el grupo intacto, por otra parte los tratamientos administrados con Doxazosina sola y Carvedilol solo, no presentaron diferencia significativa

con el grupo placebo en los niveles de glucosa serica, en cambio, los grupos donde se vio involucrada la Curcumina, mostraron incrementos en las concentraciones de glucosa en sangre sin ser estadísticamente diferente al grupo intacto. (véase tabla 5 y gráfico 2).

Tabla 5: Relación de las concentraciones de Glucosa.

Grupo	Concentración de Glucosa (mg/dl)
Intacto	121.5 ± 28.26
Cirrótico	74.33 ± 7.174
Placebo	64.22 ± 24.5
Doxazosina	99.50 ± 15.86
Doxazosina + Curcumina	144.8 ± 54.34
Carvedilol	98 ± 16.09
Carvedilol + Curcumina	153.7 ± 32.04
Sinergia	131 ± 36.91
Sinergia + Curcumina	167.8 ± 20.82
Curcumina	144.2 ± 31.58

Estos resultados indican que los tratamientos con Curcumina mostraron una mejora importante en la concentración de glucosa en sangre, lo que indica una recuperación en las funciones hepáticas ante el daño generado por el CCl₄ y los fármacos.

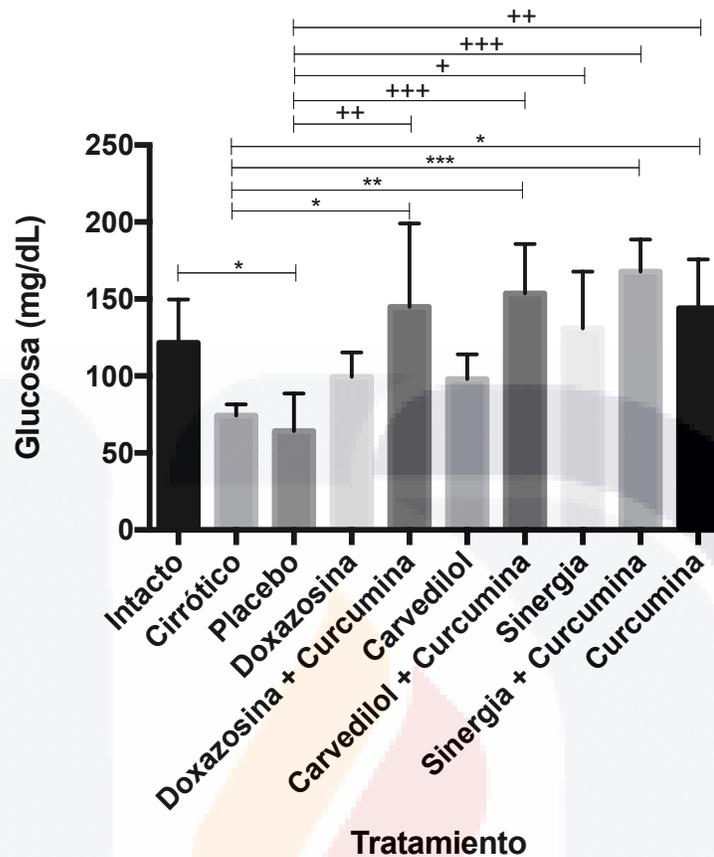


Gráfico 2: Evaluación de la concentración de Glucosa en sangre en los animales con los diferentes tratamientos. Se observa un decremento importante en la concentración de glucosa del grupo placebo y cirrótico, con respecto al intacto. Los tratamientos con α/β adrenobloqueadores aumentaron la concentración de glucosa sin llegar los niveles del grupo intacto. El co-tratamiento con la Curcumina aumentó las concentraciones de glucosa. Representación de la media de cada tratamiento \pm desviación estándar. (+: Comparación contra grupo placebo, * comparación contra grupo cirrótico; n=6, * o +: P<0.05, ** o ++: P<0.01, *** o +++: P<0.001).

9.1.3.2 Proteínas totales.

Es una de las pruebas bioquímicas que sirven para medir la cantidad total de proteína, compuesta de albúmina y globulina. Las concentraciones por debajo del rango de referencia indican posibles afecciones hepáticas o infecciones agudas. Los resultados obtenidos, mostraron una disminución importante en el grupo cirrótico con respecto al intacto, mientras que los demás grupos mostraron concentraciones cercanas al intacto. Todos los grupos a excepción del grupo cirrótico mostraron una recuperación de los valores de

proteínas totales indicando una mejoría en el funcionamiento hepático, tanto endógena (grupo Placebo) y por los tratamientos. (véase tabla 6 y gráfico 3).

Tabla 6: Relación de las concentraciones de Proteína Total.

Grupo	Concentración de Proteínas Totales (g/dl)
Intacto	5.817 ± 0.1169
Cirrótico	3.250 ± 0.0577
Placebo	5.550 ± 0.5318
Doxazosina	5.775 ± 0.2062
Doxazosina + Curcumina	5.533 ± 0.4457
Carvedilol	5.867 ± 0.1155
Carvedilol + Curcumina	5.560 ± 0.4889
Sinergia	6.300 ± 0.1414
Sinergia + Curcumina	5.700 ± 0.228
Curcumina	5.533 ± 0.3386

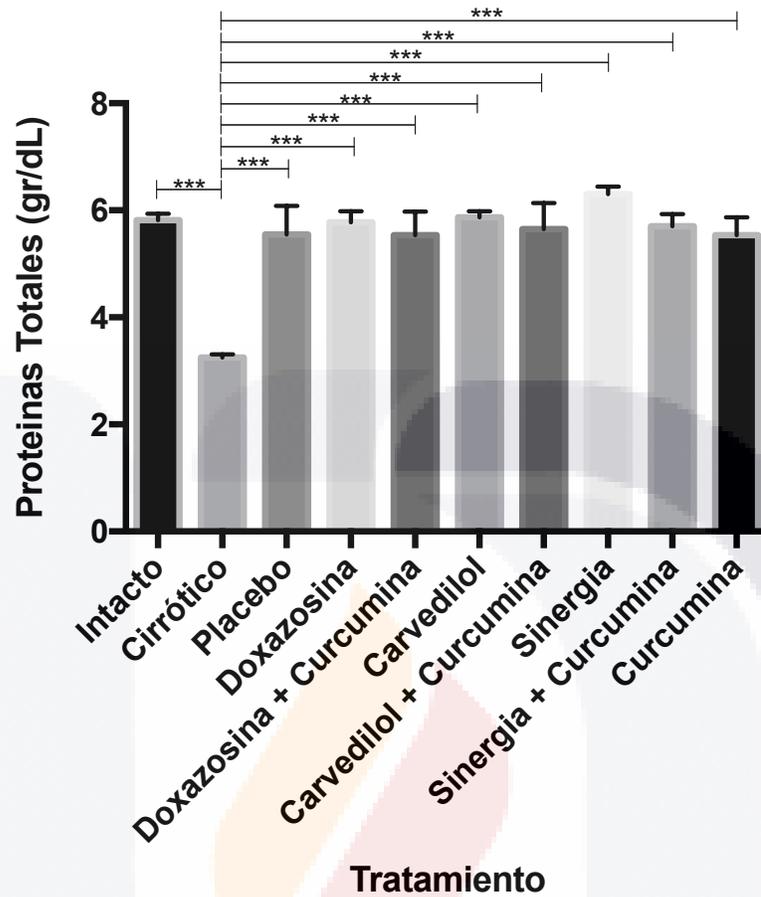


Gráfico 3: Evaluación de concentración de Proteína Total en suero. Se observa una disminución de la concentración de proteínas totales del grupo cirrótico contra los demás tratamientos y grupo intacto los grupos tratados mostraron una recuperación de la concentración cercana al grupo intacto. Representación de las medias de cada grupo experimental (n=6, *: P<0.05, **: P<0.01,***: P<0.001).

9.1.3.3 Albúmina.

Esta proteína es fabricada en hígado y posee diversas funciones dentro de las cuales favorece el transporte de los líquidos en los vasos sanguíneos y su reparto entre los tejidos y los vasos (Boveris *et al.*, 1983). Una tasa de albúmina sérica baja sugiere edema, mientras que por otra parte concentraciones elevadas conducen a una deshidratación. Los resultados mostraron una disminución en la concentración en los grupos Cirrótico y un ligero aumento en el los grupos Placebo, Doxazosina y Carvedilol. Por otra parte la sinergia de estos medicamentos mostro concentraciones dos veces mejores a las del grupo Cirrótico. Por su parte los co-

tratamientos con la Curcumina arrojaron un ligero aumento con cercanía a los valores del grupo Intacto.

Tabla 7: Relación de las concentraciones de Albúmina.

Grupo	Concentración de Albúmina (g/dl)
Intacto	2.843 ± 0.207
Cirrótico	1.857 ± 0.528
Placebo	2.363 ± 0.226
Doxazosina	2.675 ± 0.095
Doxazosina + Curcumina	2.517 ± 0.2483
Carvedilol	2.800 ± 0.1
Carvedilol + Curcumina	2.567 ± 0.372
Sinergia	3.050 ± 0.707
Sinergia + Curcumina	2.450 ± 0.104
Curcumina	2.367 ± 0.121

Estos resultados sugieren una mejoría de las funciones hepáticas con los tratamientos utilizados tanto con y sin la Curcumina, a su vez también es evidente la mejora de las funciones del grupo Placebo.

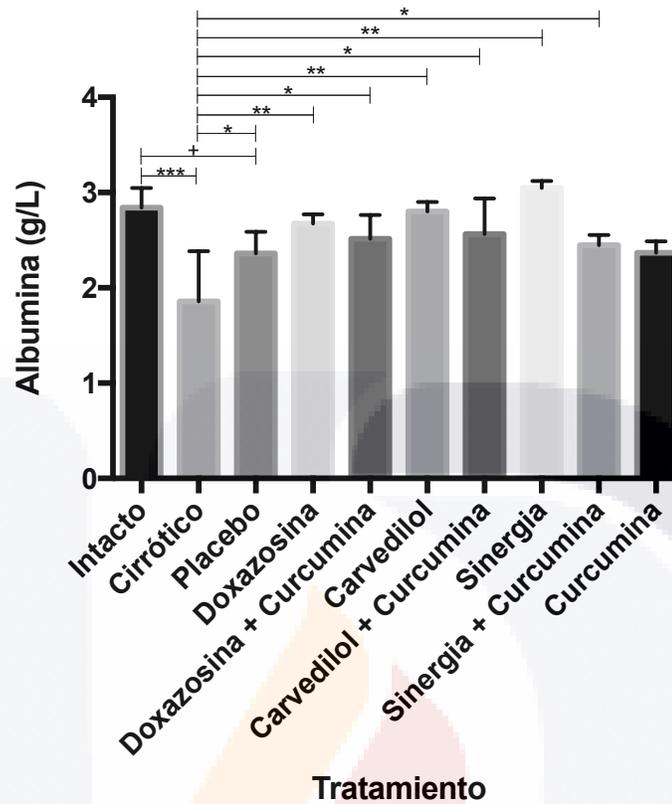


Gráfico 4: Evaluación de la concentración de albúmina en los diferentes tratamientos. Se observan una disminución de la concentración del grupo cirrótico contra los demás tratamientos, el grupo placebo aumento su concentración de albumina, no existen diferencias significativas de los tratamientos realizados contra el grupo placebo. El grupo Curcumina no mostró diferencias significativas contra el grupo cirrótico. Representación de las medias de cada grupo experimental (n=6, *: P<0.05, **: P<0.01,***: P<0.001).

9.1.3.4 Bilirrubina total.

Su análisis toma importancia en los niveles de degradación de la hemoglobina, niveles elevados de esta proteína son indicativos de una falla hepática, esplénica o del páncreas, ocasionando en primera instancia ictericia y daños toxicológicos por la presencia de sustancias de desecho almacenadas en los tejidos (Boveris *et al.*, 1983). Se puede observar, un aumento importante de la concentración en los grupos Cirrótico y Placebo en comparación con el grupo intacto. Por otra parte se observaron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos con Doxazosina, Carvedilol + Curcumina, Doxazosina + Carvedilol + Curcumina y Curcumina con el grupo Placebo (véase tabla 7 y gráfico 5). Se observó que los tratamientos con Doxazosina y las combinaciones de Carvedilol y sinergia con la Curcumina,

mostraron valores cercanos al grupo intacto, con una consecuente mejoría de las funciones hepáticas.

Tabla 8: Relación de las concentraciones de Bilirrubina Total.

Grupo	Concentración de Bilirrubina Total (mg/dl)
Intacto	0.3167 ± 0.1602
Cirrótico	0.8325 ± 0.1033
Placebo	0.8325 ± 0.2055
Doxazosina	0.4500 ± 0.1
Doxazosina + Curcumina	0.5400 ± 0.1817
Carvedilol	0.5000 ± 0.2
Carvedilol + Curcumina	0.4200 ± 0.1304
Sinergia	0.6000 ± 0.1
Sinergia + Curcumina	0.4000 ± 0.0707
Curcumina	0.3600 ± 0.0894

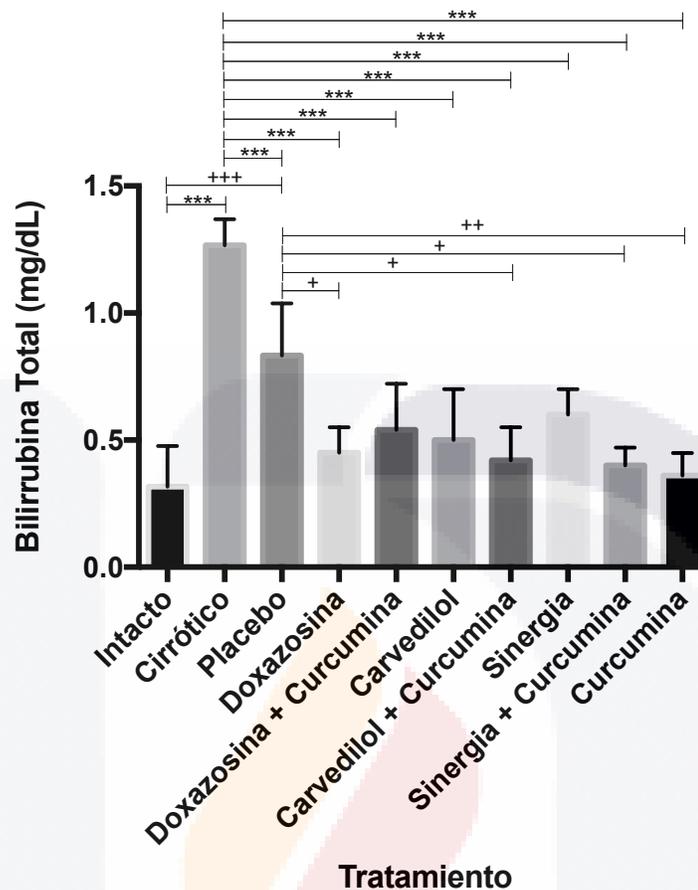


Gráfico 5: Evaluación de la concentración de Bilirrubina total en sangre. Se observa una elevada concentración de bilirrubina en los grupos cirrótico y placebo siendo la más remarcable la del grupo cirrótico que mostro una elevada diferencia significativa contra todos los demás tratamientos realizados. El grupo placebo mostró diferencias con varios tratamientos con una mayor diferencia contra el tratamiento con Curcumina sola. Representación de la media de cada tratamiento \pm desviación estándar. (+: Comparación contra grupo placebo, * comparación contra grupo cirrótico; n=6, * o +: $P < 0.05$, ** o ++: $P < 0.01$, *** o +++: $P < 0.001$).

9.1.3.5 Aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT).

Como parte de las pruebas de función hepática, se determinó la concentración de las enzimas AST y ALT, ya que son indicadores directos de daño hepático, debido a que ante un daño presente, son liberadas a torrente sanguíneo aumentando su concentración (Boveris *et al.*, 1983). La evaluación de los datos en la prueba de AST mostró una elevación de la concentración en el grupo cirrótico, el grupo Carvedilol arrojó las concentraciones más elevadas en comparación con los demás tratamientos, los cuales mostraron concentraciones cercanas al grupo intacto (véase tabla 8 y gráfico 6-A). Estos resultados sugieren un daño

hepático generado por el Carvedilol y por su metabolismo, a su vez, se mostró una mejoría de los tratamientos en la reducción de las concentraciones de esta enzima.

Tabla 9: Relación de las concentraciones de AST y ALT.

Grupo	Concentración de AST (U/L)	Concentración de ALT (U/L)	Relación AST/ALT
Intacto	92.60 ± 24.91	101.8 ± 24.17	0.9096
Cirrótico	237.0 ± 26.56	331.7 ± 12.58	0.7145
Placebo	191.5 ± 11.27	239.4 ± 47.38	0.7999
Doxazosina	125 ± 25.63	176.3 ± 6.429	0.7090
Doxazosina + Curcumina	109.3 ± 27.04	235.3 ± 89.5	0.4645
Carvedilol	367 ± 35.36	319 ± 16.97	1.15
Carvedilol + Curcumina	101.8 ± 31.22	152 ± 24.27	0.6697
Sinergia	120.3 ± 7.024	120.3 ± 7.024	1
Sinergia + Curcumina	103.6 ± 22.14	103.6 ± 22.14	1
Curcumina	97.5 ± 38.37	82.4 ± 11.41	1.18

En lo que respecta a la ALT las concentraciones observadas, mostraron una elevación en los grupos Cirrótico, Placebo, Doxazosina + Curcumina y Carvedilol en comparativa al grupo intacto, los mejores resultados se observaron en la Sinergia y su co-tratamiento con la Curcumina (véase tabla 8 y gráfico 6-B). Estos resultados dan pauta al mejoramiento de las funciones hepáticas en la disminución de los niveles gracias a la Curcumina involucrada.

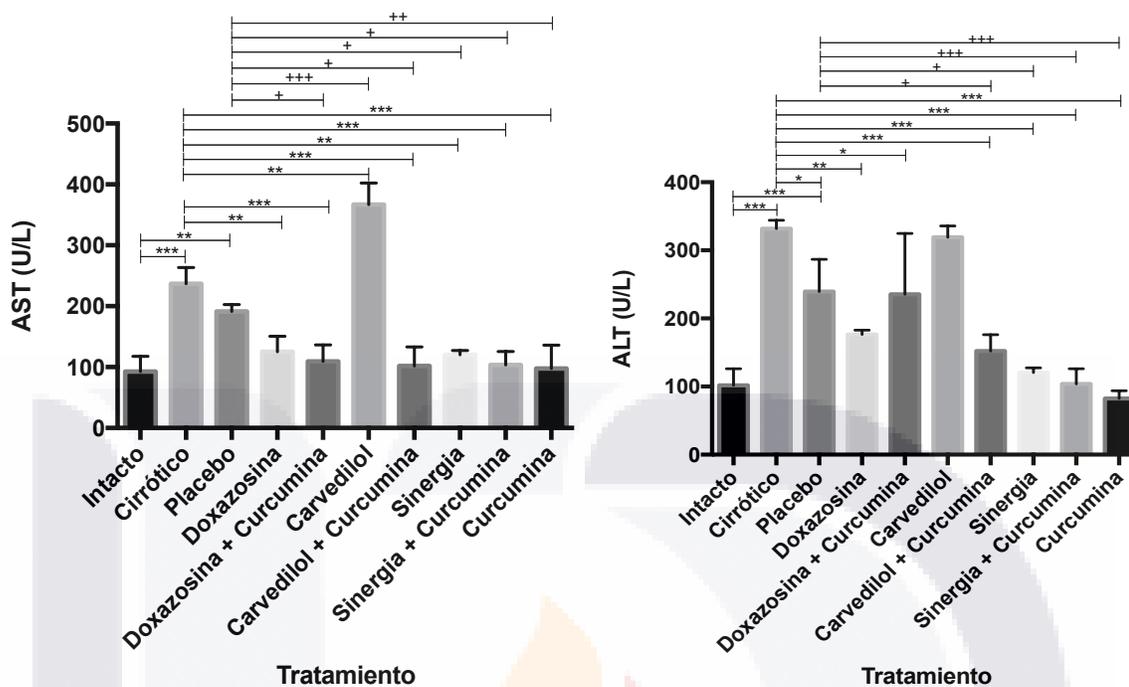


Gráfico 6 A-B: Evaluación de la concentración de enzimas hepáticas en suero (AST y ALT). A): concentración de AST en suero. Se observa, una disminución de los valores de AST con todos los tratamientos con respecto al grupo cirrótico y placebo, a excepción de Carvedilol, el cual presentó un incremento significativo de las concentraciones de AST . **B): concentración de ALT en suero.** Se observa de igual manera una disminución de los valores sericos de ALT, se muestra una elevación de la concentración en el grupo de Carvedilol. Representación de la media de cada tratamiento \pm desviación estándar. (+: Comparación contra grupo placebo, * comparación contra grupo cirrótico; n=6, * o +: P<0.05, ** o ++: P<0.01, *** o +++: P<0.001).

9.1.3.6 Fosfatasa alcalina.

Por último, se evaluó la fosfatasa alcalina, enzima presente ante alguna afección biliar. Los resultados mostraron concentraciones cercanas a las del grupo intacto en todos los tratamientos realizados con tendencias a incrementar este marcador en los grupos Cirrótico, Placebo y Carvedilol, sin ser estadísticamente significativas. Por otra parte, no fueron encontradas diferencias significativas entre los tratamientos, lo cual sugieren que no existe un daño directo de las vías biliares en el metabolismo ni del CCl₄ de los tratamientos (véase tabla 9 y gráfico 7).

Tabla 10: Relación de las concentraciones de Fosfatasa Alcalina.

Grupo	Concentración de Fosfatasa Alcalina (U/L)
Intacto	77.33 ± 4.96
Cirrótico	95.71 ± 2.36
Placebo	97.00 ± 48.66
Doxazosina	84.75 ± 8.539
Doxazosina + Curcumina	70.33 ± 10.84
Carvedilol	103.00 ± 7.071
Carvedilol + Curcumina	65.33 ± 10.01
Sinergia	86.25 ± 11.18
Sinergia + Curcumina	71.50 ± 31.07
Curcumina	67.67 ± 8.40

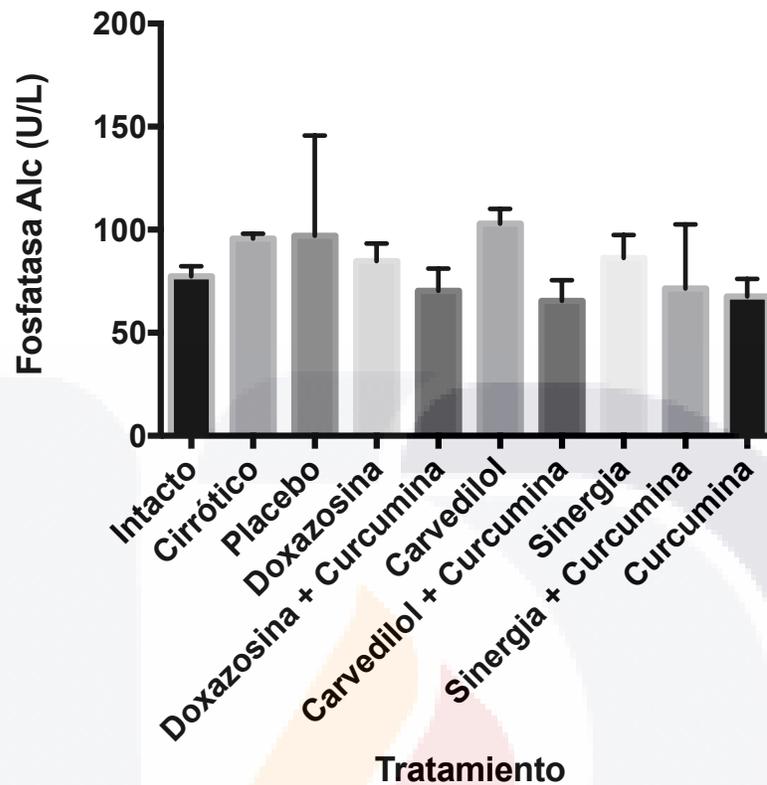


Gráfico 7: Evaluación de la concentración de fosfatasa alcalina en suero. En las concentraciones de fosfatasa alcalina no se observan diferencias estadísticamente significativas en los grupos tratados. Representación de la media de cada tratamiento \pm desviación estándar. (+: Comparación contra grupo placebo, * comparación contra grupo cirrótico; n=6, * o +: P<0.05, ** o ++: P<0.01, *** o +++: P<0.001).

9.1.4 Análisis Histológico y Alteraciones Morfológicas en el Tejido Hepático de los Grupos de Estudio.

El análisis histológico reveló diversos cambios estructurales en comparativa con el grupo intacto, este grupo mostró una correcta organización celular, se observó un citoplasma íntegro, sin ningún daño celular ni distorsión de la arquitectura del parénquima (figura 19a). La aplicación intraperitoneal de CCl₄ a los sujetos de estudio, provocó varias lesiones hepáticas por el metabolismo del mismo. El grupo cirrótico mostró una arquitectura celular dañada, representada por gran cantidad de hepatocitos con esteatosis macro y microvesicular (puntas de flecha negra) con células necróticas (asteriscos) y algunas apoptóticas (flechas negras) (figura 19b). El grupo placebo a su vez muestra, daño celular caracterizado por la edematización similar a lo observado en el grupo cirrótico, con núcleos con cariorexix (punta

de flecha) y cariolisis (asterisco), algo característico de este grupo es el engrosamiento de las placas de colágeno las cuales se encuentran en laminares y vasculares por todo el tejido hepático (flechas) (figura 19c). Los hígados de animales tratados con Doxazosina, mostraron adelgazamiento de las fibras de colágeno (cabezas de flecha), con presencia de daños celulares caracterizados por elevados núcleos picnóticos (flechas negras) y apoptosis celular (asteriscos) (figura 19d). Por su parte hígados de animales con tratamiento Doxazosina + Curcumina mostraron una recuperación del glucógeno presente en los hepatocitos (asteriscos), elevados núcleos picnóticos (puntas de flecha) y edema celular (flechas). No se observó un reacomodo de la arquitectura celular (figura 19e). Los hígados tratados con Carvedilol mostraron edema celular diseminado por el tejido (asteriscos), con mayor cantidad de núcleos picnóticos (puntas de flecha), y apoptosis celular (flechas) (figura 19f). Los hígados de animales con co-tratamiento de Carvedilol + Curcumina mostraron una mejoría en la coloración nuclear de los hepatocitos (puntas de flecha) con una recuperación de los gránulos de glucógeno (flechas) presentes en su citoplasma, con una disminución del edema celular (asteriscos) y mejoría en la arquitectura (figura 19g). La Sinergia caracterizada por Doxazosina y Carvedilol mostró elevado infiltrado inflamatorio (flechas) con algunos núcleos picnóticos (puntas de flecha), la arquitectura celular no estaba del todo recuperada (figura 19h). Una mejoría importante fue encontrada en los hígados de animales tratados con la Sinergia + Curcumina los cuales mostraron una recuperación de la arquitectura hepática muy cercana al grupo intacto con ciertas zonas con baja inflamación (línea punteada), también bajo edema (flechas) con una baja cantidad de colágeno (punta de flechas) (figura 19i). En última instancia, los hígados de animales tratados con Curcumina mostraron cambios importantes ya que se observamos que este compuesto contribuyó a disminuir los daños generados en el parénquima, el cual mostró una recuperación de la arquitectura hepática, así como de su estructura celular (figura 19j).

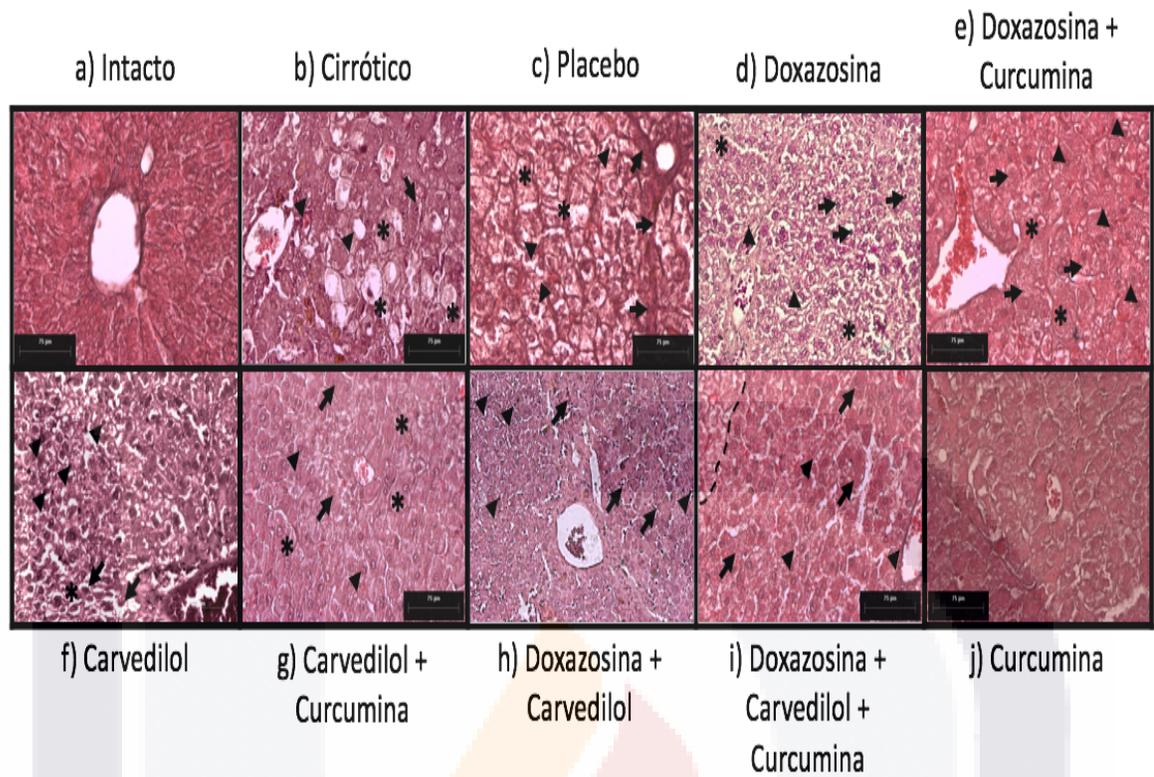


Figura 19: Estructura histológica de hígados cirróticos tratados con α/β adrenobloqueadores y Curcumina. Objetivo a 20x. a) Intacto. Arquitectura celular normal de hepatocitos, nula inflamación. **b) Cirrótico.** Daño celular con esteatosis (puntas de flecha negra), necrosis (asteriscos) y apoptosis celular (flechas negras), pérdida de la arquitectura celular. **c) Placebo.** Núcleos cariorréxicos (punta de flecha) y cariolíticos (asterisco) con elevadas placas de colágeno (flechas) entre células en comparación con grupo placebo, engrosamiento de los vasos sanguíneos con extensión hacia el parénquima, apoptosis generalizada. **d) Doxazosina.** Poca presencia de colágeno (cabezas de flecha), células con edema y picnósis (flechas negras) células necróticas con cariólisis (asteriscos). **e) Doxazosina + Curcumina.** Se observan gránulos de glucógeno comparado (asteriscos) con daño atenuado en el parénquima, se observan poco edema celular (flechas) y picnósis (puntas de flecha). **f) Carvedilol.** Elevado edema celular (asteriscos), con picnósis (puntas de flecha) y apoptosis celular (flechas). **g) Carvedilol + Curcumina.** Aumento de la tonalidad del parénquima en comparación al cirrótico (puntas de flecha), aumento de la presencia de glucógeno en comparación del grupo cirrótico (flechas), edema celular con núcleos marcados levemente (asteriscos). **h) Doxazosina + Carvedilol.** Se observa edema celular (flechas), presencia de núcleos picnóticos (puntas de flecha). **i) Doxazosina + Carvedilol + Curcumina.** Con áreas con edema celular (línea punteada) y recuperación de arquitectura celular (flechas). **j) Curcumina.** Parénquima con daños no observables con arquitectura cercana al intacto.

9.1.5 Evaluación De Colágeno Tipo I y III En Cirrosis Hepática En Hámsteres con Los Diferentes Tratamientos.

Las fibras de colágeno son parte importante de la matriz extracelular, y por ende del estroma hepático, proporcionan estabilidad y dan forma a los tejidos; ante una lesión hepática, el colágeno tipo I se verá producido fuera de su rango normal, provocando cirrosis hepática.

Mediante la microscopía de luz polarizada se observó que el grupo intacto (figura 20a) mostró colágeno en cantidades bajas y en forma puntual, como parte normal del tejido hepático (flechas amarillas). El grupo cirrótico arrojó grandes cantidades de colágeno de color rojo fluorescente en el grupo cirrótico (flechas en figura 20b) y el grupo placebo (flechas en figura 20c), mostró fibras engrosadas y con una mayor distribución a través del tejido hepático (flechas amarillas) sobretodo alrededor de las venas centrolobulillares y triadas portales. El tratamiento en el grupo Doxazosina (figura 20d) presentó un adelgazamiento importante de las fibras de colágeno y un aumento de la presencia del tipo III (flechas amarillas) contra el tipo I (flechas blancas). Doxazosina + Curcumina (figura 20e) mostró una diferencia y disminución en la cantidad de colágeno tipo I circundante en las venas porta (flechas amarillas), no fue observado colágeno tipo III. Por su parte el tratamiento de Carvedilol (figura 20f) mostró placas de colágeno distribuidas alrededor de las venas portales, con algunos septos de colágeno que formaban nódulos de regeneración con la presencia de colágeno tipo I (flechas amarillas) y tipo III (flechas blancas). Carvedilol + Curcumina (figura 20g) mostró un aumento en el grosor de las placas de colágeno tipo I (flechas amarillas) y III (flechas blancas) distribuidos por el tejido hepático formando nódulos de regeneración. Por último, la comparativa entre los grupos de Doxazosina + Carvedilol (figura 20h) y Doxazosina con Carvedilol y Curcumina (figura 20i), mostraron una disminución de la cantidad del colágeno tipo I (flechas amarillas) y tipo III (flechas blancas) con cantidades similares al grupo intacto. El tratamiento con Curcumina mostró reducciones de la cantidad de colágeno, aunque no tan evidente como la de los tratamientos conjuntos (figura 20j).

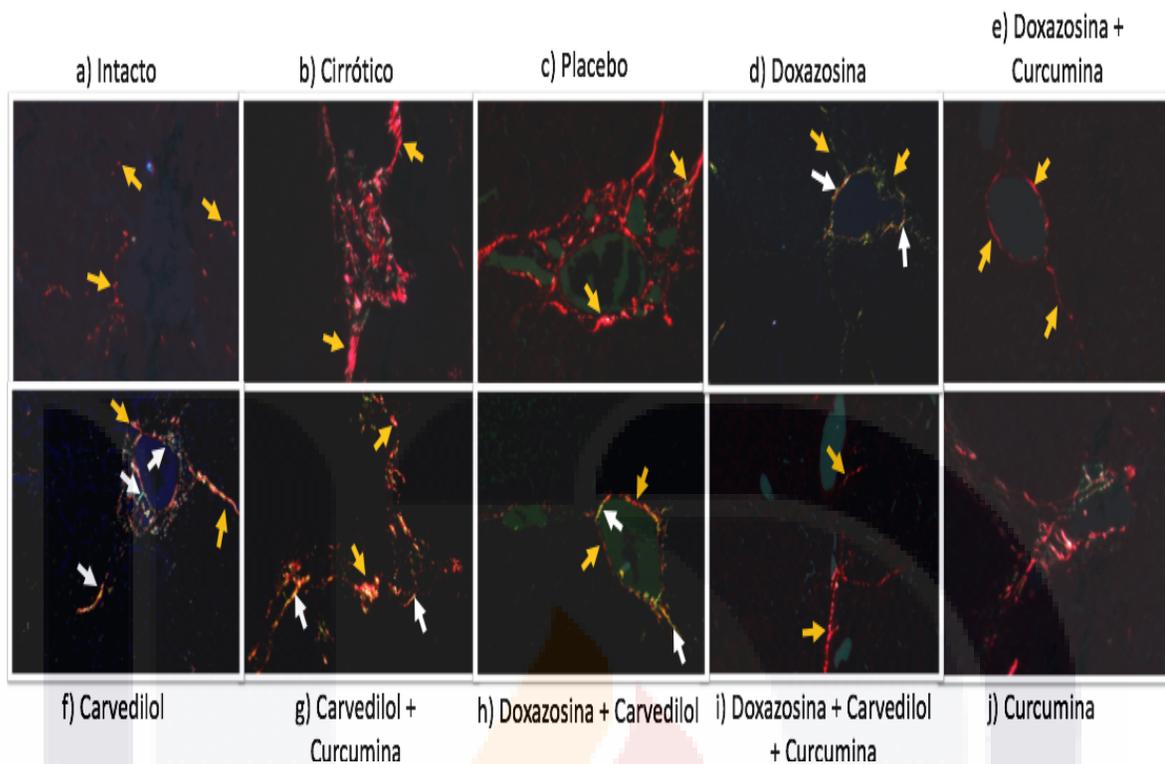


Figura 20: Estructura del colágeno tipo I y III en el estroma hepático, alrededor de vena porta y triadas portales. a) Intacto. Baja concentración de colágeno tipo I dispersa cercana a vena porta. **b) Cirrótico.** Mayor presencia de colágeno tipo III con cúmulos de colágeno de grosor pronunciado. **c) Placebo.** Elevada concentración de colágeno alrededor de la triada portal con septos que conducen a la formación de nódulos de regeneración. **d) Doxazosina.** Disminución de la concentración de colágeno tipo I y mayor presencia de colágeno tipo III. **e) Doxazosina + Curcumina.** Colágeno tipo I presente en vena porta con concentraciones cercanas al grupo intacto presencia de septos delgados. **f) Carvedilol.** Presencia aparentemente igual de colágeno tipo I y III alrededor de vena porta con poca cantidad. **g) Carvedilol + Curcumina.** Mayor presencia de colágenos tipo I y III alrededor de la triada portal, presencia de septos gruesos que delimitan acinos hepáticos con indicios de formación de nódulos de regeneración. **h) Doxazosina + Carvedilol.** Presencia de los colágenos tipo I y III alrededor de vena porta, con baja presencia alrededor del parénquima. **i) Doxazosina + Carvedilol + Curcumina.** Presencia principal de colágeno tipo I en baja cantidad con septos delgados que delimitan levemente a los acinos hepáticos. **j) Curcumina.** Existe una mayor cantidad de colágeno tipo I en la triada portal con septos en conjuntos con bajo grosor.

9.1.6 Análisis estadístico de la Concentración de Colágeno en Tejidos Cirróticos y en tejidos con los Diferentes Tratamientos.

El área total de estudio en el análisis morfométrico realizado mostró una cantidad de $148279.76\mu\text{m}^2$ (100%), el cual se utilizó como denominador para obtener los porcentajes de los colágenos medidos. El cálculo se realizó bajo la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Área del colágeno medido en muestras}}{\text{Cantidad total del campo de visión}} \times 100$$

Tabla 11: Relación de las áreas medidas de colágeno y porcentaje de colágeno medido.

Grupo	Área Medida de Colágeno (μm^2)	Porcentaje de Colágeno (%)
Intacto	1866.9 ± 0.5867	1.259
Cirrótico	5672.7 ± 0.2235	4.4
Placebo	8202.4 ± 0.6936	5.532
Doxazosina	1581 ± 1.278	3.7
Doxazosina + Curcumina	1600.7 ± 0.7703	1.08
Carvedilol	7255 ± 1.074	4.9
Carvedilol + Curcumina	2332.6 ± 0.6831	1.5
Sinergia	3776.9 ± 0.2228	2.54
Sinergia + Curcumina	11684.6 ± 1.042	1.13
Curcumina	5427 ± 1.179	3.66

Los porcentajes obtenidos bajo el análisis mostraron un porcentaje elevado en los grupos Cirrótico y Placebo, los grupos con α/β adrenobloqueadores aunque mostraron una disminución del porcentaje no fue cercana al grupo intacto con excepción de la sinergia de los fármacos, en cambio, en los tratamientos en donde fue utilizada la Curcumina, el porcentaje de colágeno fue muy cercano a los niveles del grupo intacto. Estos resultados demuestran una reducción importante de los niveles de colágeno por los fármacos en co-tratamiento con la Curcumina. (véase tabla 10 y gráfico 8).

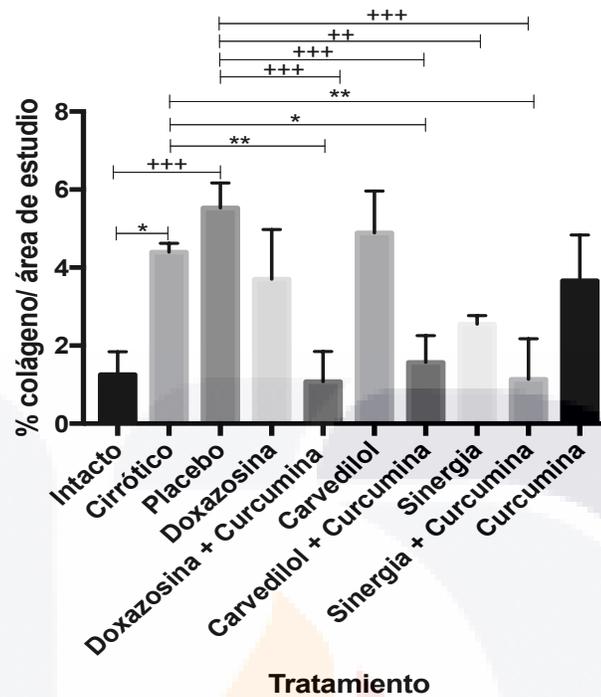


Gráfico 8: Porcentaje del colágeno medido sobre área de estudio. Se observan diferencias significativas importantes del grupo Cirrótico contra Doxazosina + Curcumina, Carvedilol + Curcumina y Sinergia + Curcumina. Grupo Placebo mostró diferencias significativas contra grupos con porcentajes cercanos al grupo intacto Doxazosina + Curcumina, Carvedilol + Curcumina, Sinergia, Sinergia + Curcumina (+: comparación contra grupo placebo, * comparación contra grupo cirrótico; n=6, * o +: P<0.05, ** o ++: P<0.01, *** o +++: P<0.001).

9.1.7 Evaluación del Nivel de Expresión de los Factores de Transcripción Anti-oxidante (Nrf2) y Pro-inflamatorio (NFκB).

9.1.7.1 NFκB.

Parte importante de este trabajo constó en la evaluación del factor de transcripción NFκB, familia de proteínas implicadas a la respuesta del estrés oxidativo y toxicidad, un aumento en los niveles de transcripción de este factor es indicativo de daño celular y de activación de citocinas pro-inflamatorias. Las evaluaciones de las concentraciones relativas mostraron concentraciones bajas con niveles cercanos al intacto para todos los grupos tratados a excepción del grupo Cirrótico (véase tabla 11 y gráfico 9). Cabe mencionar que los niveles

de expresión en los tratamientos con α/β adrenobloqueadores, mostraron cantidades un poco más elevadas que los co-tratamientos con la Curcumina.

Tabla 12: Relación de los niveles de expresión del factor de transcripción NF κ B.

Grupo	Nivel de Expresión Relativa (NF κ B/Actina)
Intacto	1.720 \pm 1.241
Cirrótico	18.28 \pm 8.461
Placebo	2.666 \pm 1.058
Doxazosina	4.089 \pm 1.492
Doxazosina + Curcumina	1.879 \pm 0.4812
Carvedilol	1.770 \pm 1.825
Carvedilol + Curcumina	1.274 \pm 0.8751
Sinergia	1.737 \pm 0.9244
Sinergia + Curcumina	0.9472 \pm 0.6928
Curcumina	4.178 \pm 1.471

Estos resultados indican que los tratamientos en donde fue involucrada la Curcumina potenciaron la disminución de la expresión del factor de transcripción ayudando a atenuar el daño generado por los fármacos y por el CCl₄.

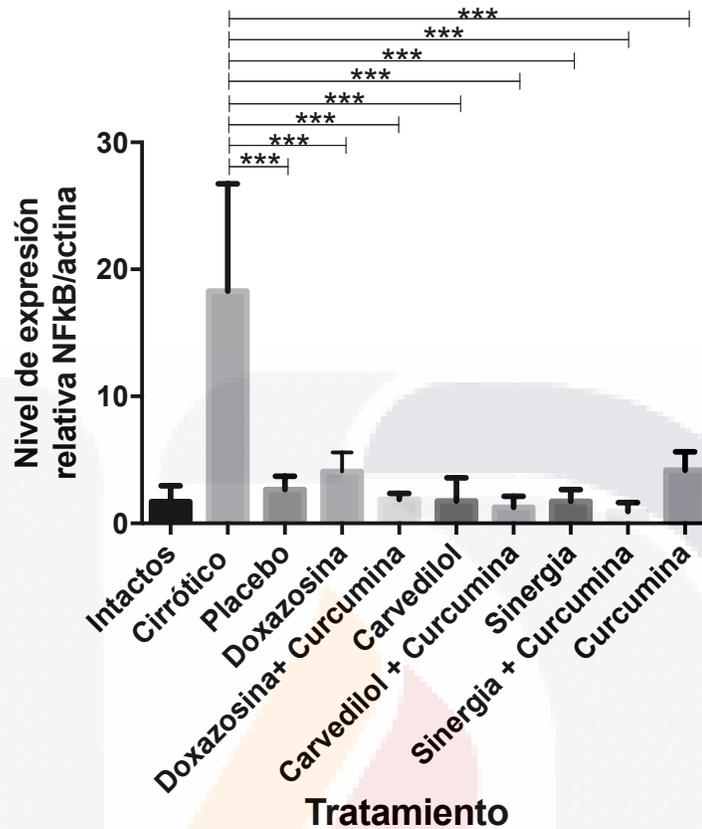


Gráfico 9: Evaluación de la expresión del factor de transcripción NFκB en tejidos hepáticos. Se observan diferencias significativas del grupo Cirrótico con los demás tratamientos involucrados en el estudio. El grupo Curcumina y Doxazosina aunque en mucho menor concentración mostraron una elevación en la concentración. Representación de la media de cada tratamiento ± desviación estándar. (+: Comparación contra grupo placebo, * comparación contra grupo cirrótico; n=6, * o +: P<0.05, ** o ++: P<0.01, *** o +++: P<0.001).

9.1.7.2 Nrf-2.

El factor de transcripción Nrf2 es una de las principales contrapartes del factor NFκB, Nrf2 al translocarse al núcleo desencadena la síntesis de enzimas y compuestos antioxidantes, niveles elevados de este factor indican una protección del parénquima hepático así como la disminución del estrés oxidativo. Los resultados arrojaron niveles de expresión elevados para Doxazosina y Curcumina sola, y niveles más cercanos a los intactos de los demás grupos tratados. Por su parte el grupo placebo mostro diferencias contra el tratamiento con Curcumina. Por tanto, existe una elevación de la expresión de Nrf-2 bajo los tratamientos con Doxazosina y Curcumina por su parte cada uno lo que sugiere una mayor protección al parénquima causado por la Curcumina (véase tabla 12 y Gráfico 10).

Tabla 13: Relación de los niveles de expresión de factor de transcripción Nrf2.

Grupo	Nivel de Expresión Relativa (Nrf2/Actina)
Intacto	0.4904 ± 0.3797
Cirrótico	0.9499 ± 0.2857
Placebo	3.862 ± 0.5337
Doxazosina	6.363 ± 2.615
Doxazosina + Curcumina	3.090 ± 1.167
Carvedilol	1.871 ± 0.528
Carvedilol + Curcumina	1.340 ± 0.4123
Sinergia	0.9419 ± 0.2251
Sinergia + Curcumina	1.126 ± 0.3244
Curcumina	7.190 ± 2.63

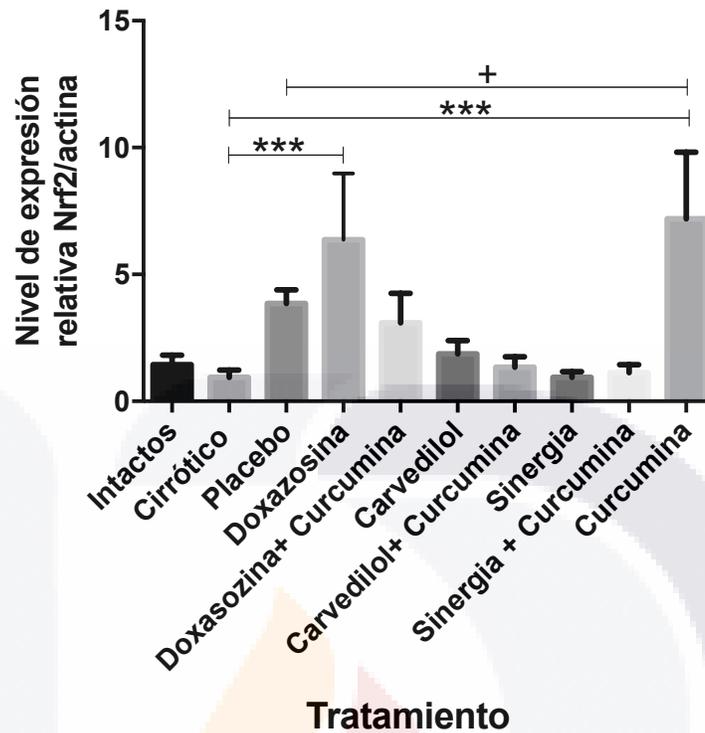


Gráfico 10: Evaluación del Factor de Transcripción Nrf-2 en muestras hepáticas. Se observa un aumento de la concentración en primera instancia por el grupo Curcumina, seguido de Doxazosina y al final el grupo Placebo. Se encontraron diferencias significativas del grupo Cirrótico con los grupos Doxazosina y Curcumina. El grupo placebo mostro diferencia solo con el grupo Curcumina. Representación de la media de cada tratamiento \pm desviación estándar. (+: Comparación contra grupo placebo, * comparación contra grupo cirrótico; n=6, * o +: $P < 0.05$, ** o ++: $P < 0.01$, *** o +++: $P < 0.001$).

9.1.7.3 Cociente del nivel de expresión de Nrf2-NFκB en el proceso inflamatorio.

El cociente de los niveles de expresión de Nrf2/NFκB se calculó para obtener una aproximación más cercana de la relación entre estos dos factores en el proceso de daño hepático y al atenuamiento debido al efecto anti inflamatorio contra pro inflamatorio. Resultados menores indican un aumento en la expresión de NFκB sobre Nrf2, mientras que resultados mayores lo contrario. Los resultados obtenidos mostraron una elevación de la relación en los grupos Intacto, Doxazosina, Carvedilol + Curcumina y Sinergia + Curcumina y aunque no se encontraron diferencias significativas en este estudio se observa una expresión mayor de NFκB en relación a Nrf2, indicando una mayor actividad pro inflamatoria, que anti inflamatoria (véase tabla 13 y gráfico 11).

Tabla 14: Relación de los cocientes entre Nrf2/ NFκB.

Grupo	Cociente de Expresión (Nrf2/NFκB)
Intacto	1.757 ± 1.479
Cirrótico	0.047 ± 0.0415
Placebo	1.878 ± 0.6773
Doxazosina	0.9439 ± 2.423
Doxazosina + Curcumina	0.9752 ± 0.5128
Carvedilol	1.688 ± 1.132
Carvedilol + Curcumina	0.4768 ± 1.946
Sinergia	1.315 ± 0.235
Sinergia + Curcumina	0.5497 ± 1.151
Curcumina	0.7902 ± 0.5539

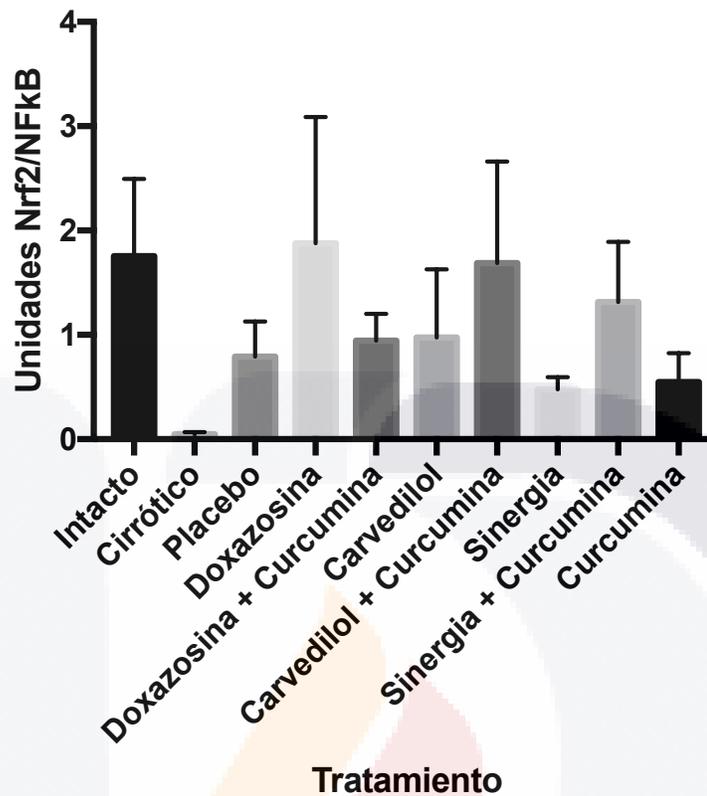


Gráfico 11: Evaluación del cociente entre Nrf-2 y NFκB en muestras hepáticas. Se observa un aumento del cociente en los grupos Doxazosina, Carvedilol + Curcumina, y Sinergia + Curcumina. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en este estudio. Representación de la media de cada tratamiento ± desviación estándar. (+: Comparación contra grupo placebo, * comparación contra grupo cirrótico; n=6, * o +: P<0.05, ** o ++: P<0.01, *** o +++: P<0.001).

9.1.8 Evaluación de la peroxidación lipídica en los diferentes tratamientos a través de la detección del 4-hydroxinonenal (4-HNE)

El 4-HNE es un producto derivado de la peroxidación lipídica en las membranas microsomales hepáticas, estas dan pauta a varias afecciones que pueden desencadenar un proceso inflamatorio crónico (Benedetti *et al.*, 1980). Los resultados obtenidos mediante Dot-blot denotaron la presencia de este compuesto en los grupos tratados de manera importante (figura 21), el análisis se realizó morfométricamente calculando cociente de la intensidad de color en las membranas de 4-HNE/Actina (véase tabla 14 y gráfico 12). Los resultados arrojaron cantidades elevadas para los grupos Placebo, Doxazosina, Doxazosina + Curcumina, Sinergia, Sinergia + Curcumina y Curcumina, aunque no fueron encontradas

diferencias estadísticamente significativas, existe presencia de este aldehído en los grupos tratados con los α/β adrenobloqueadores y sus co-tratamientos con Curcumina.

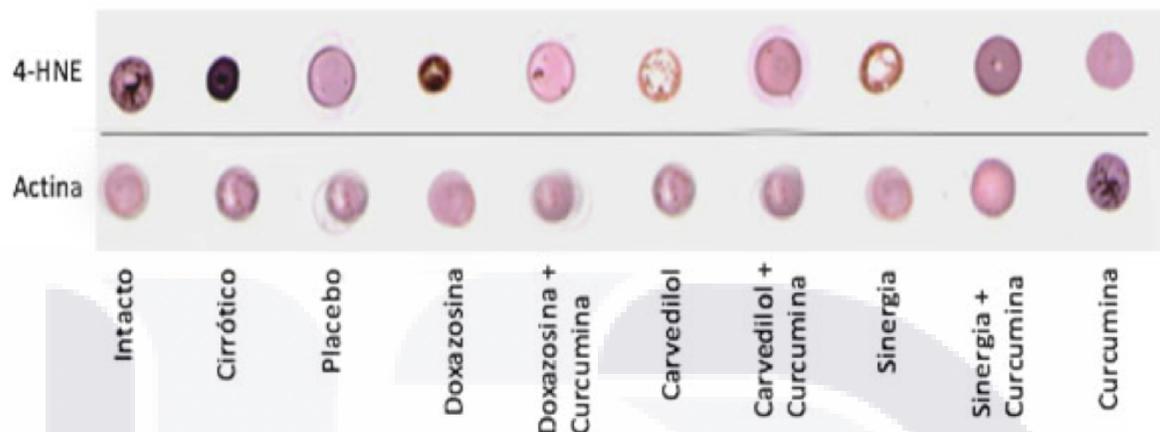


Figura 21: Identificación de 4-hidroxinonenal (4-HNE) mediante Dot-blot. Las proteínas presentes en los tejidos hepáticos mostraron reacción positiva ante el anticuerpo Anti-4 Hidroxinonenal y Anti- β -Actina como control endógeno, siendo las de mayor reacción el grupo Cirrótico con tonalidades fuertes en los tratamientos con Doxazosina Carvedilol y su Sinergia. Los tratamientos con Curcumina mostraron tonalidades más suaves.

Tabla 15: Relación de los cocientes entre 4-HNE/Actina.

Grupo	Cociente de Expresión (4-HNE/Actina)
Intacto	1.198 ± 0.474
Cirrótico	0.8053 ± 0.1534
Placebo	1.783 ± 0.8277
Doxazosina	1.916 ± 0.9192
Doxazosina + Curcumina	1.649 ± 1.084
Carvedilol	1.269 ± 0.4239
Carvedilol + Curcumina	1.114 ± 0.2841
Sinergia	1.726 ± 1.293
Sinergia + Curcumina	1.546 ± 1.053
Curcumina	1.662 ± 1.403

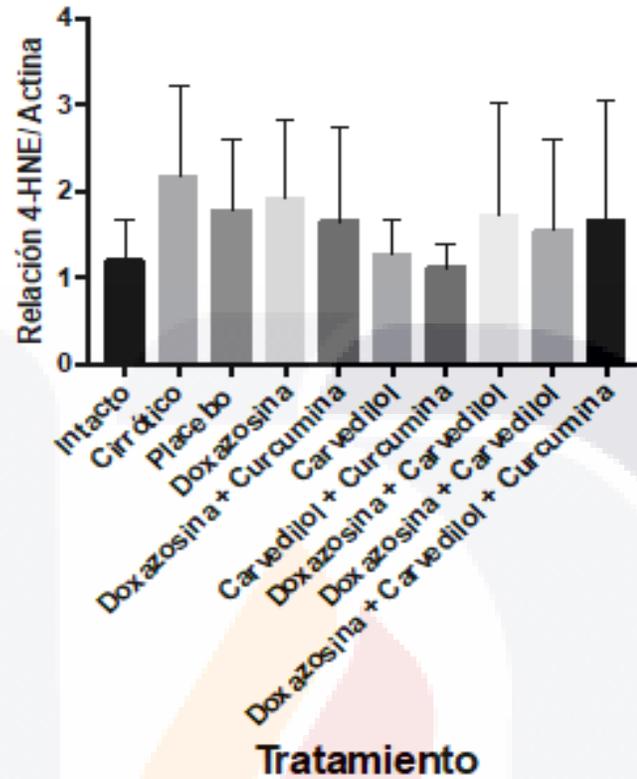


Gráfico 12: Evaluación morfométrica de la presencia de 4-HNE, en grupos tratados. Grupos Placebo, Doxazosina, Doxazosina + Curcumina, Sinergia, Sinergia + Curcumina y Curcumina arrojaron mayor presencia de 4-HNE que los demás grupos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en este estudio. Representación de la media de cada tratamiento ± desviación estándar. (+: Comparación contra grupo placebo, * comparación contra grupo cirrótico; n=6, * o +: P<0.05, ** o ++: P<0.01, *** o +++: P<0.001).

9.2 Hámsteres SHAM, tratados con Petrolato para evaluar la Toxicidad de los α/β Adrenobloqueadores en Conjunto con la Curcumina.

9.2.1 Descripción Macroscópica De La Arquitectura Hepática, Cambios Físicos Del Hígado Bajo Tratamientos Del Hámster.

Transcurridas las 19 semanas de inducción de petrolato, los hígados mostraron un brillo característico y tacto aceitoso correspondiente a la elevada cantidad de petrolato presente en los organismos. No se encontraron características semejantes a las del grupo Cirrótico (Figura 22).

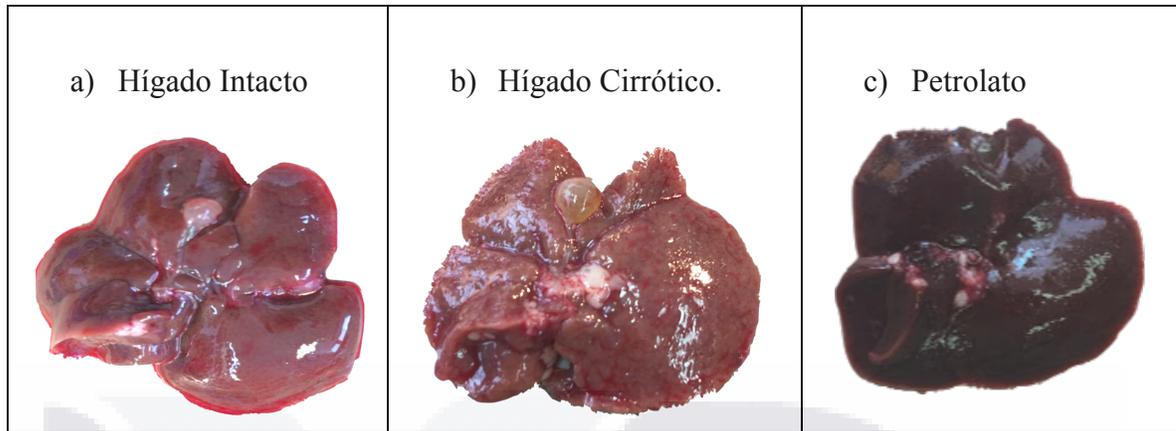


Figura 22 A-C: Estructura morfológica macroscópica de hígado cirrótico, intacto y SHAM de hámster.

a) se observa el hígado intacto con coloraciones uniformes en toda la estructura, se observa un relieve lizo completamente. b) hígado cirrótico, se observa a simple vista un aumento de tamaño del órgano, con nódulos de regeneración, y tonos rosáceos pálidos en ellas. c) hígado tratado con petrolato, se aprecia brillo aumentado por la cantidad de petrolato que recubre al hígado, con estructura y arquitectura semejante al intacto.

9.2.2 Pruebas de Función Hepática.

Parte de la evaluación del efecto del tratamiento en los hígados inducidos con petrolato consistió en pruebas serológicas de función hepática en las cuales, se cuantificaron Proteínas Totales, Albúmina, Bilirrubina total, Fosfatasa Alcalina, y Transaminasas Hepáticas ALT y AST, en donde los datos arrojados no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos en los sujetos de estudio (véase tabla 3 y gráfico 13).

Tabla 16: Resultados de la estadística de las pruebas de función hepática, No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

Tratamiento	Proteínas Totales (g/dl)	Albúmina (g/l)	Bilirrubina Total (mg/dl)	Fosfatasa Alcalina (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)
Intacto	5.550 ± 0.0707	2.450 ± 0.0707	0.1 ± 0	66 ± 7.071	54 ± 1.414	68 ± 8.485
SHAM + Placebo	5.600 ± 0.2646	2.433 ± 0.0577	0.1 ± 0	75.50 ± 14.85	54 ± 15.13	67 ± 17.78
SHAM + Doxazosina + Carvedilol + Curcumina	5.400 ± 0.1	2.333 ± 0.2082	0.1 ± 0	72.50 ± 16.26	54.67 ± 11.5	90.00 ± 26.87
SHAM + Doxazosina + Curcumina	5.233 ± 0.3512	2.333 ± 0.0577	0.1 ± 0	69.33 ± 2.082	40.67 ± 5.508	65.33 ± 10.02
SHAM + Carvedilol + Curcumina	5.500 ± 0.3	2.433 ± 0.1528	0.1 ± 0	61.67 ± 8.021	95.50 ± 23.33	69.50 ± 2.921
SHAM + Curcumina	5.067 ± 0.2309	2.167 ± 0.2082	0.1 ± 0	67 ± 0	48.67 ± 9.713	57.67 ± 24.83

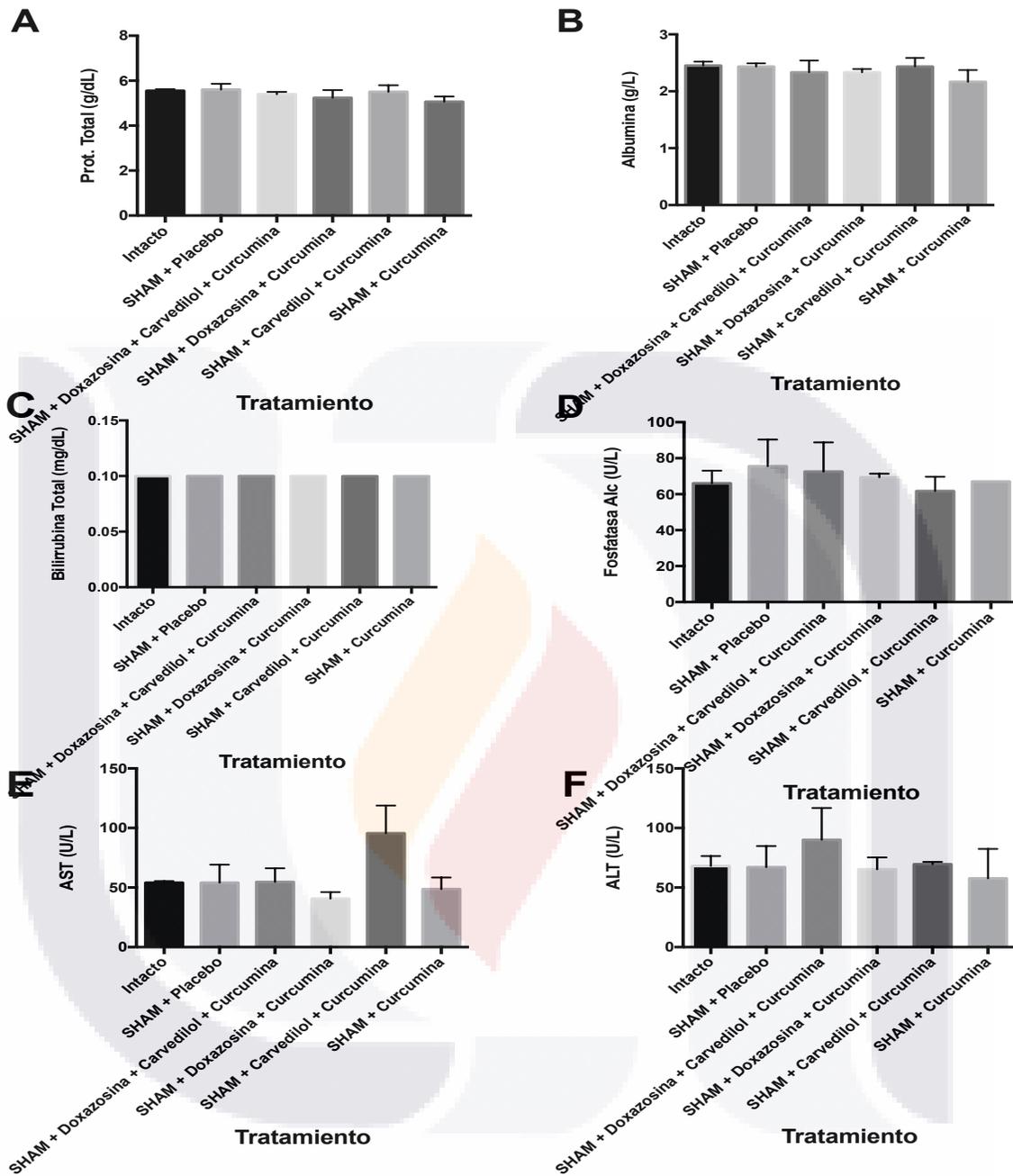


Gráfico 13: Evaluación de pruebas de funcionamiento hepático en suero, A) Proteína Total Todos los tratamientos poseen concentraciones iguales a las del grupo intacto. **B) Albúmina.** Ninguna de las mediciones señaladas fue diferente estadísticamente con el control. **C) Bilirrubina total.** Ninguna de las mediciones señaladas fue diferente estadísticamente con el control. **D) Fosfatasa Alcalina.** Ninguna de las mediciones señaladas fue diferente estadísticamente con el control. **E) AST.** Ninguna de las mediciones señaladas fue diferente estadísticamente con el control **F) ALT.** Ninguna de las mediciones señaladas fue diferente estadísticamente con el control. Representación de la media de cada tratamiento ± desviación estándar. (+: Comparación contra grupo placebo, * comparación contra grupo cirrótico; n=3, * o +: P<0.05, ** o ++: P<0.01, *** o +++: P<0.001).

9.2.3 Análisis Histológico Morfológico en Hámsteres Inducidos con Petrolato.

La aplicación intraperitoneal de petrolato durante las 19 semanas y los tratamientos administrados mostraron cambios importantes en la arquitectura celular: los hígados tratados con Doxazosina, mostraron presencia de núcleos picnóticos (flechas), con ciertas zona de edematización celular (línea punteada) (figura 23d). El tratamiento con Doxazosina + Curcumina (figura 23e) mostró también núcleos picnóticos, lo que da indicios de apoptosis celular (flechas). El tratamiento con Carvedilol (figura 23f) arrojó también elevados núcleos picnóticos disgregados por el tejido (flechas). Los hígados tratados con la sinergia de Doxazosina + Carvedilol (Figura 23h) arrojaron tejidos con elevada edematización celular (flechas) y núcleos aumentados de tamaño (puntas de flecha). Los tejidos pertenecientes a los tratamientos de Control Vehículo (figura 23b), Placebo (figura 23c), Carvedilol + Curcumina (figura 23g), Doxazosina + Carvedilol + Curcumina (figura 23i) y Curcumina (figura 23j), mostraron una arquitectura y una apariencia celular muy similar a la del grupo intacto.

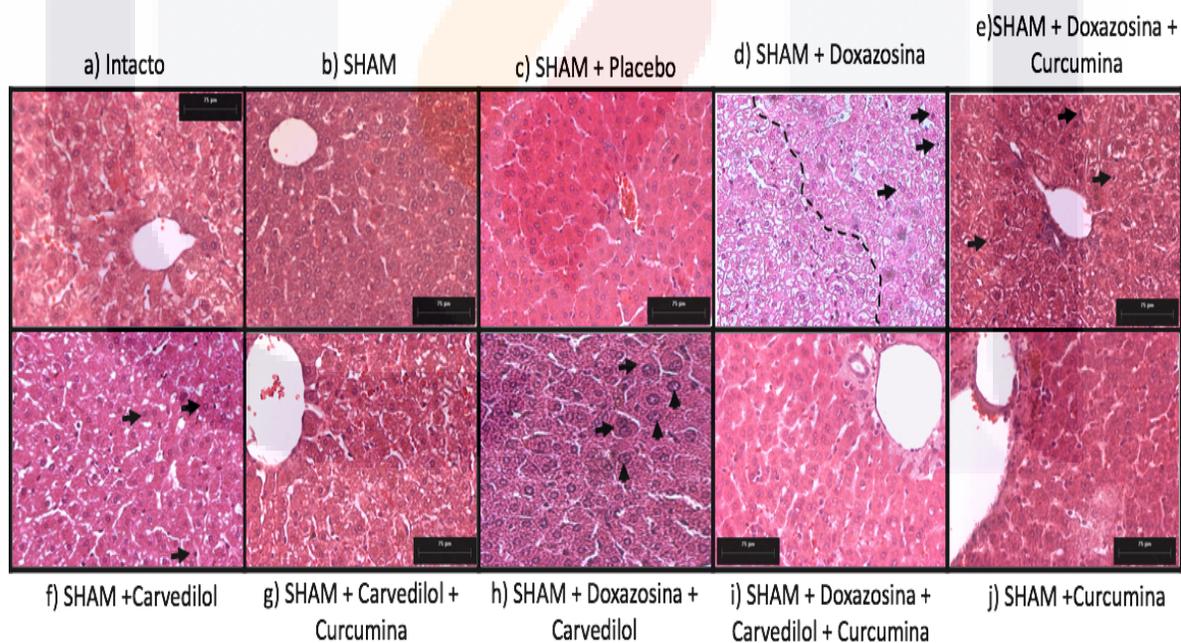


Figura 23: Estructura histológica de hígados inducidos con petrolato tratados con α/β adrenobloqueadores y Curcumina. a) Intacto. Arquitectura celular correcta, nula inflamación correcta coloración por flujo de sangre. **b) SHAM.** No se observan cambios en relación el grupo intacto. **c) SHAM + Placebo.** Se observa una arquitectura hepática normal dispuesta hacia la vena central, no se observan daños celulares. **d) SHAM + Doxazosina.** Edematización (línea punteada y núcleos picnóticos (flechas) l. **e) SHAM + Doxazosina + Curcumina.** Se observa poca inflamación celular sin arquitectura del parénquima dañada. **f) SHAM + Carvedilol.** Núcleos picnóticos por el tejido (flechas). **g) SHAM + Carvedilol + Curcumina.**

Arquitectura celular correcta, sin cambios aparentes. **h) SHAM + Doxazosina + Carvedilol.** Edematización celular (flechas) y aumento del tamaño de núcleos (puntas de flecha). **i) SHAM + Doxazosina + Carvedilol + Curcumina.** No se observan cambios importantes, arquitectura celular similar a grupo intacto. **j) SHAM + Curcumina.** Se observa una arquitectura muy similar al grupo intacto, no se detectan cambios morfológicos.

9.2.4 Evaluación de colágeno tipo I en cirrosis hepática en hámsteres y en los diferentes tratamientos.

Los hígados con petrolato observados bajo luz polarizada, mostraron cantidades de colágeno menores en comparación a la inducción con CCl₄. El grupo intacto (figura 24a) mostró colágeno tipo I alrededor de las venas portales (flechas amarillas) y bajas concentraciones tipo III (flechas blancas). El grupo Control Vehículo y Placebo arrojaron concentraciones bajas de colágeno tipo I (flechas amarillas) y III en mayor presencia (flechas blancas, figuras 24 b y c). Los tratamientos con Doxazosina y el co-tratamiento con Curcumina mostraron placas delgadas de colágeno tipo I alrededor de las venas portales (flechas amarillas) (figura 24d) y diseminaciones puntuales alrededor de las mismas (flechas blancas) (figura 24e). Carvedilol y Carvedilol + Curcumina mostraron concentraciones bajas de colágeno tipo I (flechas amarillas) con un aumento de la presencia de colágeno tipo III (flechas blancas) alrededor de las venas portales (figura 24f) y tipo I en la triada portal (flechas amarillas) (Figura 24g). Los tratamientos de la Sinergia y su co-tratamiento con la Curcumina mostraron concentraciones bajas de colágeno siendo predominante el colágeno tipo III (flechas blancas) en el tratamiento sin Curcumina, en cambio, la Sinergia con la Curcumina mostró mayor presencia de colágeno tipo I (flechas amarillas) (figura 24i). Por último el tratamiento con Curcumina mostró concentraciones bajas de colágeno tipo III (flechas amarillas) alrededor de las venas porta de los tejidos (figura 24j).

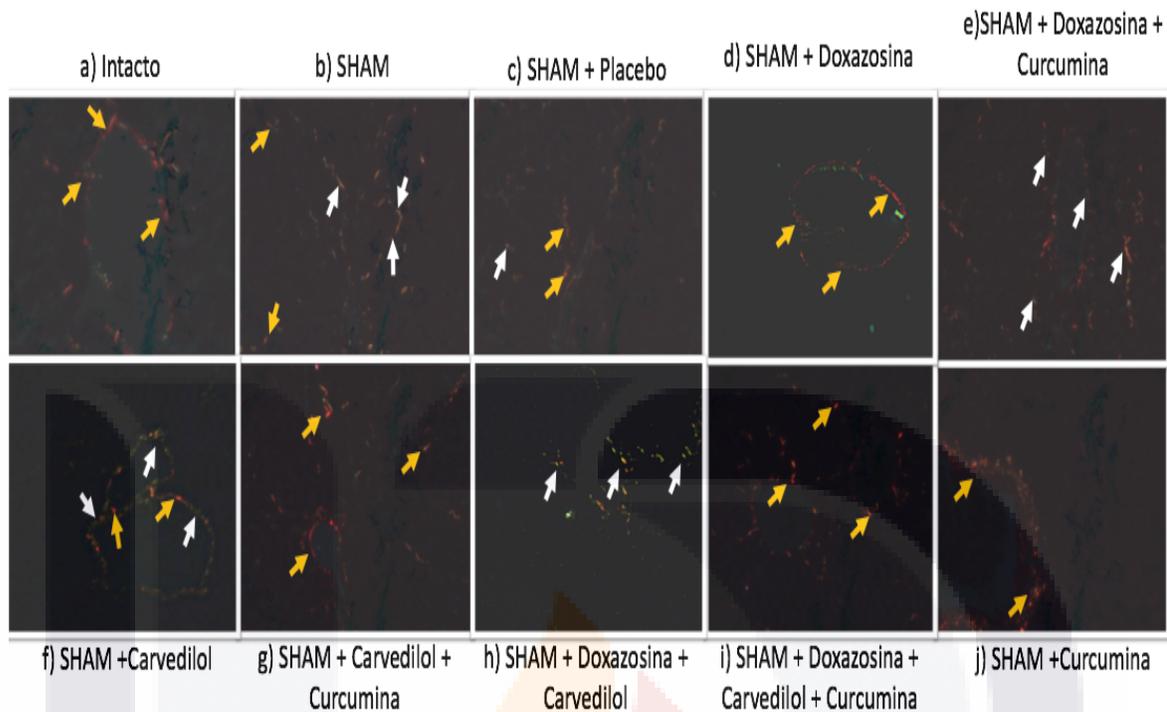


Figura 24: Estructura del colágeno tipo I y III alrededor de los tejidos hepáticos, vena porta y triadas portales. a) Intacto. Se observa colágeno tipo I casi nulo en forma puntual cercano a la triada portal. **b) SHAM.** Se observa colágeno muy parecido a la estructura del intacto con mayor concentración de colágeno tipo III. **c) SHAM + Placebo.** Concentración de colágeno casi nula levemente concentrada alrededor de la triada portal. **d) SHAM + Doxazosina.** Concentración de colágeno delimitada hacia la zona de la triada portal de manera puntual. **e) SHAM + Doxazosina + Curcumina.** Aumento de las concentraciones de los dos tipos de colágeno distribuidos en septos de grosor bajo. **f) SHAM + Carvedilol.** Concentración de colágeno tipo I cercanas a la triada portal, de grosor bajos con septos que forman los acinos hepáticos. **g) SHAM + Carvedilol + Curcumina** Mayor concentración de colágeno tipo I que tipo III, con muy poca concentración en la zona cercana a la triada portal. **h) SHAM + Doxazosina + Carvedilol.** Presencia de colágenos tipo I y III cerca de las triadas portales. **i) SHAM + Doxazosina + Carvedilol + Curcumina.** Zonas punteadas de colágeno cercanas a las triadas portales y venas centrolobulillares. **j) SHAM + Curcumina.** Colágeno tipo I sólo en venas centrolobulillares sin diseminación alguna.

9.2.5 Evaluación Estadística de la Concentración de Colágeno en Tejidos Cirróticos en Hámsteres y bajo Diferentes Tratamientos.

De la misma manera que con los grupos inducidos con tetracloruro de carbono se realizó la medición del área de colágeno en los tejidos de los grupos inducidos con petrolato y el cálculo de los porcentajes de colágeno presente. El área total de estudio en el análisis morfométrico realizado mostró una cantidad de $148279.76\mu\text{m}^2$ (100%). El cálculo del porcentaje de colágenos tipo I y III arrojó áreas menores a las del grupo intacto en todos los grupos tratados siendo los menores Carvedilol + Curcumina Sinergia + Curcumina y Doxazosina +

Curcumina, demostrando así el efecto antifibrótico de los α/β adrenobloqueadores en las CEH en su papel de disminuir los niveles de colágeno (véase tabla 15 y gráfico 14)

Tabla 17: Relación de las áreas medidas de colágeno y porcentaje de colágeno medido. Hámsteres inducidos con petrolato.

Grupo	Área Medida de Colágeno (μm^2)	Porcentaje de Colágeno (%)
Intacto	953.1 \pm 0.0339	0.64
SHAM	547.4 \pm 0.0275	0.3692
SHAM + Placebo	774.1 \pm 0.0145	0.5221
SHAM + Doxazosina + Curcumina	741.3 \pm 0.0244	0.499
SHAM + Carvedilol + Curcumina	327.4 \pm 0.1093	0.2208
SHAM + Sinergia + Curcumina	655.3 \pm 0.0141	0.5605
SHAM+ Curcumina	831.1 \pm 0.0121	0.5605

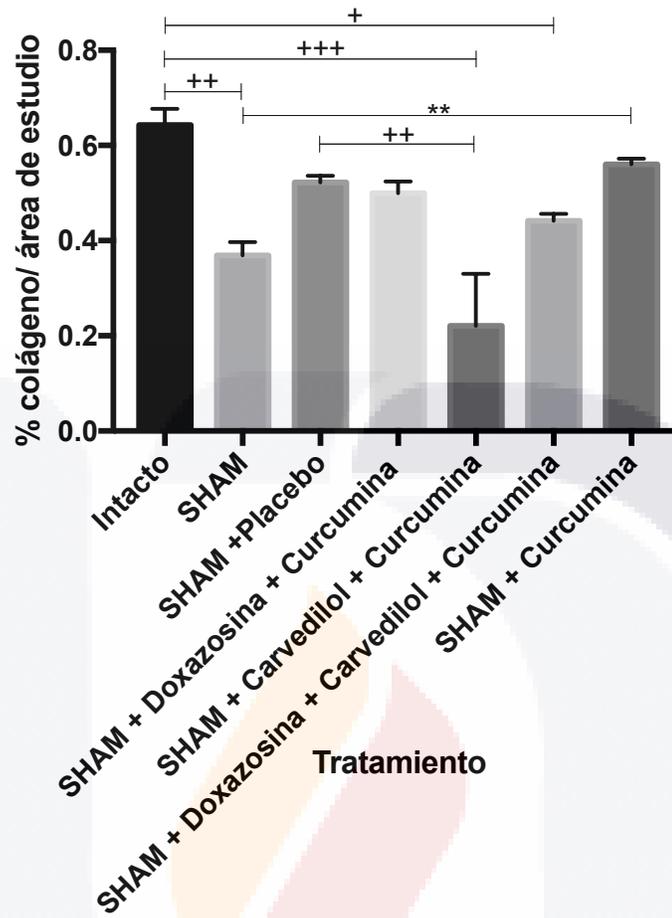


Gráfico 14: Evaluación del colágeno tipo I y III en tejidos hepáticos inducidos con petrolato. Existe una disminución general de colágeno de todos los tratamientos, con respecto al intacto, el grupo Control Vehículo tiene diferencias significativas contra el grupo Intacto, grupo Placebo, Doxazosina + Curcumina y Curcumina. Grupo Placebo mostro diferencias significativas contra el grupo Carvedilol + Curcumina. Representación de la media de cada tratamiento \pm desviación estándar. (+: Comparación contra grupo placebo, * comparación contra grupo cirrótico; n=3, * o +: P<0.05, ** o ++: P<0.01, *** o +++: P<0.001).



CAPÍTULO 10
DISCUSIÓN

10. Discusiones

La cirrosis hepática es el estadio final de todas las enfermedades hepáticas crónicas progresivas. Esta enfermedad consiste en una alteración histopatológica difusa del hígado caracterizada por pérdida del parénquima hepático, formación de septos fibrosos y nódulos de regeneración con estructuras anormales, distorsionando el parénquima y su arquitectura normal, alterando la anatomía de la vascularización hepática y de la micronodulación. (García-Buey *et al.*, 2012). Es una de las causas más importantes de mortalidad en México siendo sus etiologías principales, el alcoholismo, la hepatitis viral C, B y la esteatosis hepática no alcohólica. Durante varios años, diversos grupos de investigación han desarrollado modelos murinos, para comprender la enfermedad y los puntos clave en donde puede ser revertida, a pesar de lo antes mencionado, en la actualidad no existe un tratamiento certero contra la cirrosis hepática, por lo que en este trabajo se propuso evaluar la reversión de la cirrosis en hámsteres inducidos con CCl₄ y el tratamiento con α - y β - adrenobloqueadores y Curcumina para evaluar el nivel de reversión de la cirrosis hepática.

En el tratamiento con los α/β adrenobloqueadores se observó una disminución del aspecto nodular. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Muñoz-Ortega *et al.*, (2016), en donde utilizaron Doxazosina y Carvedilol para disminuir la fibrosis hepática en hámsteres, ellos hacen mención que el uso de estos medicamentos interviene directamente en la disminución de la secreción del TGF- β , principal pro-fibrogénico en las CEH. Las CEH tienen actividades fibrogénicas y contráctiles en respuesta al PDFG, al TGF- β y al EGF (Wynn TA., 2008). A nivel parenquimatoso, el uso de estos fármacos, aunque atenuó el incremento de la fibrosis generada por la administración del CCl₄, fue evidente la presencia de edema en los hepatocitos y cambios morfológicos, esto puede ser debido al metabolismo de los tratamientos con Doxazosina y Carvedilol.

En este estudio logramos demostrar la importancia del co-tratamiento de α/β adrenobloqueadores (Doxazosina y Carvedilol) con Curcumina ya que se ha demostrado que el extracto de la Cúrcuma, interviene en el proceso oxidativo generado por el CCl₄ (Reyes-

Gordillo *et al.*, 2008) y por otra parte demostramos que el tratamiento conjunto con curcumina disminuye el efecto colateral generado por el metabolismo de la Doxazosina y el Carvedilol ya que aparte de la disminución de la fibrosis se observó una restauración del parénquima hepático. Se conoce que la lesión hepática inducida por CCl_4 es un modelo comúnmente utilizado para evaluar las actividades hepatoprotectoras de diferentes fármacos. Se cree que el efecto hepatotóxico de CCl_4 se inicia como resultado de su deshalogenación reductiva por el citocromo P450 2E1 al radical triclorometilo altamente reactivo (CCl_3) que posteriormente se convierte en un radical triclorometil más destructivo (CCl_3OO) en presencia de oxígeno (Goeptar *et al.*, 1995). En este modelo trabajamos con dosis de 50mg/kg de CCl_4 (Muñoz-Ortega *et al.*, 2016) en diferentes grupos de animales esto nos permitió observar diferentes tipos de daño producidos durante su administración. Una de ellas fue la detección de ascitis, la cual es la acumulación de líquido en la cavidad peritoneal, esta aparece debido al aumento de la presión en la vena porta (hipertensión portal) y sus ramas. En 3 de cada 4 casos es secundaria a la cirrosis hepática (Redondo Cerezo *et al.*, 2007), por lo que se asume que el aumento en el tamaño del abdomen y de las bolsas testiculares de los animales tratados con CCl_4 adquirieron esta afección. En lo que respecta al grupo tratado con petrolato se observó un aumento de peso gradual, el cual pudo ser causado por el metabolismo del petrolato inducido únicamente y el crecimiento normal de los hámsteres, no se observó un aumento de volumen del abdomen ni de las bolsas testiculares (figura 17).

La arquitectura hepática analizada en los hígados tratados mostró una arquitectura similar a la descrita por Huerta-Solís, Galicia-Ramos, y Carrillo-Ruiz (2010) los cuales mencionan arquitecturas micronodulares para inducciones de 19 semanas y macronodulares para inducciones de 24, esto mismo fue observado en el grupo cirrótico con 19 semanas de inducción y macronodulares para el grupo placebo de 21 semanas (figura 18). Esta disposición es causada por el tiempo de inducción, la dosis administrada y el tratamiento a dar.

Cuando ocurre un daño hepático es importante no solo evaluar aspectos morfológicos si no también llevar a cabo una cuantificación de las enzimas producidas por el hígado para evaluar su funcionalidad antes y después de administrado el tratamiento. Las pruebas de ALT y

AST mostraron una disminución importante en el tratamiento con Doxazosina, con concentraciones cercanas al intacto, Carvedilol por su parte elevó las concentraciones de los sujetos de estudio, posiblemente derivado del metabolismo del medicamento. Hamdy y El-Damerdash en 2002 mostraron un comportamiento similar con el uso del Carvedilol en donde las enzimas hepáticas ALT y AST tuvieron un aumento de concentración en el tratamiento evaluatorio sin CCl₄. En las pruebas restantes tales como glucosa, proteínas totales, bilirrubina total, albumina y fosfatasa alcalina, los grupos bajo los diferentes tratamientos, mostraron un comportamiento similar al grupo intacto, el grupo cirrótico evaluado fue el que sufrió más daño ya que no se determinó un tiempo de recuperación endógena al organismo.

A nivel microscópico, después del tratamiento con los α/β adrenobloqueadores observamos una disminución de manera importante del colágeno, tanto de forma cualitativa como cuantitativamente; esto, posiblemente debido al bloqueo de los receptores α y β adrenérgicos, presentes en las células de Kupffer y en las CEH, lo cual evita la generación de factores profibrogénicos (Oben y Diehl., 2004). En lo que respecta al porcentaje de colágeno encontrado, observamos que los grupos tratados con Doxazosina + Curcumina, Carvedilol + Curcumina y Sinergia + Curcumina mostraron valores cercanos a los del grupo Intacto y por su parte, los grupos Cirrótico y Placebo sobrepasaron los porcentajes descritos con un acercamiento al rango cirrótico. El porcentaje de colágeno en hígados sanos según lo reportado por algunos autores es de entre 1.8 a 2.1% y puede llegar a aumentar hasta 7.3 y 8.2% en las fases finales de la enfermedad (Aycock y Seyer, 1989), lo que se asemeja a nuestro experimento en los porcentajes calculados del área de colágeno. Mediante el análisis del parénquima hepático, el uso de estos fármacos, aunque atenuó el incremento de la fibrosis generada por la administración del CCl₄ fue evidente la edematización de hepatocitos y cambios morfológicos, esto puede ser debido al metabolismo de los tratamientos con Doxazosina y Carvedilol, esto pudo ser comprobado en los resultados del grupo SHAM, observándose la edematización y cambios estructurales después de los tratamientos administrados.

Se sabe que el metabolismo de la Doxazosina y Carvedilol no está dilucidado al 100%, algunos estudios mostraron un aumento en las concentraciones de insulina y una disminución

de las lipasas en suero sanguíneo, lo cual indica cierta afección del sistema involucrado en su farmacodinamia (Jansen *et al.*, 1989). Actualmente los medicamentos involucrados con el metabolismo hepático se pueden clasificar por la probabilidad de que estén asociados con una lesión hepática inducida por fármacos. En la actualidad existe una red de lesiones hepáticas inducidas por fármacos (Drug Induced Liver Injury Network "DILIN", 2018) la cual, desarrolló una categorización de cinco puntos de la probabilidad de que un medicamento se asocie con una lesión hepática. Esta categorización se basa en gran parte en la literatura publicada y, por lo tanto, es más precisa para los medicamentos que se han utilizado ampliamente durante un período prolongado y es menos precisa para los medicamentos aprobados más recientemente. Estas categorías se conocen como "puntajes de verosimilitud" ("Likelihood Scale", 2017). Doxazosina posee una puntuación de verosimilitud: E (no probada, pero se sospecha de daño hepático clínicamente aparente) ("Doxazosin", 2018), y para el Carvedilol la puntuación de verosimilitud: D (posible causa rara de lesión hepática clínicamente aparente) ("Carvedilol", 2018).

Como ya se había mencionado, tanto Doxazosina como Carvedilol son metabolizados en los microsomas hepáticos principalmente por la familia del CYP450, siendo las principales las subfamilias 3A4, 2D6 y 2C9, y 2E1. CYP1A2 y CYP3A4 juegan un papel importante en la bioactivación en hígado (Gallagher *et al.*, 1994), Puntarulo y Cederbaum en 1998 realizaron experimentos para evaluar la capacidad de expresión de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6 y CYP3A4 y su capacidad de oxidar NADPH y generar ERO. Encontraron que CYP3A4 fue el más activo en catalizar la oxidación de NADPH y la producción de superóxido. CYP1A2 y CYP2B6 se muestran menor actividad porque CYP3A4 está altamente expresado en microsomas hepáticos humanos (Shimada., *et al.* 1994). Por lo que hay una alta expectativa de que CYP3A4 puede ser un contribuyente importante para la generación de ERO derivado del metabolismo de la Doxazosina y el Carvedilol por microsomas hepáticos.

CYP2E1 destaca porque filtra electrones fácilmente durante su ciclo catalítico, produciendo ERO más reactivas que otras enzimas CYP, que exceden la capacidad del sistema de defensa natural (Lewis, 2002). De la misma manera, esta enzima esta también involucrada en el metabolismo del CCl₄ y de los α/β adrenobloqueadores utilizados, por lo que el daño presente

en los tejidos puede también deberse a su activación durante el aclaramiento de los fármacos utilizados para el tratamiento.

La participación descrita por el complejo CYP450 en hígado, deja evidencia del daño potencial generado por el uso de los α/β adrenobloqueadores y la generación de ERO en el parénquima hepático por la bioactivación del Carvedilol y Doxazosina.

El proceso inflamatorio que genera cirrosis es provocado por el tratamiento a largo plazo con CCl_4 y el de los fármacos es a través de la vía del NF- κ B (Orfila *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2007) y es inhibido por otro factor de transcripción importante conocido como Nrf2 y por tanto la inhibición de la producción de citocinas pro-inflamatorias (Ma, 2013; Wardyn *et al.*, 2015). Los resultados mostraron una elevación en la expresión de NF- κ B en el grupo cirrótico lo cual indica que la activación del NF- κ B, ocurre después de la exposición de las células a diferentes condiciones de estrés tales como infección, inflamación, estrés oxidativo y otros estímulos fisiológicos y patológicos. Aunque no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos, se puede observar que los tratamientos con Doxazosina, Carvedilol y la sinergia mostraron un nivel elevado en la expresión del factor de transcripción NF- κ B en relación a los niveles de Nrf2. El Nrf2 es un factor clave de transcripción que controla muchos aspectos de la homeostasis de la célula en respuesta a daños oxidativos y tóxicos. Nuestros resultados mostraron una elevación en los niveles de expresión de Nrf2 en los grupos tratados, esto puede ser debido al mejoramiento en las funciones hepáticas generadas por la disminución del colágeno. En particular, Nrf2 media la transcripción basal e inducida de proteínas antioxidantes de fase II, que son responsables del aclaramiento de las especies reactivas de oxígeno (ERO), proporcionando protección contra la acumulación de metabolitos tóxicos (Wardyn *et al.*, 2015). Hamdy y El-Damerdash (2002) mostraron la presencia de este factor de transcripción en tejidos hepáticos dañados con CCl_4 . Observando un aumento de este factor derivado el uso de Carvedilol en tratamientos hepáticos en hámsteres adjuntando un efecto antioxidante a este medicamento.

Actualmente existen estudios que sugieren que Nrf2, funciona como un sistema de defensa en el desarrollo de varias afecciones (Li *et al.*, 2014). Por lo tanto, Nrf2 puede ser un nuevo objetivo terapéutico para la prevención y el tratamiento del daño hepático.

El uso de la Curcumina como hepatoprotector ha sido ampliamente utilizada para disminuir los efectos secundarios causados por procesos inflamatorios y ante el daño hepático generado por diversas enfermedades. Por lo que en este estudio, fue utilizada para lograr atenuar el daño generado por el CCl₄ y para atenuar el daño generado por el aclaramiento de estos fármacos. La Curcumina es un potente antioxidante y anti inflamatorio utilizado como tratamiento naturista y presente como condimento principalmente en la cocina indo-oriental. La Curcumina regula el metabolismo lipídico; es un potente antiinflamatorio, antioxidante y tiene efectos anticancerosos; y recientemente se demostró que activa la vía Nrf2 (Xu *et al.*, 2011).

Varios estudios han mostrado un efecto hepatoprotector de la Curcumina en la toxicidad hepática inducida por CCl₄ en animales de experimentación (Soudamini *et al.*, 1992, Zhao y O'Brien 1996; Park *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003). En nuestro trabajo, la Curcumina como tratamiento indujo mejorías importantes en el parénquima hepático debido a su actividad antioxidante, el efecto de la Curcumina sobre los hígados tratados mejoró importantemente su aspecto general el cual se vio afectada por el daño del CCl₄ y con los tratamientos con Carvedilol y Doxazosina.

La Curcumina como tratamiento indujo mejorías tanto de las pruebas serológicas como en el aspecto histológico, con una recuperación del parénquima hepático junto con un aumento en la concentración de glucosa. Pari y Murugan en 2005, reportaron la capacidad de la Curcumina para conservar los niveles de glucosa en sangre, atribuyendo esta acción a la capacidad de este compuesto para restaurar la actividad enzimática alterada de la 6-fosfato deshidrogenasa y la glucosa-6-fosfatasa las cuales participan en la gluconeogénesis y la glucogenólisis para la generación de glucosa. Mesejo *et al* (2008), menciona que la hipoglucemia no es muy frecuente en pacientes cirróticos, excepto en estadios avanzados. La ausencia de la glucosa puede ser debida a: la disminución de la producción de glucosa por el

hígado, al agotamiento de la reserva de glucógeno, a la disminución de la gluconeogénesis o por la resistencia hepática a la acción del glucagón (Fernández, 2003). La Curcumina gracias a su actividad antiinflamatoria se emplea como tratamiento de la *Diabetes mellitus*, ya que disminuye la inflamación hepática y la resistencia a la insulina (Meléndez-Salcido *et al.*, 2017), Por tanto, el uso de la Curcumina demostró mejorar las concentraciones de la glucosa aumentándola, disminuyendo la resistencia a la insulina y mejorando las funciones de las enzimas glucolíticas.

En lo que respecta a las concentraciones de AST y ALT observamos que en los grupos tratados con Curcumina, estas enzimas se redujeron en un 50% con respecto al grupo Cirrótico. Resultados parecidos también fueron mostrados por Kamalakkannan *et al.* (2005), quienes mencionan que la peroxidación lipídica daña las funciones celulares al comprometer la función de la membrana. Los productos peroxidativos inducen hipofunción de la membrana y las enzimas citosólicas aparecen en la sangre (Recknagel *et al.*, 1989). La Curcumina restablece el estado basal celular por su capacidad para eliminar o neutralizar los radicales libres, inhibe la peroxidación de los lípidos de la membrana celular y mantiene su integridad y su función (Rukkumani *et al.*, 2004). El grupo hidroxilo en la posición orto del anillo aromático en la Curcumina puede ser responsable del efecto inhibitor del daño generado por ERO (Anto *et al.*, 1996). El grupo o-hidroxilo, debido a su propiedad de resonancia, dona electrones fácilmente a radicales libres y los neutraliza de manera efectiva. La Curcumina estabiliza la integridad de la membrana celular y evita el aumento de estas enzimas marcadoras (Kamalakkannan., *et al.*2005).

Las observaciones histopatológicas de los hígados tratados con Curcumina mostraron disminución del daño generado por el CCl₄ y una mejoría en el parénquima hepático cuando se utilizó en conjunto con α/β adrenobloqueadores. La Curcumina posee una elevada capacidad para eliminar radicales libres, interactuar con la cascada oxidativa, e inhibir al oxígeno reactivo, inhibir las enzimas oxidativas y los iones metálicos quelantes (Rukkumani *et al.*, 2004), el estrés oxidativo puede conducir a la inflamación crónica, elevando las posibilidades de adquirir una enfermedad crónica. La producción de ERO modula la

expresión de las vías NFκB y del TNF-α, que desempeñan un papel central en la respuesta inflamatoria y en la fibrogénesis hepática. La Curcumina podría modular el estrés oxidativo y la disminuir posterior inflamación a través de la vía Nrf2 (Pulido-Moran *et al.*, 2016).

La evaluación del colágeno es otra variable importante de analizar en los casos de cirrosis hepática en los hígados donde se vio involucrada la Curcumina. Los tratamientos que mostraron disminución del colágeno fueron Doxazosina + Curcumina, Sinergia + Curcumina con cantidades menores a las del grupo intacto, y en tercer lugar Doxazosina sola con un comportamiento similar. Reyes-Gordillo *et al* en 2008 evaluaron la reversión de la cirrosis hepática inducida por ligadura del ducto biliar y por CCl₄ con dosis de Curcumina de 100mg/kg, encontrando una restauración de los valores de las pruebas serológicas, y la disminución del colágeno presumiblemente por la inhibición de NF-κβ y del factor de crecimiento transformante β (TGF-β) principal profibrogénico de las CEH. Yang *et al*, en 2007, reportaron que la biodisponibilidad oral de la Curcumina era de alrededor del 1%, por lo que se necesitan dosis muy altas de Curcumina (3600 a 12,000 miligramos) para lograr cualquier efecto beneficioso en humanos. La dosis del estudio realizado por este equipo de estudio fue de 30 mg/kg, y aunque no existió disminución del colágeno en este estudio por su tratamiento, el objetivo de utilizar la Curcumina fue como un hepatoprotector en sinergia con la doxazosina y carvedilol y no como tratamiento principal en el proceso de la reversión de la cirrosis hepática.

Las pruebas moleculares arrojaron resultados importantes acerca del uso de la Curcumina en el proceso pro y anti inflamatorio derivado del uso de los fármacos con actividad neuroinmune y del CCl₄. Nuestros resultados mostraron una disminución significativa en la expresión de NF-κB en los grupos de estudio en comparación con el grupo cirrótico. Los grupos tratados con Curcumina mostraron una presencia menor del factor NF-κB a los tratados con Doxazosina y Carvedilol únicamente. Curcumina tiene la capacidad de inhibir a la proteína I-kappa-beta (Iκβ) kinasa provocando una inhibición de NF-κB (Pulido-Moran *et al*, 2016). La activación del factor de transcripción NF-κB requiere de ser fosforilado por IκB cinasa (Wardyn *et al.*, 2015), por tanto, al ser inhibido por la Curcumina, los efectos pro-inflamatorios a su vez se ven disminuidos. Caso contrario ocurre con la expresión del factor

de transcripción Nrf2, importante en la generación del proceso anti-inflamatorio, donde los co-tratamientos de α/β adrenobloqueadores y Curcumina mostraron mayores niveles de expresión, siendo el más importante el tratamiento con Curcumina sola, donde se mostró la mayor expresión. Lu *et al*, en 2015, evaluaron el uso de Curcumina *in vivo* e *in vitro*, en la reversión del daño inducido por alcohol en ratas Sprague-Dawley y líneas celulares LO-1. Ellos reportaron que la Curcumina mejoraba la función hepática y suprimía el desarrollo de esteatosis hepática presumiblemente por la activación del factor de transcripción Nrf2. Por tanto, la activación de Nrf2 estaba estrechamente relacionada con el efecto de la Curcumina, ellos mencionan que la Curcumina reduce la expresión de las moléculas de señal pro-inflamatorias críticas TNF- α y NF- κ B, lo que sugiere que la Curcumina disminuye la inflamación inducida por etanol y mejora la transcripción y la traducción de Nrf2.

Este análisis muestra que el tratamiento conjunto de la Curcumina junto con los α/β adrenobloqueadores Doxazosina y Carvedilol puede ser un tratamiento eficaz para reducir los niveles de colágeno presentes en pacientes cirróticos así como su capacidad para revertir los efectos contralaterales involucrados en el metabolismo de estos fármacos y del CCl₄, debido a su fuerte capacidad antioxidante, inhibir vías pro inflamatorias y promover el efecto anti inflamatorio del parénquima hepático.



CAPÍTULO 11
CONCLUSIONES

11. Conclusiones

- Se logró establecer un modelo de cirrosis hepática inducida con CCl_4 a las 19 semanas empleando dosis de 50 mg/kg de peso.
- El uso de los α/β adrenobloqueadores Doxazosina y Carvedilol son capaces de disminuir los niveles de colágeno en el hígado cirrótico de los hámsteres tratados, los porcentajes de colágeno disminuyeron significativamente llegando a niveles comparables con organismos sanos (grupo intacto).
- La aplicación sinérgica de estos dos medicamentos mostró ser una de las mejores alternativas en la reducción del colágeno, dejando evidencias del daño al parénquima derivado del metabolismo de estos fármacos.
- La Curcumina demostró ser un hepatoprotector eficaz en el tratamiento de reversión de la cirrosis hepática con Doxazosina y Carvedilol, atenuando los daños generados por la farmacodinamia de los medicamentos.
- El co-tratamiento de los alfa-beta adrenobloqueadores con la Curcumina probó ser la mejor alternativa ante la reducción del colágeno y la mejora del aspecto y la arquitectura celular.
- Se comprobó la disminución del colágeno basal de los hámsteres pertenecientes al grupo SHAM tratados con los α/β adrenobloqueadores Doxazosina y Carvedilol comprobando el efecto de estos fármacos en las células estelares hepáticas.
- Los co-tratamientos con Curcumina evaluados en el grupo SHAM mejoraron la variabilidad de las pruebas de función hepática y la apariencia del parénquima ayudando a compensar el daño generado por el aclaramiento de los fármacos.



CAPÍTULO 12
BIBLIOGRAFÍA

12. Bibliografía

- Abraldes, J. G., García-Pagán, J. C. (2006). Modelos animales en el estudio de la hipertensión portal. *Gastroenterología y hepatología*, 29(1), 51-59.
- Aguilar, C. Julio (2010). Función inmunológica del hígado desde la perspectiva de la vacunación terapéutica. Artículo de Revisión. *Revista Biotecnología Aplicada*. 26:1-9.
- Al-Ghamdi, H. (2011). Carvedilol in the Treatment of Portal Hypertension. *Saudi Journal Of Gastroenterology*, 17(2), 155-158. doi:10.4103/1319-3767.77251
- Alonso, F. T., Garmendia, M. L., De Aguirre, M., & Searle, J. (2010). Análisis de la tendencia de la mortalidad por cirrosis hepática en Chile: Años 1990 a 2007. *Revista médica de Chile*, 138(10), 1253-1258.
- Angosto, M. C., & Álvarez-Gómez, J. Á. (2010). Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 76, No. 1).
- Annoni G, Weiner F, Zern MA. (2010). Increased transforming growth factor beta-1 gene expression in human liver disease. *J Hepatol*; 14:259–64.
- Anthwal, A.; Thakur, B.K.; Rawat, M.S.M.; Rawat, D.S.; Tyagi, A.K.; Aggarwal, B.B. Synthesis, characterization and in vitro anticancer activity of C-5 curcumin analogues with potential to inhibit TNF-alpha-induced NF-kappaB activation. *BioMed Res. Int.* 2014. [CrossRef] [PubMed].

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Anto, R. J., J. George, K. V. Babu, K. N. Rajasekharan & R. Kut-tan: Antimutagenic and anticarcinogenic activity of natural and synthetic curcuminoids. *Mut. Res.* 1996, 370, 127–131.
 - Asqui Lalón, M. (2012). Actividad Hepatoprotectora Del Extracto De Diente De León (*Taraxacum Officinale*) En Ratas (*Rattus Novergicus*) Con Hepatotoxicidad Inducida Por Tetracloruro De Carbono. Tesis De Licenciatura. Escuela Superior Politecnica De Chimborazo.
 - Aycock, R., & Seyer, J. (1989). Collagens of Normal and Cirrhotic Human Liver. *Connective Tissue Research*, 23(1), 19-31. <http://dx.doi.org/10.3109/03008208909103901>
 - Azuela, G. E. (2004). Uso De Ratones Modificados Genéticamente Para El Estudio De La Funcionalidad Y Regulación Del Cyp450. Aplicaciones En Farmacología Y Toxicología. *Mensaje Bioquímico*, 28.
 - B. Páramo Hernández,, D., Otero Regino, W. and Pineda Ovalle, L. (2010). Fibrogénesis Hepatica. Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología, s.n.(s.n.), pp.187-197.
 - Barreto, I. D. J. Y., Contreras, M. N. M., & Causado, A. S. (2017). Relación entre el factor de crecimiento hepático y el estadio de la cirrosis. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 32(1).
 - Bedossa P, Carrat F. 2009; The Liver Biopsy: The Best, Not The Gold Standard. *Journal Of Hepatology* 50: 1-3.
 - Bellón-Caneiro, J. M., Carnicer-Escusol, E., Rodríguez-Mancheño, M., García-Honduvilla, N., Serrano-Amarilla, N., & Buján-Varela, J. (2005). Estudio

experimental comparativo entre una prótesis compuesta (PL-PU99) y una prótesis biológica (Surgisis®) en el cierre temporal abdominal. *Cirugía Española*, 78(2), 103-108.

- Benedetti, A., Comporti, M., Esterbauer, H. (1980). Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Lipids And Lipid Metabolism*, 620(2), 281-296. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760\(80\)90209-x](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760(80)90209-x)
- Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. (2006). Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest*. 96:447–55.
- Blanc JF, Lepreux S, Balaboud C et al. *Histophysiologie Hépatique*. Encycl Méd Chir. Elsevier, Paris, Hépatologie 7-005-A-10, 2002, 13pp
- Böhm, F., Köhler, U., Speicher, T. and Werner, S. (2010). Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Molecular Medicine*, 2(8), pp.294-305.
- Bohórquez-Sierra, J. (2006). Metaloproteinasas de matriz: su implicación en las enfermedades vasculares periféricas. *Angiología*, 58(4), 269-277. [http://dx.doi.org/10.1016/s0003-3170\(06\)74981-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0003-3170(06)74981-1)
- Bona, S., Filippin, L., Di Naso, F., de David, C., Valiatti, B., Isoppo Schaun, M., Xavier, R. and Marroni, N. (2012). Effect of Antioxidant Treatment on Fibrogenesis in Rats with Carbon Tetrachloride-Induced Cirrhosis. *ISRN Gastroenterology*, 2012, pp.1-7.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Bonacini M. Hepatobiliary complications in patients with human immunodeficiency virus infection. *Am J Med* 1992;92:404-11
 - Boveris A, Fraga CG, Varsavsky AI, et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch Biochem Biophys.* 1983;227:534-41.
 - Boyer TD. Portal hypertensive hemorrhage: pathogenesis and risk factors. *Semin Gastrointest Dis* 1995; 6: 125–33.
 - Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M., & Karin, M. (1989). Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- α . *Nature*, 337(661-663),27.
 - Bulló Bonet, M., García-Lorda, P., Salas-Salvadó, J., & Argilés, J. (2000). Papel del factor de necrosis tumoral en el control de las reservas grasas y la obesidad. *Medicina Clínica*, 114(16), 624-630. [http://dx.doi.org/10.1016/s0025-7753\(00\)71382-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0025-7753(00)71382-0)
 - Cagle, P. T. (2010). *Molecular pathology of liver diseases (Vol. 5)*. S. P. Monga (Ed.). Springer Science & Business Media.
 - Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. (2003). Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is pro - fibrogenic. *Lab Invest.* 83:655–63.
 - Carlsson, N., Borde, A., Wölfel, S., Åkerman, B., & Larsson, A. (2011). Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers. *Analytical Biochemistry*, 411(1), 116-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2010.12.026>

- Caro, A. A., & Cederbaum, A. I. (2004). Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 27–42.
- Carretero, M. (2002). Doxazosina. *Offarm*, 21(8), pp.176-178.
- Carvedilol. (2018). Livertox.nlm.nih.gov. Retrieved 13 February 2018, from <https://livertox.nlm.nih.gov//Carvedilol.htm>
- Cequera, A. and García de León Méndez, M. (2014). Biomarcadores para fibrosis hepática, avances, ventajas y desventajas. *Revista de Gastroenterología de México*, 79(3), pp.187-199.
- Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol* 2004;40:539- 51
- Cocca, T. (2008). *Hepatopatías: Nuevas Fronteras Terapéuticas*. [online] COLVEMA- Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. Available at: http://www.colvema.org/WV_descargas/hepatopatias-29092009235248.pdf [Accessed 11 May 2017].
- Concepción Osorio, Marielin, & Rodríguez Amador, (2014). Factores que intervienen en la regeneración hepática. *Correo Científico Médico*, 18(4), 744-747. Recuperado en 08 de mayo de 2017, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S156043812014000400015&lng=es&tlng=es.
- Concepción Osorio, Marielin, & Rodríguez Amador, (2014). Factores que intervienen en la regeneración hepática. *Correo Científico Médico*, 18(4), 744-747. Recuperado en 17 de enero de 2018, de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812014000400015&lng=es&tlng=es.

- Coreg®- Carvedilol - FDA prescribing information, side effects and uses. (2005). www.fda.gov. Retrieved 14 February 2018, from https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/020297s013lbl.pdf
- Cornejo Uribe R, Matamala Vargas F, Silva Mella H, Garrido Oñate O, Buchegger Mena K, Jarpa Hidalgo A. (2010) Análisis Morfométrico del Efecto de Estimulaciones de Láser Infrarrojo sobre Núcleos de Hepatocitos de Rata. *Int J Morphol.* , 28(3): 771-775.
- COUINAUD C., Lobes et segments hépatiques. Notes sur l'architecture anatomique et chirurgicale du foie. *Presse Med.*, 62(33):709-12, 1954
- Cowley RA, Trump BF (eds) (1982). *Pathophysiology of shock, anoxia, and ischemia*. Baltimore, Williams & Wilkins,:285-301
- Crawford JM, Boyer JL. Clinicopathology conferences: Inflammation-induced cholestasis. *Hepatology* 1998;28:257-65
- Cunningham CC, Ivester P. Chronic ethanol, oxygen tension and hepatocyte energy metabolism. *Front Biosci.* 1999;4: 551-6.
- Dandona, P., Ghanim, H., & Brooks, D. P. (2007). Antioxidant activity of carvedilol in cardiovascular disease. *Journal of hypertension*, 25(4), 731-741.
- Davis BH. (2005). Transforming growth factor beta responsiveness is modulated by the extracellular collagen matrix during hepatic cell culture. *J Cell Physiol.*;136:547-53.

- de Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A. (2008). Transforming growth factor beta gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol.* 2008;26:886–93.
- De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. NADPH oxidase in the liver defensive, offensive, or fibrogenic? *Gastroenterology.* 2006;131:272-5.
- Desmet, V., Gerber, M., Hoofnagle, J., Manns, M. and Scheuer, P. (1994). Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology,* 19(6), pp.1513-1520.
- Despopoulos S.S., 2009. *Fisiología. Texto y Atlas 7ma Edición.* Editorial Medica, España, cap. 7, pp236-242.
- Ding, Q., Tian, X. G., Li, Y., Wang, Q. Z., & Zhang, C. Q. (2015). Carvedilol may attenuate liver cirrhosis by inhibiting angiogenesis through the VEGF-Src-ERK signaling pathway. *World Journal of Gastroenterology: WJG,* 21(32), 9566.
- Dorrell C, Grompe M. (2005). Liver repair by intra- and extrahepatic pro- genitors. *Stem Cell Rev.;*1:61–4.
- Doxazosin - FDA prescribing information, side effects and uses. (2018). *Drugs.com.* Retrieved 14 February 2018, from <https://www.drugs.com/pro/doxazosin.html>
- Doxazosin Treatment Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Hamsters through a Decrease in Transforming Growth Factor β Secretion. *Gut & Liver,* 10(1), 101-108. doi:10.5009/gnl14459
- Doxazosin. (2018). *Livertox.nlm.nih.gov.* Retrieved 13 February 2018, from <https://livertox.nlm.nih.gov/Doxazosin.html>

- Dubuisson, L., Desmoulière, A., Decourt, B., Evadé, L., Bedin, C., Boussarie, L., Barrier, L., Vidaud, M. and Rosenbaum, J. (2002). Inhibition of Rat Liver Fibrogenesis Through Noradrenergic Antagonism. *Hepatology*, 35, pp.325-331.
- Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, et al. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *J Exp Med* 2007;204:667–680. [PubMed: 17353365]
- Exley MA, Koziel MJ. To be or not to be NKT: natural killer T cells in the liver. *Hepatology* 2004;40(5):1033-40.
- Fang AF, Ngai P, Ho DW, Yu WC, Ng MNP, Lau CK, et al. (2008). Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology*; 47:919–28.
- Faroon, O., DeRosa, C. T., Smith, L., Mehlman, M. A., Riddle, J., Hales, Y., & Brattin, W. J. (1994). Atsdr Evaluation Of Health-Effects Of Chemicals. 1. Carbon-Tetrachloride-Health-Effects, Toxicokinetics, Human Exposure And Environmental Fate. *Toxicology And Industrial Health*, 10, 1-123.
- Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes (2004), progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* ;39:1477–87.
- Feria, J. (2014). OPS OMS | Informe mundial de la OMS destaca los impactos negativos del alcohol en la salud. [online] Pan American Health Organization / World Health Organization. Available at: http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9564%3A2014-global-who-report-highlights-negative-health-impacts-of-alcohol&Itemid=1926&lang=es [Accessed 11 May 2017].

- Foxall, T. L., Shwaery, G. T., Stucchi, A. F., Nicolosi, R. J., & Wong, S. S. (1992). Dose-related effects of doxazosin on plasma lipids and aortic fatty streak formation in the hypercholesterolemic hamster model. *The American journal of pathology*, 140(6), 1357.
- Friedman SL. (2007). Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis.*;19:129–40.
- Fulton, B., Wagstaff, A. J., & Sorkin, E. M. (1995). Doxazosin. *Drugs*, 49(2), 295-320.
- G., S., A., B., M., M., P., R., J. C., L., M., N., & ... I., R. (2016). Asociación del polimorfismo 1G>2G de la MMP1 con calcificación de la válvula aórtica. *Journal Of Osteoporosis & Mineral Metabolism / Revista De Osteoporosis Y Metabolismo Mineral (Spanish Edition)*, 8(4), 115-120.
- Gallagher, E. P., Kunze, K. L., Stapleton, P. L., & Eaton, D. L. (1996). The kinetics of aflatoxin B1 oxidation by human cDNA-expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 141, 595–606.
- Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, et al. (2014). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med.* 182:1223–30.
- García Buey, L., González Mateos, F., & Moreno-Otero, R. (2012). Cirrosis hepática. *Medicine - Programa De Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(11), 625-633. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-5412\(12\)70359-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-5412(12)70359-1)

- García-Ruíz C, Collet A, Mari M, et al. Direct effects of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species: Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem.* 1997;272:11369-77.
- Giannelli G, Quaranta V, Antonaci S. Tissue remodelling in liver diseases. *Histol. Histopathol.* 2003;18:1267-74
- Gilmore TD (2006). «Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives». *Oncogene* 25 (51): 6680-4. PMID 17072321. doi:10.1038/sj.onc.1209954
- Goepfert, A.R., Scheerens, H., Vermeulen, N.P., 1995. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 25–65.
- Gonzalez, F. J. (2005). Role of cytochrome P450 in chemical toxicity and oxidative stress: Studies with CYP2E1. *Mutation Research*, 569, 101–110.
- Gravela, B.E. Alvano, E. Dianzani, M. U. Poli, G., Slater, T. F. 1979. Effects of carbón tetrachloride on isolated rat hepatocytes. Inhibition of protein and lipoprotein secretion. *Biochem. J.* 178, 509-512
- Gupta, S.C.; Tyagi, A.K.; Deshmukh-Taskar, P.; Hinojosa, M.; Prasad, S.; Aggarwal, B.B. Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. *Arch Biochem. Biophys.* 2014, 559, 91–99. [CrossRef] [PubMed]
- Guzmán-Hernández, E. A., & Segura-Cobos, D. (2015). Mecanismos de inducción de la matriz extracelular en la nefropatía diabética. *Revista Cubana De Endocrinología*, 26(3), 278-291

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Hayden, M.S., West, A.P., Ghosh, S., 2006. NF- κ B and the immune response. *Oncogene* 25, 6758–6780.
 - Hernández, C., Cirrosis hepática, q. and Diabetes, p. (2008). Cirrosis hepática es la 5ta. causa de muerte en México. [online] Salud180. Available at: <http://www.salud180.com/jovenes/cirrosis-hepatica-es-la-5ta-causa-de-muerte-en-mexico> [Accessed 11 May 2017].
 - Hoeger, S., Gottmann, U., Liu, Z., Schnuelle, P., Birck, R., Braun, C., ... & Yard, B. A. (2007). Dopamine treatment in brain-dead rats mediates anti-inflammatory effects: the role of hemodynamic stabilization and D-receptor stimulation. *Transplant International*, 20(9), 790-799.
 - Hoehme et al. Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(23):10371–6.
 - Huerta-Solís, M. A., Galicia-Ramos, J. M., & Carrillo-Ruiz, R. (2010). Hígado ectópico intratorácico izquierdo con cirrosis micro y macronodular. *Rev Mex Patol Clin*, 57(3), 143-147.
 - Huet PM, Pomier–Layrargues G, Villeneuve JP, et al. Intrahepatic circulation in liver disease. *Semin Liver Dis* 1986; 6: 277–86
 - IPCS.(1999). Carbon tetrachloride. Ginebra (Suiza), Organización Mundial de la Salud, Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (n.º 208 de la serie de la OMS Criterios de Salud Ambiental).

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538–549. [PubMed: 9691091]
 - Ishibashi, H., Nakamura, M., Komori, A., Migita, K. and Shimoda, S. (2009). Liver architecture, cell function, and disease. *Seminars in Immunopathology*, 31(3), pp.399-409.
 - Jansen, H., Lammers, R., Baggen, M. G., & Birkenhäger, J. C. (1989). Effects of doxazosin on lipids, lipoprotein lipases, and cholesterol synthesis in the golden hamster. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 13, S5-10.
 - Jayo, M., & Cisneros, F. (1996). *Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio*. Guía, Washington, D.C.
 - Jeong WI, Park O, Suh YG, Byun JS, Park SY, Choi E, et al. Suppression of innate immunity (natural killer cell/interferon-gamma) in the advanced stages of liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2011;53(4):1342-51.
 - Kamalakkannan, N., Rukkumani, R., Varma, P. S., Viswanathan, P., Rajasekharan, K. N., & Menon, V. P. (2005). Comparative Effects of Curcumin and an Analogue of Curcumin in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 97(1), 15-21.
 - Kamalakkannan, N., Rukkumani, R., Viswanathan, P., Rajasekharan, K., & Menon, V. (2005). Effect of Curcumin and its Analogue on Lipids in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity: A Comparative Study. *Pharmaceutical Biology*, 43(5), 460-466. <http://dx.doi.org/10.1080/13880200590963880>
 - Kapoor D, Sarin SK. Pathophysiology of portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: S482–S487.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Karin M, Lin A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.*2002;3:221–7.
 - Kim WH, Hong F, Jaruga B, Hu Z, Fan S, Liang TJ, et al. Additive activation of hepatic NF-kappa B by ethanol and hepatitis B protein X (HBX) or HCV core protein: Involvement of TNF-alpha receptor 1-independent and -dependent mechanisms. *FASEB J* 2001; 15: 2551-3.
 - Knittel T, Dinter C, Kobold D, et al. Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1999;154:153–167. [PubMed: 9916930]
 - Lee, H., Kim, S., Lee, G., Choi, M., Jung, H., Kim, Y., Kwon, H. and Chae, H. (2016). Turmeric extract and its active compound, curcumin, protect against chronic CCl4-induced liver damage by enhancing antioxidation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1).
 - Leija, A., Reyes, J., & Rodríguez, L. (2007). Hepatic stellate cells are a major component of liver fibrosis and a target for the treatment of chronic liver disease. *Biocnologia Aplicada*, 24(1), 19-25.
 - Lemasters JJ. Dying a thousand deaths; redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 2005; 129: 351-60.
 - Lewis, D. F. V. (2002). Oxidative stress: The role of cytochromes P450 in oxygen activation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77, 1095–1100.

- Li, B., Wang, L., Lu, Q. and Da, W. (2014). Liver injury attenuation by curcumin in a rat NASH model: an Nrf2 activation-mediated effect?. *Irish Journal of Medical Science* (1971 -), 185(1), pp.93-100.
- Li, X., Zhang, M., Liu, J., Huang, Z., Zhao, Q., Huang, Y., & ... Gao, Z. (2016). Intrahepatic NK cells function suppressed in advanced liver fibrosis. *European Journal Of Clinical Investigation*, 46(10), 864-872. doi:10.1111/eci.12669
- Likelihood Scale. (2017). Livertox.nlm.nih.gov. Retrieved 13 February 2018, from <https://livertox.nlm.nih.gov/DrugCategory.html>
- Liu, Y. G., H. C. Chen & Y. P. Jiang: Protective effect of curcumin on experimental liver injury in mice. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2003, 28, 756–758.
- Lookfordiagnosis.com. (2017). Tetracloruro de carbono. [online] Available at:http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=tetracloruro+de+carbono&lang=2 [Accessed 10 May 2017].
- Lu, C., Zhang, F., Xu, W., Wu, X., Lian, N., & Jin, H. et al. (2015). Curcumin attenuates ethanol-induced hepatic steatosis through modulating Nrf2/FXR signaling in hepatocytes. *IUBMB Life*, 67(8), 645-658. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.1409>
- Luedde, T., & Schwabe, R. F. (2011). NF-κB in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 8(2), 108-118.
- Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 53(1), 401-426. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>

- Melhem A, Muhanna N, Bishara A, et al. Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J Hepatol* 2006;45:60–71. [PubMed: 16515819]
- Menon, V. P., & Sudheer, A. R. (2007). Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. In *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease* (pp. 105-125). Springer US.
- Michael H. Ross, Wojciech Pawlina, *Histología*, edición reimpressa Ed. Médica Panamericana, España, 2007.
- Michalopoulos, G. (2007). Liver regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), pp.286-300.
- Michalopoulos, G. (2010). Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *The American Journal of Pathology*, 176(1), pp.2-13.
- Mitchell, C. (2015). OPS OMS | La OPS/OMS pide acciones urgentes para frenar la hepatitis. [online] Pan American Health Organization / World Health Organization. Available at: http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11125%3Aoms-frenar-la-hepatitis&Itemid=1926&lang=es [Accessed 11 May 2017].
- Moreno Gomes E, da Silveira V, Ribeiro Filho J. *Anatomía y fisiología hepática*. Brasil: Atheneu; 2006, 7-005-A-10, 202pp.
- Muhanna N, Abu Tair L, Doron S, Amer J, Azzeh M, Mahamid M, et al. Amelioration of hepatic fibrosis by NK cell activation. *Gut*. 2011;60(1):90-8.

- Muñoz-Ortega, M. H., Llamas-Ramírez, R. W., Romero-Delgadillo, N. I., Elías-Flores, T. G., Tavares-Rodríguez, E. J., del Rosario Campos-Esparza, M., & ... Ventura-Juárez, J. (2016).
- Muntané, J., González, R., Ranchal, I., Collado, J. A., López-Sánchez, L. M., Herencia, C., Rodríguez-Ariza, A., Muñoz-Castañeda, J. R., & de la Mata, M. (2007). Mecanismos de lesión hepatocelular. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 99(7), 405-410. Recuperado en 18 de enero de 2018, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082007000700007&lng=es&tlng=es.
- Nagy, L. (2011). Molecular Pathology of Liver Diseases. *Gastroenterology*, 141(4), p.1530.
- Oertel M, Shafritz DA (2008). Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta*.;1782:61–74.
- OLIVERA FUENTEALBA, G. (2008). "Estudio del efecto protector y/o regenerador del aceite de Emú (Dromiceius oil) sobre el daño celular agudo inducido por tetracloruro de carbono en células hepáticas de ratas. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile.
- Orellana B, Myriam, & Guajardo T, Viviana. (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista médica de Chile*, 132(1), 85-94. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872004000100014>
- Orfila, C., Lepert, J.C., Alric, L., Carrera, G., Beraud, M., Pipy, B., 2005. Immunohistochemical distribution of activated nuclear factor kappaB and peroxisome proliferator-activated receptors in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats. *Histochem. Cell Biol.* 123, 585–593.

- Ozyigit, M. O., Kahraman, M. M., & Sonmez, G. (2005). The identification of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in broiler chickens by immunohistochemistry. *Avian Pathology*, 34(6), 509-516. doi:10.1080/03079450500368508
- Paniagua, M. J. P., Pérez, R. D. B., Cruz, M. D. L. L. G., & Benítez, J. M. Z. (2003). El sistema inmune del recién nacido. *Alerg Asma Inmunol Pediatr*, 12(2), 63-68.
- Pari L., Murugan P. Effect of tetrahydrocurcumin on blood glucose, plasma insulin and hepatic key enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* (2005) 16 257–274.
- Park, E. J., C. H. Jeon, G. Ko, J. Kim & D. H. Sohn: Protective effect of curcumin in rat liver injury induced by carbon tetra- chloride. *J. Pharm. Pharmacol.* 2000, 52, 437–440.
- Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martín MA, et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38: 999-1007
- Popper, H. (1977). Pathologic aspects of cirrhosis. A review. *The American journal of pathology*, 87(1), 228.
- Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C., & Ramirez-Tortosa, M. (2016). Curcumin and health. *Molecules*, 21(3), 264.
- Quimica.seed.pr.gov.br. (2017). Tetracloreto de carbono (CCl₄) - Disciplina - Química. [online] Available at: <http://www.quimica.seed.pr.gov.br/modules/galeria/detalhe.php?foto=1965&evento=5> [Accessed 10 May 2017].

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Racanelli V, Rehermann B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology*; 43(S1):S54-S62.
 - Ramadori G, Saile B. (2002). Mesenchymal cells in the liver – one cell type or two? *Liver*. 22:283–94.
 - Rashid, K., Sinha, K., & Sil, P. (2013). An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 584-600. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.09.026>
 - Recknagel, R. O., E. A. Glende Jr, J. A. Dolak & R. L. Waller: Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol. Therap.* 1989, 43, 139–145.
 - Redondo Cerezo, E., & Godino García, A. (2007). La restricción de sal a los cirróticos españoles es demasiado rigurosa. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 99(1), 56-57.
 - Repetto Kuhn, G. and Repetto Jiménez, M. (2010). *Toxicología fundamental* (4a. ed.). 1st ed. Ediciones Díaz de Santos.
 - Roland CR, Mangino MJ, Duffy BF, Flye MW. Lymphocyte suppression by Kupffer cells prevents portal venous tolerance induction: a study of macrophage function after intravenous gadolinium. *Transplantation* 1993;55(5):1151-8.
 - Roman, S., Fierro, N. A., Moreno-Luna, L. E., & Panduro, A. (2013). Hepatitis B virus genotype H and environmental factors associated to the low prevalence of hepatocellular carcinoma in Mexico.

- Ronis MJJ, Butura A, Sampey BP, et al. Effects of Nacetylcysteine on ethanol-induced hepatotoxicity in rats fed via total enteral nutrition. *Free Radic Biol Med*. 2005;36:616-30.
- Salazar-Mather TP, Orange JS, Biron CA. Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways. *J Exp Med* 1998;187(1):1-14.
- Schinoni, María I; Paraná, Raymundo; (2006). Apoptosis y progresión de fibrosis hepática en enfermedades del hígado. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, Diciembre-Sin mes, 211-217.
- Schuppan, D., & Pinzani, M. (2012). Anti-fibrotic therapy: lost in translation? *Hepatology*, 56 (1), S66-S74.
- Secondary biliary cirrhosis in the rat is prevented by decreasing NF- κ B nuclear translocation and TGF- expression using allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. (2012). *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology*, 90(11), 1469-1478. doi:10.1139/y2012-125 Karin M, Lin A (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.*;3:221-7.
- Shams, S., Mohsin, S., Nasir, G. A., Khan, M., & Khan, S. N. (2015). Mesenchymal Stem Cells Pretreated with HGF and FGF4 Can Reduce Liver Fibrosis in Mice. *Stem Cells International*, 20151-12. doi:10.1155/2015/747245)
- Son, G., Iimuro, Y., Seki, E., Hirano, T., Kaneda, Y., Fujimoto, J., 2007. Selective inactivation of NF- κ B in the liver using NF- κ B decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 293, G631-G639.

- Sossai, P., & Barbazza, R. (1990). True lipoma of Glisson's capsule. *Journal Of Clinical Pathology*, 43(9), 780-780. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.43.9.780-a>
- Soudamini, K. K., M. C. Unnikrishnan, K. B. Soni & R. Kuttan: Inhibition of lipid peroxidation and cholesterol levels in mice by curcumin. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 1992, 36, 239–243.
- Strazzabosco M, Fabris L, Spirli C., Pathophysiology of cholangiopathies. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:S90-102.
- Szabo G, Dolganiuc A. Hepatitis C and innate immunity: recent advances. *Clin Liver Dis.* 2008 Aug;12(3):675-92, x.
- Tejada Cifuentes, F. (2010). Hepatotoxicidad por Fármacos. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 3(3).
- Tejada Cifuentes, Francisco. (2010). Hepatotoxicidad por Fármacos. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 3(3), 177-191. Recuperado en 08 de mayo de 2017, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-695X2010000300006&lng=es&tlng=es.
- Tello Vera, S. (2016). Cirrosis hepática tratada con células madre. Reporte de casos. *Revista Del Cuerpo Médico Del Hospital Nacional Almazor Aguinaga Asenjo*, 9(2), 129-132
- Tilg, H., Wilmer, A., Vogel, W., Herold, M., Nölchen, B., Judmaier, G., & Huber, C. (1992). Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology*, 103(1), 264-274.

- U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894
National Institutes of Health, U.S. Department of Health & Human Services
Graphic Courtesy of The Scientific Consulting Group, Inc,
Last updated: 2018-01-18 11:06:25 AM (EST)
- U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894
National Institutes of Health, U.S. Department of Health & Human Services
Graphic Courtesy of The Scientific Consulting Group, Inc,
Last updated: 2018-01-18 11:06:25 AM (EST)
- U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894
National Institutes of Health, U.S. Department of Health & Human Services
Graphic Courtesy of The Scientific Consulting Group, Inc,
Last updated: 2017-10-16 02:52:39 PM (EST)
- Wardyn, J., Ponsford, A., & Sanderson, C. (2015). Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF-κB response pathways. *Biochemical Society Transactions*, 43(4), 621-626. <http://dx.doi.org/10.1042/bst20150014>
- Who.int. (2017). OMS | Alcohol. [online] Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/es/> [Accessed 11 May 2017].
- Wolkoff AW, Cohen DE. Bile acid regulation of hepatic physiology. Hepatocyte transport of bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Physiol* 2003;10:G175-9.
- www.Acofarma.com. (n.d.). Carvedilol Ficha de Información Técnica. [online] Available at: <http://www.acofarma.com/admin/uploads/download/7247-f4303612df408658e0e14cbefeed76d7fed6cc4a/main/files/Carvedilol.pdf> [Accessed 19 Jan. 2018].

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199-210.
 - Xu W, Shao L, Zhou C, Wang H, Guo J (2011). Upregulation of Nrf2 expression in non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis. *Hepatogastroenterology* 58(112):2077–2080
 - Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, et al. EpCAM and a-fetoprotein expression de nes novel prognostic sub- types of hepatocellular carcinoma. (2008) *Cancer Res.* 68:1451–61.
 - Yan AF, Ng Ho DW, MN LCK, Yu WC, Ngal P, Chu PEK, et al. (2008). Significance of CD90+ in cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*;13:153–66.
 - Yang, C., Zeisberg, M., Mosterman, B., Sudhakar, A., Yerramalla, U., Holthaus, K., ... & Kalluri, R. (2003). Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology*, 124(1), 147-159.
 - Yong-Han, P. (2016). Reappraisal of Antihypertensive Medicine Doxazosin and Carvedilol as a Potential Therapeutic for Hepatic Fibrosis. *Gut & Liver*, 10(1), 10-11. doi:10.5009/gnl15576
 - Zhao, Z. S. & P. J. O'Brien: The prevention of CCl4-induced liver necrosis in mice by naturally occurring methylenedioxybenzenes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996, 140, 411–421.
 - Zhou, W.-C., Zhang, Q.-B., & Qiao, L. (2014). Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* , 20 (23), 7312-7324.

- Zimmermann, T., Franke, H. and Dargel, R. (1986). Studies on lipid and lipoprotein metabolism in rat liver cirrhosis induced by different regimens of thioacetamide administration. *Experimental pathology*, 30(2), pp.109-117.





CAPÍTULO 13

ANEXOS

Anexo A

Inclusión de Tejidos en Parafina

Colocar los tejidos en casetes para tejidos, posteriormente montarlos en Histoquinet para someterse al siguiente procedimiento.

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

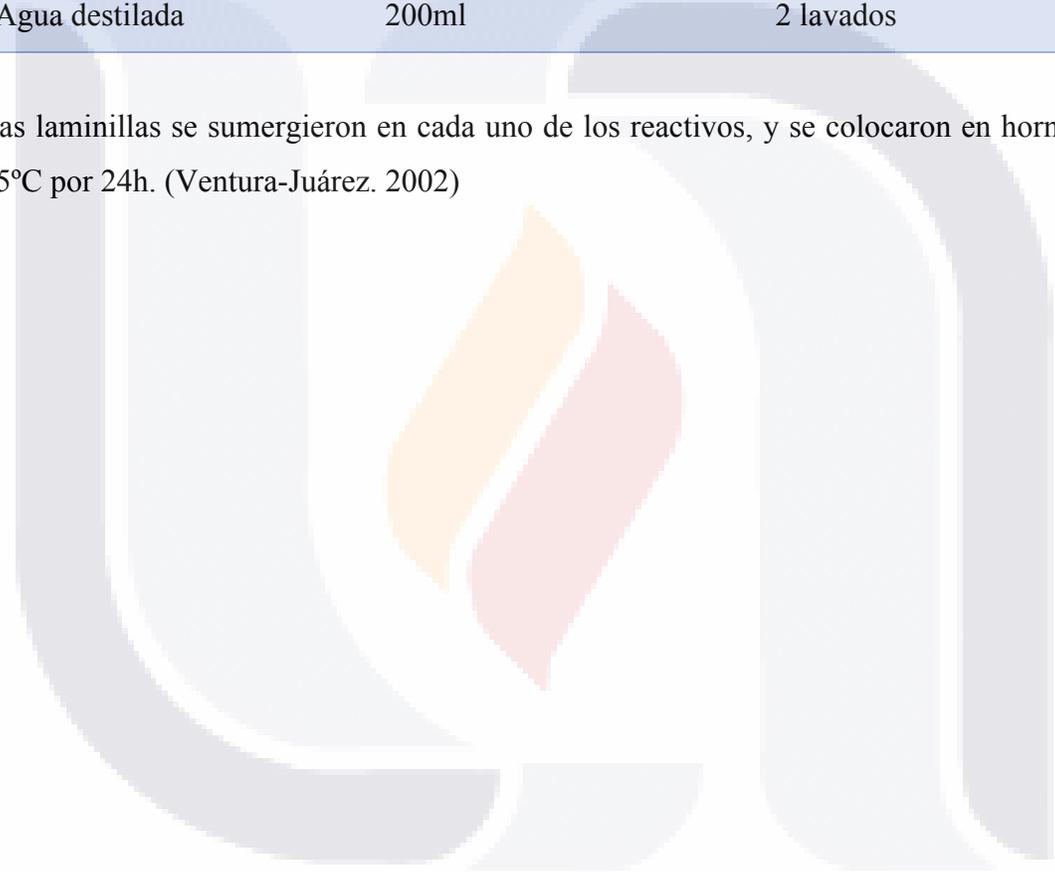
Una vez que el tejido paso por todo el procedimiento, se formaron bloques de parafina para realizar los cortes histológicos micrométricos.

Silanizado de laminillas

El silanizado de laminillas se llevó a cabo utilizando los siguientes reactivos.

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

Las laminillas se sumergieron en cada uno de los reactivos, y se colocaron en horno a 50-65°C por 24h. (Ventura-Juárez. 2002)



Anexo B

Tinción Hematoxilina- Eosina (H-E).

Procedimiento:

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

(Luna, 1968)

Anexo C

Tinción Rojo Sirio

Preparación de Agua acidificada

Reactivo	Cantidad
Agua Destilada	100ml
Ácido acético	500µl

Preparación de Rojo Sirio-Picro

Reactivo	Cantidad
Rojo Sirio	0.5g
Solución acuosa de ácido pícrico (Rojo sirio (Sigma-Aldrich 365548), ácido pícrico (sigma P6744-1GA)	500ml
Ácido acético glacial	3ml
Agua destilada	Aforar a 1lt

Nota: añadir el ácido acético glacial al agua destilada.

Preparación de hematoxilina de Weigert

I. Solución A (100ml)

Reactivo	Cantidad
Cristales de Hematoxilina	1g
Alcohol al 95%	100ml

II. Solución B (100ml)

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	95ml
Ácido clorhídrico concentrado	1ml
Cloruro Férrico	4ml

Diluir partes iguales de ambas soluciones (A y B) según la cantidad utilizada.

1.- Hidratar los cortes (5 μ m) provenientes de los bloques de parafina bajo el procedimiento convencional. Tiempos:

- Xilol- 7min
- Xilol- 7min
- Alcohol al 100%- 5min
- Alcohol al 100%- 5min
- Alcohol al 96%- 3 min
- Alcohol al 96%- 3min
- Agua destilada- 3min

2.- Incubar los cortes en una solución de hematoxilina de Weigert para tinción de núcleos, durante 8 min y luego lavar los portaobjetos durante 5 min en agua corriente y después colocar las laminillas en PBS 1X durante 5 min.

3.- Incubar con la Solución de Rojo Sirio-Picro durante una hora.

4.- Lavar dos veces con agua acidificada (2 baños en cada lavado) rápidos 1 seg.

5.- Deshidratar en dos cambios de etanol al 96% (45 seg/lavado).

6.- Deshidratar en dos cambios de etanol al 100% (2 min/lavado).

7.- Lavar en xileno durante 5 min y montar con Entellan.

8.- Revisar los cortes en campo claro y luz polarizada.

Anexo D

Extracción de Proteínas.

Lavar previamente los tejidos con solución salina estéril para eliminar la mayor cantidad de eritrocitos y congelarlas en nitrógeno líquido inmediatamente.

Adicionar los inhibidores de proteasas momento antes de iniciar la lisis

- **Solución de Lisis (Stock).**

Reactivo	Cantidad
Tris HCl 10 mM pH 7.4 (PM 157.6)	0.788 g
NaCl 50 mM (PM 58.44)	1.461 g
H ₂ O destilada	500 mL

Almacenar a 4°C

- **Solución de lisis + Inhibidores de proteasas + Tritón 0.1 %**

Solución de lisis	10 mL
Iodoacetamida 3 mM (PM 184.96)	0.0056 g
N-ethyl maleimida 3 mM (PM 125.13)	0.0038 g
Tosil-L-lisina clorametil cetona (TLCK) 3 Mm (PM 369.3)	0.01108 g
Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 1 mM (PM 174.19)	0.0018 g
Tritón 0.1 %	10 µL

Recuperar el sobrenadante y almacenarlo para su cuantificación.

Anexo E

Cuantificación de Proteína por método de Bradford.

- **Preparación de solución de Bradford (1L).**

- Ácido Fosfórico al 85 % 100 ml
- Alcohol Etilico al 95% 50 ml
- Azul de Coomasie G-250 100 mg
- Aforar a un litro con agua destilada

Nota: Disolver Azul de Coomasie G 250 100 mg en 50 ml de etanol al 95%. Agregar 800 ml de agua destilada y agitar durante 5 minutos. Añadir 100 mL de ácido fosfórico al 85% con agitación constante durante 5 minutos. Aforar a 1 Lito con agua destilada y filtrar con papel filtro Whatman #3. Guardar en frasco ambar y refrigerar.

Utilizar cajas de 96 pozos y se hará el estudio por triplicado.

- **Preparación de la Curva Estándar de BSA**

Utilizar albúmina sérica bovina (BSA, 1mg/mL).

Albúmina (µl)	H2O (µl)	Bradford (ml)
0	10	240
1	9	240
2	8	240
3	7	240
5	5	240
7	3	240
10	0	240

- **Preparación de Muestras**

- Adicionar a cada pozo 1 μL de la muestra más 9 μL de agua destilada.
- Enseguida adicionar 240 μL del reactivo de Bradford.
- Leer las absorbancias a 595 nm.

- Ejemplo:

	CURVA μL			MUESTRAS μL									
A	10 H ₂ O + 240 Bradford	10 H ₂ O + 240 Bradford	10 H ₂ O + 240 Bradford	1 M1 + 9H ₂ O + 240 Bradford	1 M1 + 9 H ₂ O + 240 Bradford	1 M1 + 9H ₂ O + 240 Bradford							
B	1 BSA + 9 H ₂ O + 240 Bradford	1 BSA + 9 H ₂ O + 240 Bradford	1 BSA + 9 H ₂ O + 240 Bradford	1M2 + 9 H ₂ O + 240 Bradford	1 M2 + 9 H ₂ O + 240 Bradford	1 M2 + 9 H ₂ O + 240 Bradford							
C	2 BSA + 8 H ₂ O + 240 Bradford	2 BSA + 8 H ₂ O + 240 Bradford	2 BSA + 8 H ₂ O + 240 Bradford	1 M3 + 9 H ₂ O + 240 Bradford	1 M3 + 9 H ₂ O + 240 Bradford	1 M3+ 9 H ₂ O + 240 Bradford							
D	3 BSA + 7 H ₂ O + 240 Bradford	3 BSA + 7 H ₂ O + 240 Bradford	3 BSA + 7 H ₂ O + 240 Bradford	1 M4 + 9 H ₂ O + 240 Bradford	1 M4 + 9 H ₂ O + 240 Bradford	1 M4 + 9 H ₂ O + 240 Bradford							
E	5 BSA + 5 H ₂ O + 240 Bradford	5 BSA + 5 H ₂ O + 240 Bradford	5 BSA + 5 H ₂ O + 240 Bradford	1 M5+ 9 H ₂ O + 240 Bradford	1 M5 + 9 H ₂ O + 240 Bradford	1 M5 + 9 H ₂ O+ 240 Bradford							
F	7 BSA + 3 H ₂ O + 240 Bradford	7 BSA + 3 H ₂ O + 240 Bradford	7 BSA + 3 H ₂ O + 240 Bradford										
G	10 BSA + 240 Bradford	10 BSA + 240 Bradford	10 BSA + 240 Bradford										
H													

Anexo F

Dot-Blot

Preparación TBS 10x (1L)

Reactivo	Cantidad
Tris- Base	30g
Glicina	144.13g
Agua Destilada	Aforar a un 1lt.

Preparación TBS-Tween 1x (1L)

Reactivo	Cantidad
TBS 10x	100ml
Tween 20	500µl
Agua Destilada	Aforar a 1L.

Preparación Solución de Bloqueo al 5% (100ml)

Reactivo	Cantidad
Leche Descremada	5g
TBS-Tween 20	Aforar a 100ml

Preparación de Anticuerpo Primario (4-HNE y β Actina)

Anticuerpo	Reactivo	Cantidad
4-HNE (1:2000)	Abcam®- Anti-4 Hydroxynonenal antibody ab46545	10 μ l
	Solución de bloqueo 5%	20ml
β Actina (1:5000)	SIGMA-ALDRICH®- Monoclonal Anti- β -Actin, antibody produced in mouse- A5441	10 μ l
	Solución de bloqueo 5%	20ml

Preparación del Anticuerpo Secundario

Anticuerpo	Reactivo	Cantidad
4-HNE (1:1000)	Abcam®-Goat Anti- Rabbit IgG AP-ab97048	10 μ l
	Solución de bloqueo 5%	10ml
β Actina (1:20000)	SIGMA-ALDRICH®- Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase, antibody produced in goat, A-1862	1 μ l
	Solución de bloqueo 5%	20ml

Preparación de la solución cromogénica BCIP

Reactivo	Cantidad
Pastilla cromogénica (SIGMA-ALDRICH BCIP ®/NBT PCode:1002322161)	1
Agua Destilada	10ml

Nota: la solución de bloqueo y los anticuerpos tanto primarios y secundarios deben almacenarse a 4°C en congelador.

Procedimiento

1. Cortar membranas de nitrocelulosa en tiras (el largo se determinará por el número de muestras a analizar) y dividir en porciones iguales.
2. Colocar con micropipeta 5µl de muestra en cada una de las divisiones de la membrana.
3. Realizar el bloqueo de la membrana, durante 1 hora en agitación leve, a temperatura ambiente.
4. Lavar membranas con TBS-Tween 20 1x, 3 veces de 5 minutos cada uno.
5. Colocar el anticuerpo primario y dejar incubando en agitación por 18 horas a 5°C.
6. Recuperar el anticuerpo primario y realizar 3 lavados con TBS-Tween 20 1x de 5 minutos.
7. Colocar el anticuerpo secundario y dejar incubar por 2 horas en agitación a temperatura ambiente.
8. Recuperar el anticuerpo secundario, colocar las membranas en solución cromogénica, y bañar la membrana constantemente de esta solución hasta obtener una reacción colorimétrica.

Anexo G

Extracción de ARN.

- Tomar 50mg de tejido hepático en un tubo de microcentrifuga (2 ml).
- Añadir 500µl buffer de lisis (previamente mezclado con 2-mercapto etanol) y homogenizar.
- Agitar con vortex por 2 minutos.
- Centrifugar a 10000 rpm por 10 min a 4°C.

Carga de la columna.

- Agregar 100µl de buffer de activación en la columna de extracción.
- Centrifugar a 10000 rpm por 30 segundos.
- Descartar el filtrado

Activación de muestras.

- Agregar 300µl de isopropanol a la columna y agite con vortex durante 2 minutos.
- Colocar una columna de extracción en un tubo recolector de 2ml.
- Centrifugar a 10000 rpm por 30 segundos.
- Descartar el filtrado.

Lavado de la columna

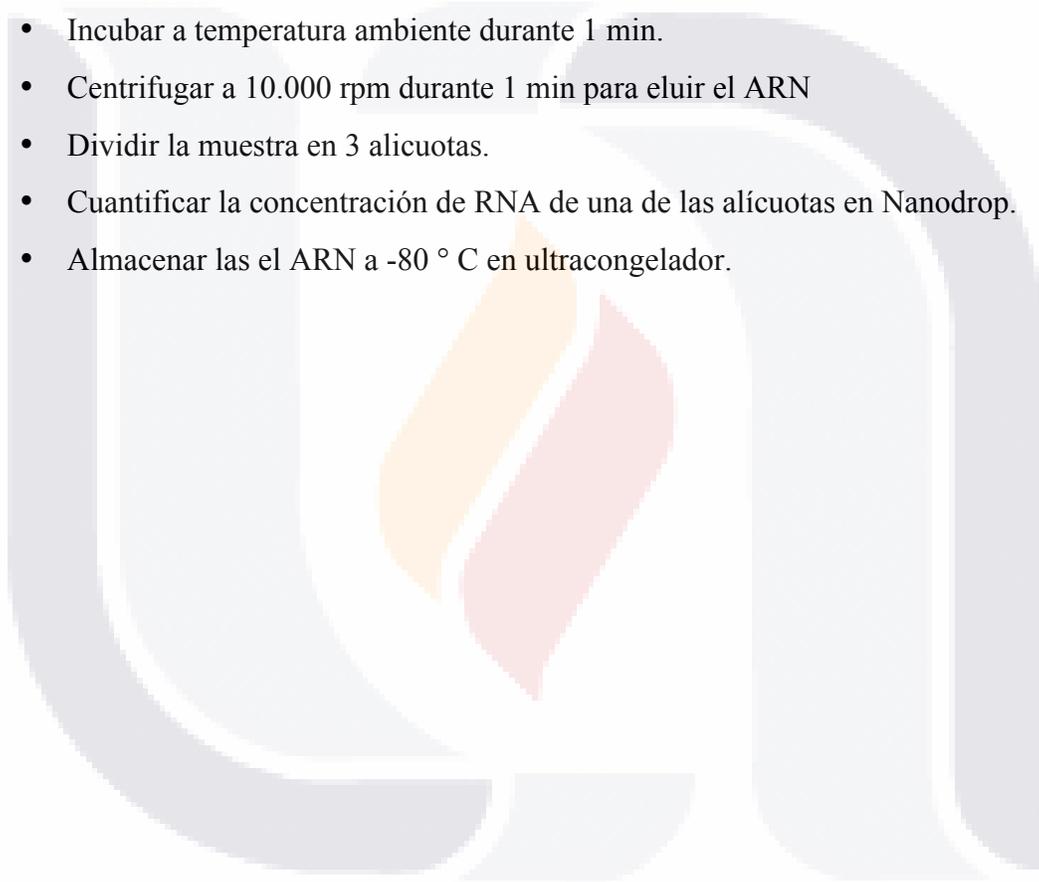
- Agregar 700µl del primer tampón de lavado (etanol añadido) a la columna de extracción.
- Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.
- Descartar el filtrado

Segundo lavado

- Agregar 700 µl de segundo tampón de lavado (etanol añadido) a la columna de extracción.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos.
 - Descartar el filtrado

Elución del ARN

- Colocar la columna de extracción en un tubo de microcentrífuga sin DNasa / RNasa.
 - Agregar 70µl de tampón de elución al centro de la membrana de la columna.
 - Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
 - Centrifugar a 10.000 rpm durante 1 min para eluir el ARN
 - Dividir la muestra en 3 alícuotas.
 - Cuantificar la concentración de RNA de una de las alícuotas en Nanodrop.
 - Almacenar las el ARN a -80 ° C en ultracongelador.
- 

Anexo H

Retrotranscripción de RNA

1. Colocar en un tubo para PCR (200 µl) 4 microlitros del RNA que se desee retrotranscribir, y agregar 1 microlitro de Oligo dT, para obtener un volumen total de 5 µl.
2. Calentar ésta mezcla en el termociclador a 70 °C durante 5 minutos.
3. Inmediatamente colocar el o los tubos en hielo por lo menos durante 5 minutos.
4. Centrifugar 10 segundos en microcentrifuga.
5. Conservar en hielo nuevamente hasta que sea agregado el mix de la Transcriptasa Reversa.

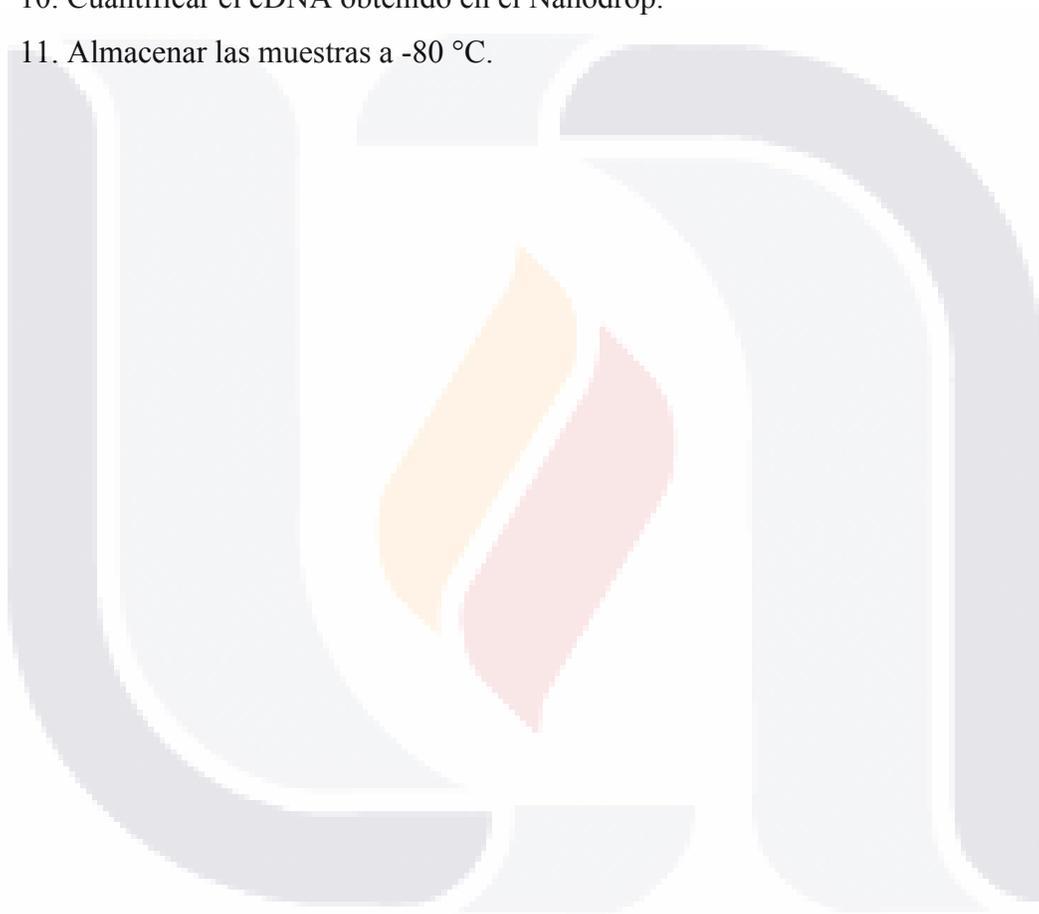
Preparación del Mix de Transcriptasa Reversa:

Reactivo	Cantidad
Buffer de Reacción 5X	4.0 µl
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	1.5 µl
Mezcla de Nucleotidos para PCR	1.0 µl
Inhibidor de Ribonucleasas	0.5 µl
Recombinante RNasin	
Transcriptasa Reversa	1.0 µl
Agua libre de Nucleasas	7.0 µl

Para obtener un volumen final de 15 µl para cada muestra de RNA que se quiera retrotranscribir.

NOTA: *Si se van a retrotranscribir varias muestras al mismo tiempo, puede prepararse un Master Mix que contenga el volumen total correspondiente de 15 µl para cada muestra de RNA (5 µl), y distribuir las cantidades exactas para obtener los volúmenes totales de 20 µl.*

6. Combinar los 15 μl del mix de transcriptasa reversa con los 5 μl iniciales del tubo de PCR.
7. **Alineación:** calentar en el termociclador a 25 °C durante 5 minutos.
8. **Extensión:** calentar en el termociclador a 42 °C durante 120 minutos.
9. **Inactivación de la Transcriptasa Reversa:** calentar en el termociclador a 70 °C durante 15 minutos (programa 16).
10. Cuantificar el cDNA obtenido en el Nanodrop.
11. Almacenar las muestras a -80 °C.



Anexo I

qPCR

Preparación de las muestras.

Tratamiento	Dilución	cDNA	Agua Grado PCR
Con Curcumina	1:8	1µl	7µl
Sin Curcumina	1:11	1µl	10µl

Preparación de qPCR master mix (10µl)

Reactivo	Cantidad
qPCR Green Master with UNG	5µl
Primer Forward (10µM) ¹⁾	1µl
Primer Reverse (10µM) ¹⁾	1µl
cDNA Muestra diluida	1µl
Agua grado PCR	2µl

Diseño de Oligos

Factores de Transcripción	Sentido	Diseño
Nrf2	Forward	3'GCAAGATGGAGGAGAACGAG5'
	Reverse	5' CCTCCAGCAGCCTAAGACAC 3'
NFκB	Forward	3'CAGGAGCCTCAAACCTGAAG 5'
	Reverse	5' CGTCTGTGGGAGAGAAGTCC 3'
Actina	Forward	3' GCCCAGAGCAAGAGAGGTAT5'
	Reverse	5' CACGCAGCTCGTTGTAGAAG 3'

Preparación de Oligos.

Reactivo	Cantidad
Oligo (Nrf2, NFκB, Actina)	1μl
Agua grado PCR	19μl

Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real. qPCR.

1. Preparar las diluciones de las muestras a evaluar.
2. Utilizar las muestras diluidas y preparar el Master mix.
3. Colocar las muestras en placas especiales para PCR.
4. Centrifugar las placas en microcentrifuga para PCR (1 spin de aprox 30 segundos).
5. Colocar las placas en equipo para qPCR.
6. **Alineación:** 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 3 minutos,
7. **Alineamiento:** 95°C durante 30 segundos, 62°C durante 40 segundos.
8. **Elongación:** 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos.
9. Establecer pasos 6, 7 y 8 a 40 ciclos.