

Centro De Ciencias Básicas

Departamento de Química

Efecto protector de la curcumina en línea celular HepG2 ante la posible citotoxicidad de doxazosina, carvedilol y tamsulosina, estudio *in vitro*

T E S I S QUE PRESENTA

Mariana Yazmin Medina Pizaño

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Maestra en Ciencias en Área de Toxicología

Comité Tutoral:

Dr. Javier Ventura Juárez

Dr. José Luis Quintanar Stephano

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega

Aguascalientes, Ags., a 30 de noviembre 2020

AUTORIZACIONES

CARTA DE VOTO APROBATORIO INDIVIDUAL

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS

PRESENTE

Por medio del presente como *TUTOR* designado del estudiante *MARIANA YAZMIN MEDINA PIZAÑO* con ID *133207* quien realizó *la tesis* titulado: *EFECTO PROTECTOR DE LA CURCUMINA EN LÍNEA CELULAR HEPG2 ANTE LA POSIBLE CITOTOXICIDAD DE DOXAZOSINA, CARVEDILOL Y TAMSULOSINA, ESTUDIO IN VITRO*, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que *ella* pueda proceder a imprimir*la* 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.

A T E N T A M E N T E

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 16 de noviembre de 2020.

Javier Ventura Juárez

Tutor de tesis

El nombre completo que aparece en el Voto Aprobatorio debe
coincidir con el que aparece en el documento empastado. No se puede abreviar, ni omitir nombres

c.c.p.- Interesado c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado. Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad. Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07 Actualización: 01 Emisión: 17/05/19



CARTA DE VOTO APROBATORIO INDIVIDUAL

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS

PRESENTE

Por medio del presente como *TUTOR* designado del estudiante *MARIANA YAZMIN MEDINA PIZAÑO* con ID 133207 quien realizó *la tesis* titulado: *EFECTO PROTECTOR DE LA CURCUMINA EN LÍNEA CELULAR HEPG2 ANTE LA POSIBLE CITOTOXICIDAD DE DOXAZOSINA, CARVEDILOL Y TAMSULOSINA, ESTUDIO IN VITRO*, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que *ella* pueda proceder a imprimir*la* 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.

A T E N T A M E N T E

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 16 de noviembre de 2020.

José Luis Quintanar Stephano Tutor de tesis

El nombre completo que aparece en el Voto Aprobatorio debe coincidir con el que aparece en el documento empastado. No se puede abreviar, ni omitir nombres

c.c.p.- Interesado c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado. Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad. Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado. Código: DO-SEE-FO-07 Actualización: 01 Emisión: 17/05/19

CARTA DE VOTO APROBATORIO INDIVIDUAL

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS

PRESENTE

Por medio del presente como *TUTOR* designado del estudiante *MARIANA YAZMIN MEDINA PIZAÑO* con ID 133207 quien realizó *la tesis* titulado: *EFECTO PROTECTOR DE LA CURCUMINA EN LÍNEA CELULAR HEPG2 ANTE LA POSIBLE CITOTOXICIDAD DE DOXAZOSINA, CARVEDILOL Y TAMSULOSINA, ESTUDIO IN VITRO*, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que *ella* pueda proceder a imprimir*la* 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.

A T E N T A M E N T E

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 17 de Noviembre de 2020.

Mortin Hunserto munos o.

Martin Humberto Muñoz Ortega Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado. Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad. Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado. Código: DO-SEE-FO-07 Actualización: 01 Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAIVITES DEL EXAMEN DE GRADO

20/11/20

Fecha de dictaminación dd/mm/aa: ID 133707 NOMBRE: Mariana Yazmin Medina Pizaño LGAC (del ESTUDIO DE PROTEÍNAS DE LA RESPUESTA INMUNE Maestría en Ciencias del Área Biotecnología Vegetal o Toxicología PROGRAMA: posgrado): TIPO DE TRABAJO: (x) Tesis) Trabajo práctico Efecto protector de la curcumina en linea celular HepG2 ante la posible citotoxicidad de doxazosina, carvedilol y tamsulosina, estudio in vitro TITULO: IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): comprender los mecanismos de acción de medicamentos con posible INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA: Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico: El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario SI SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda SI SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnologíca o profesional según el área SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país NO Generó transferecia del conocimiento o tecnológica El egresado cumple con lo siguiente: Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc) SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutoral, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutorpodrá liberar solo el tutor SI NO Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario SI Coincide con el título y objetivo registrado 51 Tiene congruencia con cuerpos académicos Tiene el CVU del Conacyt actualizado SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda) NO En caso de Tesis por artículos científicos publicados: Aceptación o Publicación de los articulos según el nivel del programa El estudiante es el primer autor El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabao de investigación. Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto Si XX Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado FIRMAS Elaboró: * NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCION: JAVIER VENTURA JUÁRE NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: DR. EUGENIO MARTIN PÉREZ MOLPHE BALCH * En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miem Revisó: AYDEE MARTINEZ RUVALCABA NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO: Autorizó: M. en C. JORGE MARTIN ALFÉREZ CHÁVEZ NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docenda que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eliciencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario

Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico para llevar a cabo la maestría, a la Universidad Autónoma de Aguascalientes y Centro de Ciencias Básicas por la ayuda a lo largo del proceso del posgrado.

A mi Comité Tutoral, por sus enseñanzas durante la Tesis.

Dr. Javier Ventura Juárez por su apoyo y enseñanza hasta el final de este proyecto.

Dr. José Luis Quintanar Stephano por su retroalimentación y conocimiento para la realización del trabajo.

Dr. Martin Humberto Muñoz Ortega por tenerme tanta paciencia y confianza en el camino, gracias por sus consejos por y alentarme a aprender.

A mis compañeros de la maestría y un especial agradecimiento a Marina Nayeli Medina Rosales por todo su constante apoyo y motivación desde el inicio del proyecto hasta que se concluyó.

Agradezco también a Adriana Cuellar por el apoyo con recursos y espacio en su laboratorio.



DEDICATORIAS

Con todo el amor para mis padres, Carlos Mario Medina Acevedo y María de la Paz Pizaño Galindo que, con su apoyo, amor y motivación esta meta se cumplió. Gracias a ustedes he llegado hasta aquí, son mi ejemplo por seguir y cada éxito será dedicado a ustedes.

A mi hermano, Mauricio Medina Pizaño por animarme con tu sentido del humor y estar siempre dispuesto a enseñarme.

A Raúl Lucero por tu cariño y paciencia, te amo.



INDICE GENERAL

| ĺ١ | NDICE | DE TABLAS | 4 |
|----|-----------------|---|------|
| ĺ١ | NDICE | DE FIGURAS | 5 |
| Α | CRÓN | IIMOS | 5 |
| R | ESUM | IEN EN ESPAÑOL | 8 |
| R | ESUM | IEN EN INGLÉS | 9 |
| 1 | INT | RODUCCIÓN | .10 |
| | 1.1 | Estrés oxidativo como principal factor de citotoxicidad celular | .10 |
| | 1.2 | Fuentes celulares de ROS | .11 |
| | 1.3 | Estrés oxidativo | .12 |
| | 1.4 | Efectos de estrés oxidativo en ADN | .12 |
| | 1.5 | Efectos de estrés oxidativo en proteínas | .13 |
| | 1.6 | Antioxidantes | .14 |
| | 1.7 | Clasificación de antioxidantes | .14 |
| | 1.8 | Nrf2 regula a la alza la proteína anti apoptótica Bcl-2 y previene la apoptosis | .15 |
| | 1.9 | Susceptibilidad de los hepatocitos al estrés oxidativo | . 17 |
| | 1.10 | Doxazosina | .19 |
| | 1.11 | Carvedilol | .21 |
| | 1.12 | Tamsulosina | |
| | 1.13 | Curcumina | .24 |
| 2 | AN ⁻ | TECEDENTES | . 26 |
| | 2.1 | Medicamentos experimentales utilizados para revertir la fibrosis hepática | .26 |
| | 2.2 | Doxazosina y carvedilol tratamiento antifibrótico | . 27 |
| | 2.3 | Citotoxicidad de doxazosina y tamsulosina como nueva propuesta | .28 |
| | 2.4 | Curcumina y marcadores genéticos de estrés oxidativo | .28 |
| | 2.5 | Repoblación del hígado fibrótico por células madre y hepatocitos remanentes. | .30 |

TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS

| 3 | JU | STIFICACION | 31 |
|---|------|--|---------|
| 4 | HIF | PÓTESIS | 32 |
| 5 | ОВ | JETIVOS | 32 |
| | 5.1 | Objetivo General | 32 |
| | 5.2 | Objetivos Particulares | 32 |
| 6 | PR | EGUNTAS DE INVESTIGACIÓN | 33 |
| 7 | MA | TERIALES Y METODOS | 34 |
| | 7.1 | Diseño experimental | 34 |
| | 7.2 | Cultivo celular | 35 |
| | 7.3 | Tratamientos con doxazosina, carvedilol y tamsulosina | 35 |
| | 7.4 | Prueba de viabilidad celular (MTT) | 35 |
| | 7.5 | Determinación cuantitativa de transaminasas (AST y ALT) | 36 |
| | 7.6 | Tinción de hematoxilina/eosina | 36 |
| | 7.7 | Microscopia electrónica de barrido | 36 |
| | 7.8 | Tinción de naranja de acridina | 37 |
| | 7.9 | Tinción de SYTOX green | 37 |
| | 7.10 | Extracción de ARN | 37 |
| | 7.11 | Cuantificación de ARN total | 38 |
| | 7.12 | Evaluación de la Integridad del ARN | 38 |
| | 7.13 | Retotranscripción de ARN | 38 |
| | 7.14 | Análisis por PCR en tiempo real | 39 |
| | 7.15 | Análisis Estadístico | 40 |
| 8 | RE | SULTADOS | 41 |
| | 8.1 | Citotoxicidad de los antagonistas de los receptores α y β adrenérgicos | 41 |
| | 8.2 | Determinación de pretratamiento de curcumina | 44 |
| | 8.3 | Curcumina inhibe la citotoxicidad inducida por antagonistas de los recepto | res α y |
| | βadr | enérgicos | 45 |

| 8.4 | Determinación de transaminasas (AST y ALT) | 48 |
|-------|--|-----|
| 8.5 | Efectos de α y β adrenobloqueadores en la monocapa de las células HepG2 | 49 |
| 8.6 | Efectos ultraestructurales de las células HepG2 | 51 |
| 8.7 | Evaluación de la expresión genética de marcadores de estrés oxidativo en célu | las |
| HepC | G2 y detección de apoptosis | 53 |
| 9 DIS | SCUSIÓN | 60 |
| 10 (| CONCLUSIONES | 69 |
| 11 E | BIBLIOGRAFÍA | 70 |
| APÉND | DICE | 84 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno | 10 |
|---|----|
| Tabla 2. Objetivos moleculares de la curcumina | 25 |
| Tabla 3. Condiciones de la mezcla de reacción para síntesis de cADN. | 38 |
| Tabla 4. Condiciones de la mezcla de reacción para síntesis de cADN. | 39 |
| Tabla 5. Protocolo del termociclador para síntesis de cADN | 39 |
| Tabla 6. Condiciones de la mezcla de reacción de PCR en tiempo real | 39 |
| Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para RT-PCR | 40 |
| Tabla 8. Solución madre de doxazosina, tamsulosina y carvedilol | 84 |
| Tabla 9. Concentración y pureza de ARN de células HepG2 con α/β adrenobloqueadores | 86 |
| Tabla 10. Concentración y pureza de ARN de células HepG2 con α/β adrenobloqueadores | en |
| cotratamiento con curcumina | 87 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura 1. Principales fuentes de producción de especies reactivas de oxígeno |
|---|
| Figura 2. MicroARN oxidado puede cambiar la especificidad de ARNm |
| Figura 3. Efectos de las especies reactivas de oxígeno en células del hígado |
| Figura 4. Estructura de doxazosina |
| Figura 5. Estructura de carvedilol |
| Figura 6. Estructura de tamsulosina |
| Figura 7. Los tautómeros de la curcumina |
| Figura 8. Comparación estructural de los α-adrenobloqueadores doxazosina y tamsulosina 28 |
| Figura 9. Curcumina activa Nrf2 y causa la transcripción de genes involucrados en la respuesta de estrés oxidativo |
| Figura 10. Diseño experimental del proyecto |
| Figura 11. Doxazosina reduce viabilidad celular en la línea celular HepG241 |
| Figura 12. Carvedilol induce proliferación de las células HepG2 |
| Figura 13. Tamsulosina mantiene la viabilidad y posiblemente induce proliferación en la línea celula HepG2 |
| Figura 14. Hormesis de curcumina en células HepG2 |
| Figura 15. La curcumina reduce la citotoxicidad en las células HepG2 tratadas con doxazosina 45 |
| Figura 16. La curcumina regula la proliferación en las células HepG2 tratadas con carvedilol 46 |
| Figura 17. La curcumina mantiene la viabilidad en las células HepG2 tratadas con tamsulosina 47 |
| Figura 18. Cambios en la permeabilidad celular durante el tratamiento con los α y (adrenobloqueadores mediante la determinación de AST y ALT |

TESIS TESIS TESIS TESIS

| Figura 19. La curcumina controla la liberación de enzimas de daño celular AST y ALT por un posible |
|--|
| cambio en la permeabilidad |
| Figura 20. Efectos de doxazosina, carvedilol y tamsulosina sobre la integridad de la monocapa de la línea celular HepG2 |
| Figura 21. La curcumina protege la integridad de la monocapa durante una interacción con los medicamentos ya probados antifibróticos |
| Figura 22. Efectos ultraestructurales de doxazosina, carvedilol y tamsulosina sobre las células HepG2 |
| Figura 23. La curcumina reduce las variaciones morfológicas relacionadas con daño celular ocasionadas por los fármacos α y β adrenobloqueadores |
| Figura 24. Validación de la integridad de RNA y especificidad de los oligonucleotidos para blancos y constitutivos |
| Figura 25. Curva de fusión y grafica de amplificación de RT-PCR de expresión de 18srRNA en células HepG2 en tratamiento con α/β adrenobloqueadores en ausencia y presencia de curcumina |
| Figura 26. Curva de fusión y grafica de amplificación de RT-PCR de expresión de Bcl-2 en células HepG2 en tratamiento con α/β adrenobloqueadores en ausencia y presencia de curcumina 55 |
| Figura 27. Efecto protector de la curcumina en el co-tratamiento con doxazosina mediante la posible activación de marcadores de regulación de estrés oxidativo |
| Figura 28. El co-tratamiento de carvedilol y curcumina afecta la activación de marcadores de regulación de estrés oxidativo y las células son susceptibles al proceso de apoptosis |
| Figura 29. El co-tratamiento de curcumina con tamsulosina no altera los marcadores de regulación de estrés oxidativo y por lo tanto no se inicia el proceso apoptótico regulado por Bcl-2 |
| Figura 30. Mecanismos citotóxicos propuestos a los α-antagonistas basados en quinazolina 62 |

ACRÓNIMOS

Alfa α β Beta μl Microlitro

18SrRNA Ácido ribonucleico ribosómico 18S

ADN Ácido desoxirribonucleico ALT Alanina transaminasa **ARN** Ácido ribonucleico **AST** Aspartato transaminasa Proteína X asociada a Bcl-2 Bax Bcl-2 Linfoma de células B-2 CCI₄ Tetracloruro de carbono

c-MYC Gen involucrado en la proliferación celular

 CO_2 Dióxido de Carbono

CYP Citocromo

Medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose DMEM

DMSO Dimetilsulfóxido

GSH glutatión

 H_2O_2 Peróxido de hidrogeno HMOX1 Hemo Oxigenasa 1

Hiperplasia prostática benigna HPB Keap1 Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch **MEB** Microscopia electrónica de Barrido MDA Plasma de malondialdehído

Bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo MTT

Nrf2 Factor Nuclear (Derivado de Eritroide 2) Similar al 2

TESIS TESIS TEŠIS TESIS TE:

 O_2

O₂-• Anión superóxido radical O_2^{1} Oxigeno molecular

 O_3 Ozono

Radical hidroxilo OH. **PBS** Buffer Fosfato Salino

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

Oxidación-reducción Redox

ROS Especies reactivas de oxígeno

KO. Radical alcoxi ROO' Radical peroxilo **ROOH** Hidroperóxido orgánico Borato de sodio SB **SBF** Suero Bovino Fetal

SNS Sistema nervioso simpático SOD Super Oxido Dismutasa

RESUMEN EN ESPAÑOL

Los α/β adrenobloqueadores (doxazosina y carvedilol) se probaron como un tratamiento alternativo para lesiones hepáticas crónicas como fibrosis y/o cirrosis y para una posible regeneración de la cirrosis hepática en un modelo de hámster. Sin embargo, se observó que la doxazosina causó ligeros cambios morfológicos en los hepatocitos, mientras que la curcumina mostró protección al parénquima hepático. Sin embargo, se desconocen los efectos farmacocinéticos de estos α/β adrenobloqueadores en la viabilidad celular de los hepatocitos restantes, posiblemente involucrados en la repoblación del parénquima hepático durante la reversión de la cirrosis. El presente estudio fue diseñado para dilucidar en la línea celular HepG2 el efecto protector de la curcumina sobre los posibles efectos secundarios de la doxazosina tamsulosina y el carvedilol ya probados con actividad antifibrótica. La prueba de viabilidad (MTT) confirmó que la doxazosina disminuye la viabilidad celular en función del tiempo y la dosis, el carvedilol y la tamsulosina aumentan la proliferación celular, sin embargo, la curcumina regula estos mecanismos en la línea celular HepG2, aumentando o manteniendo la viabilidad en comparación con el control. El microscopio electrónico de barrido y la tinción con hematoxilina y eosina proporcionaron evidencia de que la doxazosina, el carvedilol y la tamsulosina inducen cambios morfológicos dependientes del tiempo y la dosis en la línea celular HepG2, aproximadamente el 80% de las células están balonizadas y la curcumina protege estos efectos secundarios manteniendo la morfología en el 90% de Las células tratadas. La curcumina disminuye los cambios morfológicos y regula la viabilidad celular en las células tratadas con doxazosina, tamsulosina y carvedilol. Por otra parte, posiblemente los α/β adrenobloqueadores produzcan daño celular (dirigido a apoptosis) debido al estrés oxidativo y la curcumina activa mecanismos antioxidantes reduciendo la muerte celular, de esta manera se evalúo BCL-2 y se realizó el ensayo con naranja de acridina, observando coincidencia en la disminución de la expresión de BCL-2 con los cambios morfológicos en las células hepáticos mostrados por la Doxazosina.

RESUMEN EN INGLÉS

The α/β adrenoblockers (doxazosin and carvedilol) were tested as an alternative treatment for chronic liver injury such as fibrosis and/or cirrhosis and for possible regeneration of the liver cirrhosis in a model of hamster. However, it was observed that doxazosin caused slight morphological changes in hepatocytes, while that curcumin showed protection to the hepatic parenchyma. Regardless, the pharmacokinetic effects of these α/β adrenoblockers on the cell viability of the remaining hepatocytes, possibly involved in the repopulation of the hepatic parenchyma during cirrhosis reversal, are unknown. The present study was designed to elucidate in the HepG2 cell line the protective effect of curcumin on the possible side effects of doxazosin tamsulosin and carvedilol already tested with antifibrotic activity. The viability test (MTT) confirmed that doxazosin decreases the cell viability dependently time and dose, carvedilol and tamsulosin increases cell proliferation, however, curcumin regulates these mechanisms in HepG2 cell line, increasing or maintaining viability compared to control. Scanning electron microscope and hematoxylin and eosin staining provided evidence that doxazosin, carvedilol and tamsulosin induces morphological changes dependently of time and dose in HepG2 cell line, approximately 80% of the cells are balonized and curcumin protect this side effects maintaining the morphology in 90% of the treated cells. Curcumin decreases morphological changes and regulates cell viability in treated cells with doxazosin, tamsulosin and carvedilol. On the other hand, possibly α / β adrenoblockers produce cell damage (directed to apoptosis) due to oxidative stress and curcumin activates antioxidant mechanisms reducing cell death, in this way BCL-2 was evaluated and the test with acridine orange was carried out, observing coincidence in the decrease of the expression of BCL-2 with the morphological changes in liver cells shown by Doxazosin.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Estrés oxidativo como principal factor de citotoxicidad celular

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son moléculas conocidas por ser altamente reactivas, ya que tienen un electrón libre o desapareado en su órbita exterior que las convierte en inestables. Tiene la capacidad de retener un electrón de las moléculas disponibles con el objetivo de lograr estabilidad electroquímica. Se producen de manera normal como resultado del metabolismo celular normal y factores ambientales, pueden desestabilizar los ácidos nucleicos y las proteínas (Gupta et al., 2014).

Existen otras especies reactivas que tienen impacto en las reacciones redox como las especies reactivas de nitrógeno (RNS) que tienen radicales como el óxido nítrico (NO¹) y el dióxido nítrico (NO₂¹), y no radicales como el ácido nitroso (HNO₂) y el tetróxido de dinitrógeno (N₂O₄) (del Río, 2015).

Pueden generarse otros oxidantes por reducción de un electrón de compuestos adecuados, en particular de naturaleza quinona. La semiquinona resultante puede autooxidarse, generando el radical anión superóxido por transferencia de electrones. Por lo tanto, la quinona regenerada puede sufrir otra ronda de reducción de un electrón en un proceso denominado ciclo redox (Kappus & Sies, 1981).

Existen dos tipos de ROS, los radicales libres y los no radicales (Tabla 1), los más importantes son el anión superóxido (O_2^{\bullet}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) , que son generados por enzimas específicas o como subproductos durante procesos moleculares, son moléculas de señalización importantes que pueden contribuir a la progresión de la enfermedad hepática (Luangmonkong et al., 2018). Las especies reactivas de oxígeno tienen un amplio rango de reactividad y diversa naturaleza química (Gupta et al., 2014).

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno.

| Radicales libres | No radicales |
|---|--|
| Anión superóxido radical (O ₂ -) | Peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂) |
| Radical hidroxilo (OH*) | Hidroperóxido orgánico (ROOH) |
| Radical peroxilo (ROO*) | Oxigeno molecular (O ₂ 1) |
| Radical alcoxi (RO*) | Ozono (O ₃) |

1.2 Fuentes celulares de ROS

En los seres vivos, las especies reactivas de oxígeno se producen en diferentes sistemas por lo general ubicados en la membrana plasmática, citosol, peroxisomas, membranas mitocondriales y retículo endoplásmico.

En el citosol los tioles, hidroquinonas, catecolaminas y flavinas son los encargados de aumentar la producción de ROS intracelulares por las reacciones redox. También existe la enzimas xantina oxidasa responsable de la mayor producción de ROS (Di Meo, Reed, Venditti, & Victor, 2016).

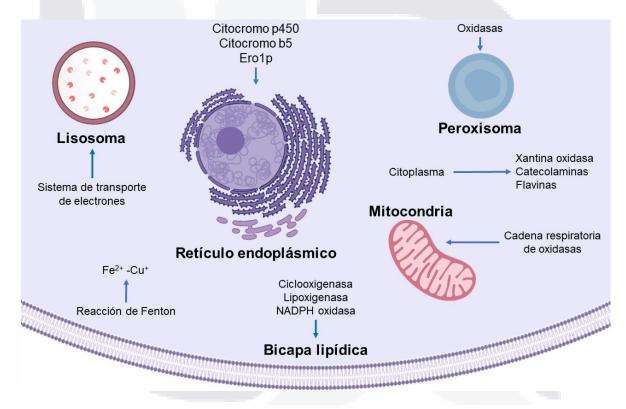


Figura 1. Principales fuentes de producción de especies reactivas de oxígeno. Diferentes organelos subcelulares, sus componentes estructurales y solubles contribuyen a la producción de especies reactivas. Imagen modificada de (Di Meo et al., 2016).

Durante años las mitocondrias solo se consideraban importantes por su rol en la producción de energía, sin embargo, se ha descrito que son necesarias para la respiración y producción de energía oxidativa, además de la regulación de la concentración de calcio intracelular y la oxidación de los ácidos grasos (Di Meo et al., 2016). En la respiración los centros de redox se conforman de cuatro complejos proteicos en la membrana mitocondrial

interna, el complejo I y II son los encargados de transferir electrones al transportador soluble en ubiquinona, después los electrones atraviesan el complejo III, el citocromo c y el complejo IV hasta llegar al oxígeno. Cuando ocurre un decremento de energía potencial de los electrones se almacenan protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal (Klimova, Fearnow, & Kristian, 2020). Este proceso de regresión de los protones a la matriz por medio de ATP sintasa mitocondrial que resulta en síntesis de ATP es llamado fosforilación oxidativa (Arechaga & Fotiadis, 2007).

Se ha relacionado a la mitocondria con los procesos patógenos y de envejecimiento debido al descubrimiento de relación entre la transferencia de electrones a lo largo de los transportadores de la membrana mitocondrial interna y la formación de ROS. Con la autooxidación mitocondrial de los transportadores de electrones tiene como resultado el O2⁻⁻ que después es transformado por la SOD mitocondrial en H₂O₂ y con la reacción de Fenton puede convertirse en un radical *OH (Turrens & Boveris, 1980).

Es importante conocer la localización de los productores de ROS para determinar los posibles efectos de los ROS, en el complejo I y II cuando se libera O2⁻⁻ en la matriz puede resultar en daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial y transportarse al citosol (Brand, 2010).

1.3 Estrés oxidativo

El inicio del uso del término "estrés oxidativo" fue acuñado por primera vez por (H. Sies & Cadenas, 1985) como un concepto en la biología y la medicina de reacciones de oxido reducción. Se define como "un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, donde los oxidantes son mayores que los antioxidantes y surge la interrupción de la señalización y control redox y daño molecular". En el metabolismo existe un equilibrio redox en estado estacionario que suministra un estado redox basal y un desequilibrio de este se considera estrés que puede incitar una respuesta (H Sies, Berndt, & Jones, 2017).

1.4 Efectos de estrés oxidativo en ADN

Los principales efectos del estrés oxidativo en ADN son la oxidación, hidrolisis y metilación que resulta en la inestabilidad y fragmentación (H Sies et al., 2017). Freudenthal et al., (2015) demostró que el nucleósido 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina que se encuentra en el ADN como 8-oxo-G y como en forma de nucleótido libre (8-oxo-dGTP) es

el propenso a oxidación. Estos nucleótidos son especialmente vulnerables al daño oxidativo y codifican una enzima llamada MutT/MTH1 que se encarga de eliminar los nucleótidos oxidados libres como control ante el estrés oxidativo.

Sin embargo, el estrés oxidativo también tiene efectos negativos en el ácido ribonucleico (ARN), Wang et al., (2015) informaron que los microARN (miARN) que son ARN no codificantes tienen la capacidad de unirse a secuencias complementarias en las tres regiones principales no traducidas (3'UTR) del ARNm encargado de su traducción o degradación, pueden ser modificados por ROS, el miR-184 por medio de oxidación sufre cambios y se une a las regiones 3'UTR de Bcl-xL y Bcl-w lo que evita su traducción. Bcl-xL y Bcl-w son una familia de proteínas que actúan como respuesta anti-apoptótica si las células sufren oxidación la traducción de estas proteínas es inhibida y se inicia el proceso apoptótico, esto fue demostrado en experimentos en una línea celular de corazón de rata (H9c2) y en modelos *in vivo* (Figura 2).

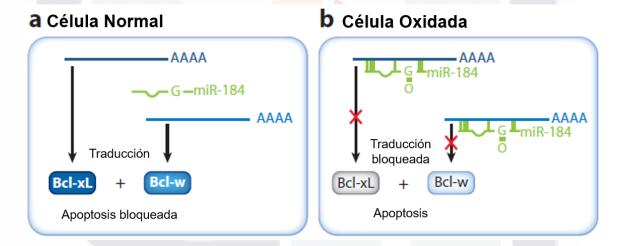


Figura 2. MicroARN oxidado puede cambiar la especificidad de ARNm. MicroARN-184 no se une a 3'-UTRs de Bcl-xL y Bcl-w, permitiendo la traducción que bloquea la apoptosis en las células normales. En células oxidadas la guanina se oxida en microARN-184 y causa falta de reconocimiento del 3'-UTRs de Bcl-xL y Bcl-w que resulta en apoptosis. Imagen modificada de (Wang et al., 2015).

1.5 Efectos de estrés oxidativo en proteínas

El estrés oxidativo en las proteínas se relaciona con modificaciones postraduccionales, que pueden ser causadas debido a modificaciones reversibles o irreversibles. Las reversibles son modificaciones de la proteína cisteína, el proceso inicia con la oxidación de la cisteína y la formación de ácido sulfónico que aumenta la formación

de productos de oxidación como: disulfuro, s-glutationilación, nitrosilación, que presentan funciones similares a ROS (Cai & Yan, 2013).

Las modificaciones irreversibles incluyen la carbonilación de proteínas y nitración de tirosina y ambas están relacionadas con el estrés oxidativo. Los carbonilos de proteína que son formados en residuos aminoácidos sirven como biomarcador de daño por estrés oxidativo (Wehr & Levine, 2013). La nitrotirosina se forma entre especies reactivas de nitrógeno y el residuo tirosina de una proteína, sin embargo, esta modificación es altamente especifica ya que no todas las proteínas o tirosinas pueden nitrarse, sin embargo, también se considera como marcador de estrés oxidativo (Radi, 2013).

1.6 Antioxidantes

El término "antioxidante" se define como una molécula capaz de estabilizar o desactivar los radicales libres antes de que dañen las células (Rahman, 2007). Los antioxidantes tienen la capacidad de reducir o prevenir la oxidación del sustrato oxidable en las células (Kurutas, 2016). Existen sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que gracias a su sinergia pueden dar protección a la células y órganos contra el estrés oxidativo. Los antioxidantes pueden ser endógenos o exógenos. La característica más importante de un antioxidante es que debe absorberse fácilmente y eliminar los radicales libres y quelar los metales redox a niveles fisiológicos (Valko et al., 2007).

1.7 Clasificación de antioxidantes

Los antioxidantes se dividen en enzimáticos y no enzimáticos. Los enzimáticos más importantes son glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (Matés et al., 1999). Los no enzimáticos incluyen vitamina E y C, antioxidantes tiol (glutatión, tiorredoxina), carotenoides, flavonoides entre otros (Jiang, 2014).

Las peroxidasas de glutatión catalizan la oxidación del glutatión de un hidroperóxido que se transforma en peróxido de hidrogeno a un hidroperóxido lipídico:

Los hidroperóxidos lipídicos también son capaces de comportarse como sustratos para estas enzimas, y pueden tener un papel en la reparación del daño que causa la

peroxidación de lípidos. Existen dos formas de la enzima una dependiente de selenio y la independiente (Molavian et al., 2015).

La **catalasa** fue la primera enzima antioxidante que fue caracterizada y es la que cataliza la conversión de peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno.

$$H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Esta enzima tiene cuatro subunidades, en cada una tiene un grupo hemo y una molécula de NADPH. Se encuentra en el peroxisoma y es altamente eficaz en la conversión de peróxido de hidrogeno en agua y oxigeno molecular. Su mayor actividad está en el hígado (Sies, 2015).

La **superóxido dismutasa** (SOD) es uno de los antioxidantes intracelulares más poderosos ya que cataliza la conversión de aniones superóxido en dióxido y peróxido de hidrogeno con la siguiente reacción:

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

El peróxido de hidrogeno se elimina mediante la catalasa o la **glutatión peroxidasa**. La superóxido dismutasa tiene diferentes isoformas que difieren en el centro metálico activo, la composición de aminoácidos y cofactores. La enzima neutraliza los iones superóxido a través de los ciclos sucesivos de oxidación y reducción de iones de metales de transición en su sitio activo (Sheng et al., 2014).

1.8 Nrf2 regula a la alza la proteína anti apoptótica Bcl-2 y previene la apoptosis

El complejo Keap1 inhibidor de Nrf2 sirve como sensor del estrés oxidativo y electrofílico inducido por radiación y sustancias químicas (Kaspar et al., 2009). Nrf2 se encuentra principalmente en el citoplasma donde interactúa con la proteína citosólica proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Keap1) asociada a actina. Esta proteína es una adaptadora de sustrato para el complejo de ubiquitina ligasa E3 encargada de ubiquitinizar a Nrf2 y mantener una concentración basal de esta proteína. El mecanismo por el cual Nrf2 es liberado de Keap1 se debe a la presencia de estrés oxidativo de Keap1Cis-151 seguido de la fosforilación de Nrf2Ser-40 mediada por PKCδ que resulta en la liberación y estabilización de Nrf2 (Niture et al., 2009).

Después de su liberación Nrf2 se transloca al núcleo y activa de manera coordinada la transcripción de una cascada de proteínas citoprotectoras que incluyen NAD(P)H: quinona oxidorreductasa 1 (NQO1) y hemo oxigenasa 1 (HO-1), debido a la unión de Nrf2 al elemento de respuesta antioxidante (ARE) presente en las regiones promotoras de genes citoprotectores (Kaspar et al., 2009). También existe una activación retardada que controla la inactivación de Nrf2, GSK3 fosforila la tirosina proteína quinasa Fyn y Src en residuos de treonina, y los transloca al núcleo y pueden fosforilar Nrf2 y se puede exportar al núcleo

(Niture et al., 2011).

La regulación de Nrf2 conduce a la supervivencia celular y la protección contra el estrés oxidativo inducido por sustancias químicas y radiaciones, inflamación y neoplasia (Copple et al., 2008). De hecho, la acumulación de pruebas *in vivo* ha demostrado la importancia de Nrf2 en la protección de las células de los efectos tóxicos y cancerígenos. Enomoto et al., en (2001) analizaron que los ratones que tenían el gen Nrf2 inactivado eran propenso a sufrir daños agudos inducidos por acetaminofén, ovoalbúmina, humo de cigarrillo, pentaclorofenol y diepóxido de 4-vinilciclohexeno y habían aumentado la formación de tumores cuando se expuso a carcinógenos como benzo[a]pireno, gases de diésel y N-nitrosobutil (4-hidroxibutil) amina.

Diversos estudios indican que Nrf2 es un regulador maestro de la activación transcripcional impulsada por ARE para genes antioxidantes en el mantenimiento de la homeostasis del estado redox dentro de las células (Suryakant K. Niture et al., 2009).

Se sugiere que el papel de Nrf2 en la resistencia a fármacos es muy importante porque puede activar las enzimas antioxidantes y transportadoras de fármacos (Goel & Aggarwal, 2010). Sin embargo, no se conoce del todo el mecanismo de muerte celular apoptótica mediada por Nrf2. Las proteínas de la familia Bcl-2, que comprenden más de seis miembros anti apoptóticos, incluido Bcl-2 y muchos miembros proapoptóticos, regulan la muerte y supervivencia celular (Boise et al., 1993). (Suryakant K. Niture & Jaiswal, 2012) investigaron el mecanismo de regulación positiva de Nrf2 hacia Bcl-2 y como disminuye la apoptosis y genera resistencia a fármacos.

1.9 Susceptibilidad de los hepatocitos al estrés oxidativo

Una patología muy conocida en hígado donde se da amplio daño celular por el estrés oxidativo generado es la fibrosis hepática que es una repuesta a diferentes estímulos agudos y/o crónicos que se caracterizan por daño parenquimatoso e inflamación hepática, generados por diversos factores como el abuso de alcohol, hepatitis viral crónica, obesidad, hepatitis autoinmune, enfermedades parasitarias (esquistosomiasis), trastornos metabólicos (hemocromatosis y enfermedad de Wilson), enfermedad biliar, exposición persistente a toxinas y productos químicos y enfermedades hepáticas crónicas inducidas por fármacos. La fibrosis hepática se desarrolla por el aumento en la síntesis de colágeno fibrilar y su acumulación en el estroma, además de una incorrecta reorganización celular. La progresión de la fibrosis hepática lleva a cirrosis, que está caracterizada por la distorsión de la arquitectura normal de los hepatocitos y formación de nódulos, flujo sanguíneo alterado, hipertensión portal, carcinoma hepatocelular e insuficiencia hepática (Mormone et al., 2012).

En la fibrosis hepática, se encuentran diferentes tipos de células involucradas como las células estelares hepáticas, fibroblastos portal, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, hepatocitos, células epiteliales biliares y fibrocitos (Mormone et al., 2012).

Sin embargo, los hepatocitos son los reguladores centrales que controlan la demanda metabólica sistémica, la homeostasis de los electrolitos y los procesos de desintoxicación en el hígado. Después de la muerte de los hepatocitos, se liberan varios mediadores como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) para amplificar la respuesta inflamatoria y fibrótica en hepatocitos adyacentes, células de Kupffer (CK) y células estelares hepáticas (Fig. 2) (Luangmonkong et al., 2018).

La patogénesis molecular de la fibrosis hepática puede ser causada por diferentes mecanismos, entre ellos se encuentran las interacciones célula-célula y célula-matriz, el estrés oxidativo y el papel de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) y los inhibidores tisulares de metaloproteinasas de la matriz (TIMPs). Siendo el estrés oxidativo el principal mecanismo de daño ya que la hepatitis viral crónica y el consumo a largo plazo de alcohol inducen daño celular a través de una generación exagerada de especies reactivas de oxígeno. Debido a que el estrés oxidativo favorece la transición de la

TESIS TESIS TESIS TESIS

permeabilidad mitocondrial, y así promueve la muerte celular por necrosis o apoptosis de los hepatocitos. También, la generación de ROS en los hepatocitos puede resultar en un estado metabólico alterado como en la enfermedad del hígado graso no alcohólico y la esteatohepatitis no alcohólica. Se sabe que los ROS también puede afectar directamente el comportamiento de las células estelares hepáticas y miofibroblastos y aumentar la regulación de la expresión de genes asociados a la fibrosis, como COL1A1, COL1A2, MCP1 y TIMP1 mediante la activación de vías de transducción de señales y factores de transcripción, incluidos JNK, proteína activadora-1 y NFκB como respuesta a mediadores pro-fibrogénicos, incluyendo angiotensina II, PDGF, TGFβ y leptina. En general, una disminución en la defensa antioxidante como glutatión (GSH), catalasa o SOD, junto con una mayor peroxidación de lípidos conduce a una respuesta pro-fibrogénica al mejorar la expresión de la proteína de colágeno I (Mormone et al., 2012).

Aunque los hepatocitos no se consideran las principales responsables de la progresión de la fibrosis, la muerte por apoptosis de los hepatocitos es suficiente para inducir una respuesta fibrótica. Takehara et al., en (2004) en un modelo experimental de apoptosis con ratones deficientes de Bcl-xL, demostró que la tasa de muerte de los hepatocitos esta correlacionada con la progresión de la fibrosis hepática.

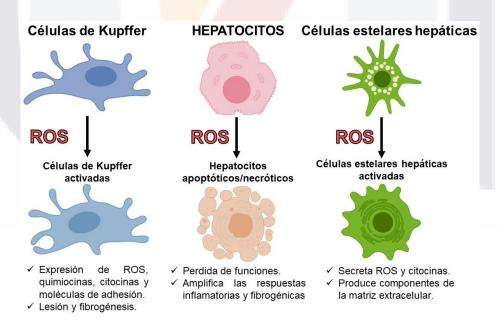


Figura 3. Efectos de las especies reactivas de oxígeno en células del hígado. Los hepatocitos en presencia de ROS entran en proceso de apoptosis o necrosis. Imagen modificada de (Luangmonkong et al., 2018).

1.10 Doxazosina

La doxazosina es un inhibidor de los adrenoreceptores $\alpha 1$, tiene como base de su estructura la quinazolina de la familia de los metanosulfonatos (Kaplan, 2005). La doxazosina contiene un carbono quiral, con dos enantiómeros: (-) doxazosina y (+) doxazosina, Sun et al., (2013) demostraron que el átomo de carbono quiral en la estructura molecular de la doxazosina no afecta la actividad terapéutica en los adrenoceptores α_{1A} en la próstata.

Figura 4. Estructura de doxazosina. Imagen modificada de (Partin, Anglin, & Kyprianou, 2003).

La doxazosina se usa como tratamiento para la hiperplasia prostática benigna y los síntomas del tracto urinario inferior para reducir el tono del músculo liso en la próstata y el cuello de la vejiga ya que tiene como principal efecto la reducción de la resistencia vascular sistémica (Frick et al., 1986). Debido a que la (\pm) doxazosina no es selectiva, los efectos de bloqueo de los receptores adrenérgicos α 1 no se limitan al tracto urinario inferior y también afectan a otros tejidos, como la vasculatura; por lo tanto, la (\pm) doxazosina puede causar efectos adversos vasodilatadores (Kirby et al., 2001).

La biodisponibilidad de doxazosina es de aproximadamente el 65%, se absorbe en el tracto gastrointestinal después de 2 a 3 horas. Se ha demostrado que la comida tiene poco o ningún efecto sobre la biodisponibilidad, y aproximadamente el 98% del fármaco se encuentra unido a proteínas plasmáticas (Pfizer Canada Inc., 2017). La eliminación plasmática es bifásica con una vida media de eliminación terminal es de 22 horas. El aclaramiento va de 1 a 2 ml/min/kg. Existe una acumulación de niveles plasmáticos de doxazosina después de la dosificación de estado estacionario, consistente con la vida media de eliminación terminal. En un estudio con 24 pacientes normotensos, la

farmacocinética y la seguridad de la doxazosina demostraron ser similares con los regímenes de dosificación de la mañana y de la noche, es decir, la doxazosina se puede administrar en una sola dosis diaria (Cox et al., 1986).

La doxazosina es metabolizada en el hígado fundamentalmente por O-demetilación del núcleo quinazolino o la hidroxilación de la benzodioxano. Los estudios *in vitro* proponen que la principal vía de eliminación es a través del CYP 3A4; sin embargo, las vías metabólicas CYP 2D6 y CYP 2C19 también están involucradas en la eliminación, pero en menor medida (Scott et al., 1988).

La excreción es principalmente a través de las heces con una dosis excretada del 9%, el (<0.5%) se elimina por la orina y menos del 5% se excreta como el medicamento intacto en heces (Frick et al., 1986).

La disposición de doxazosina en pacientes con insuficiencia renal es similar a la de los pacientes con función renal normal. Sólo se dispone de datos limitados en pacientes con insuficiencia hepática y sobre los efectos de los medicamentos conocidos por influir en el metabolismo hepático (Young & Brogden, 1988).

La dosis letal 50 (DL50) reportada por (Pfizer Pharmaceuticals Group, 2009) de doxazosina en ratas vía oral es de >1200 mg/kg, el símbolo mayor que (>) indica que el punto final de toxicidad que se está probando no se pudo lograr con la dosis más alta utilizada en la prueba.

La compañía Pfizer Canada Inc., (2017) reporta que la dosis de doxazosina debe ser administrada según el padecimiento, se puede administrar por la mañana o por la noche, y se debe tomar en cuenta si se añade un diurético u otro agente antihipertensivo ya que puede ser necesario reducir la dosis. Si la administración del medicamento se interrumpe durante varios días o más, el tratamiento debe restablecerse utilizando la dosificación inicial.

La dosis inicial de doxazosina en pacientes con hipertensión es de 1 mg administrado una vez al día, esta dosis minimiza los efectos hipotensores posturales. La dosis diaria máxima recomendada es de 16 mg una vez al día, y la reducción máxima de la presión arterial se logra de 2 a 6 horas después de una dosis, y puede ser aumentada hasta lograr la respuestas deseada de la presión arterial y el rango normal de doxazosina es de

1 a 8 mg por día. Los aumentos de la dosis de >4 mg aumentan la probabilidad de efectos posturales excesivos incluyendo síncope, mareo postural/vértigo e hipotensión postural (Pfizer Canada Inc., 2017).

La dosis inicial es de 1 mg administrado una vez al día. Dependiendo de la urodinámica del paciente individual y la sintomatología de la hipertrofia prostática benigna (HPB) significado de estas siglas, la dosis puede aumentarse a 2 mg y, a partir de entonces, a 4 mg y 8 mg una vez al día, la dosis máxima recomendada (Wishart et al., 2018). Doxazosina debe interrumpirse si los efectos secundarios de doxazosina son más molestos que los síntomas de la HPB, o si el paciente desarrolla una complicación urinaria secundaria a la HPB durante el tratamiento con doxazosina (Pfizer Canada Inc., 2017).

1.11 Carvedilol

Carvedilol es un antagonista no selectivo de los receptores adrenérgicos β de tercera generación (bloquea tanto β_1 como β_2) con propiedades vasodilatadoras debido al antagonismo del receptor adrenérgico α_1 . Es una mezcla racémica de dos enantiómeros, S (-) y R (+). El isómero S (-) tiene propiedades adrenobloqueadoras α_1 y β a diferencia del isómero R que tiene propiedades bloqueadoras α_1 más débiles (Fonarow, 2009). Carvedilol también tiene propiedades antioxidantes, vasodilatadoras, antiinflamatorias, anti apoptóticas y anti proliferativas (Prajapati, Sharma, & Patel, 2016).

Figura 5. Estructura de carvedilol. Imagen modificada de (Ruffolo & Feuerstein, 1997).

Actualmente el carvedilol está indicado para tratar insuficiencia cardiaca leve a grave, disfunción ventricular después de un infarto o hipertensión.

El mecanismo de acción de este medicamento es por medio del antagonismo adrenérgico β ya que reduce la presión arterial con el antagonismo adrenérgico α_1 y relaja

el musculo liso en la vasculatura debido a la modulación de la liberación de catecolaminas mediada por los receptores adrenérgicos $\beta 2$, el antagonismo de las acciones tóxicas de la noradrenalina mediadas por los receptores sobre el miocardio y los efectos favorables sobre la energía del miocardio, se refleja en la reducción de la resistencia vascular periférica y reducción de la presión arterial. También puede bloquear los canales de calcio, y su actividad antioxidante previene la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad y su captación en la circulación coronaria (Hori et al., 2004).

El carvedilol tiene una biodisponibilidad del 25 al 35% y tiene un volumen de distribución de 1.5 a 2 L/kg. Se une a proteínas plasmáticas en un 98% y 95% a la albúmina sérica (Morgan, 1994). El carvedilol se elimina por la orina (16%) y <2% se elimina como medicamento no metabolizado (Hines et al., 2017). El aclaramiento plasmático es de 0.52 L/Kg (Morgan, 1994).

Las principales enzimas P450 responsables del metabolismo de R (+) y S (-) - carvedilol en microsomas hepáticos humanos fueron CYP2D6 y CYP2C9 y, en menor medida, CYP3A4, 2C19, 1A2 y 2E1 (Vlahovic-Palcevski et al., 2010). Carvedilol es un medicamento que se metaboliza con hidroxilación en la posición 1 por CYP2D6, CYP1A2 o CYP1A1 y forma 1-hidroxifenilcarvedilol; por CYP2D6, CYP2E1, CYP2C9 o CYP3A4 después se transforma en 4'-hidroxifenilcarvedilol; por CYP2D6, CYP2C9 o CYP3A4 para formar 5'-hidroxifenilcarvedilol; y en la posición 8 por CYP1A2, CYP3A4 y CYP1A1 para formar 8-hidroxicarbazolilcarvedilol.

Además de hidroxilación se puede desmetilar por CYP2C9, CYP2D6, CYP1A2 o CYP2E1 y resultar en O-desmetilcarvedilol. El beta adrenobloqueador y los metabolitos se pueden conjugar con sulfato o glucuronidación antes la eliminación. El carvedilol puede ser O-glucuronidado por UGT1A1, UGT2B4 y UGT2B7 para formar glucurónido de carvedilol (lwaki et al., 2016).

1.12 Tamsulosina

La tamsulosina es un antagonista selectivo de los adrenoceptores α1A y α1B que tiene efecto en la próstata y la vejiga, donde estos receptores son más comunes. Está indicado para el tratamiento de signos y síntomas de hipertrofia prostática benigna. El antagonismo de estos receptores lleva a la relajación del músculo liso en la próstata y los

músculos detrusores en la vejiga, lo que permite un mejor flujo urinario. A comparación de otros antagonistas de los adrenoreceptores α1 como doxazosina, teratozina, prazosina que han sido ampliamente usados desde 1980, tamsulosina muestra mayor selectividad y no tiene como efecto secundario la hipotensión (Food and Drug Administration, 2005).

$$H_2N$$
 H_3CO
 H_3CO
 H_3CO
 H_3CO

Figura 6. Estructura de tamsulosina basada en sulfonamida. Imagen modificada de (Partin, Anglin, & Kyprianou, 2003).

La tamsulosina es un bloqueador de los receptores adrenérgicos alfa con especificidad para los subtipos α1A y α1D, que son más comunes en la próstata. El subtipo alfa-1B, es más común en la aorta y el bazo. La tamsulosina se une a los receptores α1A de 3,9 a 38 veces más selectivamente que el α1B y de 3 a 20 veces más selectivamente que el alfa-1D. Esta selectividad permite un efecto significativo sobre el flujo urinario con una incidencia reducida de reacciones adversas como hipotensión ortostática (Dunn, Matheson, & Faulds, 2002b).

La tamsulosina posee una cinética lineal después de la administración de dosis únicas y múltiples. Las concentraciones plasmáticas en estado estacionario se alcanzan en 4 a 7 días de administración, y se relacionan con una variabilidad interindividual (Dunn et al., 2002b).

El metabolismo de la tamsulosina se lleva a cabo en el hígado por medio del citocromo P450, (CYP3A4 y CYP2D6), el fármaco en su mayoría se conserva en el plasma sin alteraciones. El fármaco inalterado representa el 81% de la radiactividad en plasma 0.5 a 4 horas después de la administración oral de una solución acuosa de 0.2 mg de tamsulosina. El 62% del fármaco se elimina por medio de la orina. Actualmente no existen datos farmacocinéticos sobre tamsulosina en pacientes con insuficiencia hepática grave (Dunn et al., 2002b).

Actualmente la tamsulosina no tiene registro de ser mutagénica, pero puede ser cancerígena a niveles superiores a la dosis humana máxima recomendada. En un estudio con ratas hembra expuestas al medicamento demostraron un ligero aumento en las tasas de fibroadenomas y adenocarcinomas de las glándulas mamarias. La DL50 oral en ratas es

de 650 mg/kg (Food and Drug Administration, 2005).

La tamsulosina, es comúnmente administrada en una dosis única de 0.4 mg después de una comida, esta recomendación es por parte de la Unión Europea (Dunn et al., 2002b). Esta dosis se considera eficaz y bien tolerada en el tratamiento de los síntomas del tracto urinario inferior asociados con la hiperplasia prostática benigna. Debido a que existen comparaciones de la tamsulosina con los demás α adrenobloqueadores, esta destaca por diferentes ventajas en términos de la cantidad y su bajo potencial de hipotensión, tampoco presenta efectos secundarios en pacientes con tratamientos antihipertensivos. La dosis es la misma desde el inicio del tratamiento y su mecanismo de acción es rápido y eficaz en pacientes con síntomas moderados y graves (Dunn, Matheson, & Faulds, 2002a).

1.13 Curcumina

La curcumina (*Curcuma longa*) pertenece a la familia del jengibre (*Zingiberaceae*) (Crews, 2007) es un compuesto natural ampliamente estudiado por sus propiedades biológicas y químicas, también conocida como diferuloil metano, 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona. Es soluble en solventes orgánico, alcalinos y extremadamente ácidos.

Es un compuesto cristalino de color amarillo. Tiene estructura simétrica con dos grupos fenólicos y un dicetona. Estos grupos funcionales se presentan como dos anillos aromáticos que contienen grupos o-metoxifenólicos con un enlazador de siete carbonos que tiene un resto de β -dicetona α , β -insaturado. El grupo β -diceto presente en la curcumina exhibe tautomería ceto-enólica según la acidez de la solución, donde está presente en las formas ceto y enol en soluciones ácidas/neutras y alcalinas, respectivamente (Jain et al., 2018).

Figura 7. Los tautómeros de la curcumina. Presente en la forma ceto y enol (González-Albadalejo et al., 2015).

Sus características antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas se atribuyen a los grupos metoxi, hidroxilo, α , β -carbonilo insaturado o diacetona (Aggarwal, Gupta, & Sung, 2013).

La curcumina tiene diferentes objetivos moleculares que pueden regularse a la alza o a la baja según el objetivo. En la tabla 2 se muestran los principales factores de transcripción incluido Nrf2 marcador de estrés oxidativo que se activa con la curcumina y está relacionado con la expresión de GST y NADP(H): quinona oxidorreductasa (NQO) y hemooxigenasa-1 (HO-1). También se sabe que la curcumina induce la expresión de proteínas anti apoptóticas como la proteína inhibidora celular cFLIP, inhibidor de la proteína de apoptosis, IAP, Bcl-2 y Bcl-xL, Con base en lo anterior, se describe a la curcumina como antiinflamatoria, anti proliferativa y proapoptótica (Aggarwal & Sung, 2009).

Tabla 2. Objetivos moleculares de la curcumina.

| Factores de transcripción | Enz imas | Proteínas anti apoptóticas |
|---------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| β-catenina | p300 histona acetil transferasa | cFLIP |
| HIF-1α | GST | IAP |
| NF-kB | NQO | XIAP |
| Nrf2 | Hemooxigenasa-1 | Bcl-2 |
| p53 | Glutatión reductasa | Bcl-xL |

La curcumina puede activar la vía de apoptosis en células tumorales por la vía de las caspasas, iniciando con la caspasa 8 y con una escisión del dominio de interacción entre Bcl-2 y BID, liberando el citocromo c. Después se activan las caspasas 3 y 9 y también se reporta que la vía de apoptosis mitocondrial es inducida por curcumina (Jana et al., 2004). La curcumina tiene una mayor capacidad antioxidante que la vitamina E sin embargo, se han revelado estudios donde tiene mecanismos prooxidantes (Aggarwal & Sung, 2009).

2 ANTECEDENTES

2.1 Medicamentos experimentales utilizados para revertir la fibrosis hepática

Friedman, (2000) sugiere que después de una lesión hepática las células estelares hepáticas presentan una activación, es decir, una transición de inactividad a miofibroblastos proliferativos, fibrogénicos y contráctiles. Los principales cambios fenotípicos después de la activación incluyen proliferación, contractilidad, fibrogénesis, degradación de la matriz, quimiotaxis, pérdida de retinoides y quimioatracción de glóbulos blancos. Después de una lesión hepática, las células estelares hepáticas (HSC) se someten a una "activación", que connota una transición de las células quiescentes ricas en vitamina A, a miofibroblastos proliferativos, fibrogénicos y contráctiles. Las células miofibroblásticas activadas son responsables de la acumulación progresiva de colágeno como resultado de la cirrosis hepática.

En un modelo experimental de ratas con hipertensión espontanea a las cuales se les administro CCL₄ se observó que el sistema nervioso simpático (SNS) libera cantidades masivas de catecolamina que luego conducen a la vasoconstricción y cambios metabólicos que promueven el daño hepático sin embargo, los inhibidores del SNS pueden participar en la reversión de la fibrosis hepática (Hsu, 1992, 1995).

Oben et al., (2004) demostraron que las células estelares hepáticas expresan enzimas clave para la biosíntesis de catecolaminas y noradrenalina. Ya que, estas células usan las catecolaminas para autorregular su crecimiento porque el aumento de las células estelares disminuye significativamente con antagonistas de los adrenoreceptores α o β . En un modelo experimental con ratones incapaces de convertir la dopamina en noradrenalina, las dietas hepatotóxicas solo activan a las estelares cuando la actividad de los adrenoreceptores aumenta con el tratamiento de adrenérgicos. Por lo tanto, cuando la noradrenalina es deficiente, la leptina no puede activar completamente a las células estelares, y el TGF- β 1 y el colágeno no se inducen normalmente en respuesta a una lesión hepática.

La noradrenalina es capaz de desempeñar otro papel además del clásico de neurotransmisor, como ejemplo esta la reestructuración cardíaca en la insuficiencia cardíaca que implica acciones mitogénicas y fibrogénicas de la noradrenalina que están mediadas a través de adrenoreceptores (Akiyama-Uchida et al., 2002). Sin embargo, lo estudios proporcionan evidencia de que las células estelares hepáticas son tanto una fuente como un objetivo celular directo de noradrenalina. Oben et al., (2004) proporcionan evidencia de los mecanismos que median las acciones profibrogénicas de las catecolaminas en el hígado y sugieren que la interrupción dirigida de la señalización de catecolaminas en las células estelares hepáticas puede ser un enfoque terapéutico útil para restringir la respuesta fibrogénica de la lesión hepática mediante el uso de antagonistas de los adrenoreceptores α o β .

2.2 Doxazosina y carvedilol tratamiento antifibrótico

En un modelo de cirrosis hepática en hámster se demostró que el tratamiento con doxazosina y carvedilol reduce la concentración de fibras de colágeno en hígado y se mejora el funcionamiento del parénquima hepático con la disminución de AST y ALT. Doxazosina modificó la morfología normal de los hepatocitos y afectó el proceso de regeneración del parénquima (Serna-Salas et al., 2018). (El-Demerdash et al., 2017) demostraron que el carvedilol se considera antifibrótico gracias a su actividad antioxidante y puede restaurar el parénquima hepático debido a la inactivación de las células estelares hepáticas y reducción de colágeno.

En el estudio de (Ling et al., 2019) se analizaron los efectos antifibróticos del carvedilol en un modelo de cirrosis hepática in vivo de ratas tratadas con tetracloruro de carbono y un modelo in vitro de línea celular de estelares hepáticas (LX-2). La morfología del parénquima hepático mejoro con el tratamiento de carvedilol además inhibió la activación, proliferación e invasión de las células estelares hepáticas. También se observó la inhibición de la síntesis de colágeno a través de la vía TGFβ1/SMAD.

Macías-Pérez et al., (2019) relacionaron el proceso de fibrosis hepática con la disminución de la respuesta antioxidante del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) y la regulación inhibitoria de la vía proinflamatoria del factor nuclear kappa B (NF-κB). Evaluaron la actividad antifibrótica de doxazosina y carvedilol en co-tratamiento con curcumina en un modelo *in vivo* de hámster con CCl₄ y reportaron una reversión de la fibrosis por la disminución de colágeno I y una morfología de los hepatocitos sin alteraciones y una función hepática normal. Se sugiere que la curcumina aumenta la expresión de RNAm de la relación de Nrf2/NF- κB.

2.3 Citotoxicidad de doxazosina y tamsulosina como nueva propuesta

Los estudios *in vitro* de Batty et al., (2016) proporcionan evidencia de que los antagonistas α que poseen en su estructura la **quinazolina** como doxazosina, teratozina y prazosina presentan actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP, DU145 y PC-3 (dependientes de andrógenos). Sin embargo, los efectos citotóxicos no se observaron con tamsulosina ya que su estructura está basada en **sulfonamida** (figura 8).

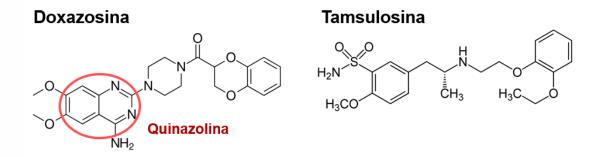


Figura 8. Comparación estructural de los α-adrenobloqueadores doxazosina y tamsulosina. Doxazosina tiene una estructura basada en quinazolina y tamsulosina en sulfonamida. Imagen modificada de (Batty et al., 2016).

El mecanismo de citotoxicidad de doxazosina se debe a la inducción de apoptosis y disminución de la proliferación celular por la quinazolina, ya que estudios previos de (Kyprianou, 2003) y (Desiniotis & Kyprianou, 2011) indican que la doxazosina induce apoptosis dosis dependiente en estudios *in vitro* e *in vivo* y esta mediada por un mecanismo independiente del bloqueo de los adrenoreceptores α1 e inducido por el núcleo de quinazolina ya que en el estudio la tamsulosina no provoca respuesta apoptótica. Además, se demostró que desregula las vías de transducción de señales que involucran el factor de crecimiento transformante β y la interrupción de la unión celular a la matriz extracelular.

2.4 <u>Curcumina y marcadores genéticos de estrés oxidativo</u>

La curcumina es un antioxidante derivado de la planta *Curcuma longa* y diferentes investigaciones han demostrado su papel en la regulación del ciclo celular, apoptosis debido a que es capaz de modular enzimas implicadas en el equilibrio redox dentro de las células como SOD, HO-1, catalasa y glutatión peroxidasa (Jain et al., 2018).

La curcumina reacciona directamente con las especies reactivas de oxígeno y puede regular de manera positiva proteínas citoprotectoras y antioxidantes. Puede eliminar radicales hidroxilo (·OH), aniones superóxido (O₂·), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), óxido nítrico, oxígeno singlete, peroxinitrito y radicales peroxilo (ROO·). Sin embargo, se ha demostrado que puede producir un efecto prooxidante en dosis altas, y el grupo hidroxilo fenólico puede formar un complejo por quelación con metales de transición como Cu (II) y después de la reacción de transferencia de electrones el complejo forma radicales semiquinona, superóxido e hidroxilo (Chattopadhyay, Somaiah, Raghunathan, & Thirumurugan, 2014). También puede modificar la actividad de la tiorredoxina reductasa y oxidar el NADPH por oxígeno y formar ROS (W. Cai, Zhang, Duan, Wu, & Fang, 2012).

Uno de los principales mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo es la activación de la vía de señalización del elemento de respuesta antioxidante (ARE) Nrf2, que regula la expresión de genes implicados en la eliminación de ROS (Fig. 9).

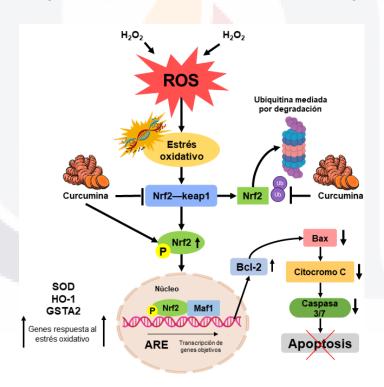


Figura 9. Curcumina activa Nrf2 y causa la transcripción de genes involucrados en la respuesta del estrés oxidativo. El tratamiento con H₂O₂ incrementa la generación de especies reactivas de oxígeno, sin embargo, el pretratamiento de curcumina bloquea la generación de ROS por la fosforilación y translocación de Nrf2 al núcleo. Imagen modificada de (Sabarwal, Kumar, Shyanti, & Singh, 2018).

Sin embargo, estos mecanismos reguladores no se comprenden por completo. Las proteínas citosólicas como Keap1 son clave en la regulación ya que en condiciones normales Keap1 se une a Nrf2, provocando la degradación de Nrf2 por ubiquitinación. Cuando existe estrés oxidativo, Nrf2 se fosforila y se disocia de Keap1 y Nrf2 es translocado al núcleo, después de que entra se une a proteínas adaptadoras como fibrosarcoma musculoaponeurótico (Maf1) y se dirige al elemento de respuesta antioxidante que activa los genes de respuesta como GSTA2 (glutatión S-transferasa A2), NQO1 (NADPH: quinina oxidorreductasa 1) hemo oxigenasa1 (HO-1) y γ-glutamil cisteína sintasa (Kensler, Wakabayashi, & Biswal, 2007).

Un estudio con células NRK-52E de epitelio renal, la expresión de Nrf2 aumento cuando las células fueron expuestas a concentraciones bajas de curcumina, Nrf2 se transloco del citoplasma al núcleo y se estimuló la respuesta antioxidante y como consecuencia aumento significativamente la expresión de HO-1 y los niveles de actividad de hemo oxigenasa (Balogun et al., 2003).

2.5 Repoblación del hígado fibrótico por células madre y hepatocitos remanentes

Actualmente no se cuenta con la compresión critica de los requisitos y mecanismos de la repoblación hepática efectiva para un tratamiento o reversión de la fibrosis o cirrosis hepática. Se han establecido diferentes modelos de cirrosis y fibrosis en roedores con el fin de estudiar un mecanismo de progresión de estas enfermedades y/o terapias antifibróticas. La investigación de (Yovchev, Xue, Shafritz, Locker, & Oertel, 2014) indujo fibrosis hepática por tioacetamida demostraron que las células madres progenitoras epiteliales que son derivadas del hígado fetal de la rata pueden injertarse en el hígado con fibrosis/cirrosis avanzada y diferenciarse en hepatocitos lo que conlleva a una repoblación del parénquima, además las células que fueron injertadas pueden expandirse y reemplazar la población celular hepática defectuosa o dañada poco tiempo después de una infusión celular. Demostraron que para lograr una repoblación hepática eficaz por células madre progenitoras trasplantadas en hígados con una fibrosis avanzada no se necesita estímulos adicionales y por lo tanto el hígado muestra un retroceso en la fibrogénesis.

3 JUSTIFICACIÓN

En hámsteres con cirrosis hepática inducida por CCI₄, el tratamiento con doxazosina y carvedilol mejora la función hepática y reduce los nódulos de regeneración de la fibrosis. Sin embargo, se observaron cambios morfológicos (balonización) en los hepatocitos con el tratamiento de doxazosina y carvedilol, posibles efectos secundarios que afecten el proceso de regeneración del parénquima hepático una vez que se dio la regresión de la fibrosis hepática, y por otra parte se observó que el carvedilol incrementa la expresión de marcadores de proliferación celular como c-MYC y Ki67 (Serna-Salas et al., 2018).

En un estudio, el uso simultáneo de curcumina con los medicamentos doxazosina y carvedilol se logró un efecto antifibrótico en un modelo de daño hepático en hámster. Además, la curcumina protegió el parénquima hepático a nivel histológico (Macías-Pérez et al., 2019b).

(El-Demerdash et al., 2017) demostraron evidencia de los efectos antifibróticos de carvedilol y que mejora de la eficacia hepática, por la reducción del flujo sanguíneo hepático y la expresión de CYP2D6 en el hígado.

Sin embargo, se descon<mark>ocen los efectos f</mark>armacocinéticos de estos medicamentos antagonistas de los receptores adrenérgicos α y β (doxazosina, tamsulosina y carvedilol) sobre la viabilidad celular de los hepatocitos remanentes, posiblemente involucrados en la repoblación del parénquima hepático durante la reversión de la fibrosis, por lo que este proyecto de investigación propone un estudio *in vitro* en la línea celular HepG2 para dilucidar el papel protector de la curcumina sobre los posibles efectos secundarios de los medicamentos ya probados con actividad antifibróticas.

4 HIPÓTESIS

La aplicación de curcumina en conjunto con los antagonistas de los receptores α y β adrenérgicos con actividad antifibrótica (doxazosina, carvedilol y tamsulosina) en las células de la línea HepG2, reducirá los efectos secundarios generados, y reflejado en la disminución de cambios de alteración morfológica y estrés oxidativo.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de la curcumina ante la citotoxicidad de doxazosina, carvedilol y tamsulosina en la línea celular HepG2.

5.2 Objetivos Particulares

- Determinar el efecto citotóxico durante la interacción con doxazosina, carvedilol o tamsulosina en presencia y ausencia de la curcumina.
- Identificar los cambios morfológicos durante la interacción con doxazosina, carvedilol o tamsulosina en presencia y ausencia de la curcumina.
- Determinar el proceso de daño celular por estrés oxidativo en la línea celular HepG2 *in vitro* durante la interacción de los medicamentos en presencia y ausencia de la curcumina.

6 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Existen efectos citotóxicos en los hepatocitos con el tratamiento de doxazosina, carvedilol y tamsulosina? ¿El uso de curcumina podrá reducir o eliminar estos efectos secundarios?
- ¿Podrá doxazosina, carvedilol y tamsulosina generar cambios morfológicos en la línea celular HepG2? ¿La aplicación concomitante de curcumina será capaz de eliminar cambios morfológicos en la línea celular HepG2?
- ¿Si los medicamentos doxazosina y tamsulosina son α adrenobloqueadores tendrán el mismo posible efecto citotóxico o de cambios en la expresión genética de marcadores de estrés oxidativo?
- ¿Podrá la sinergia entre carvedilol y curcumina tener un efecto protector en los hepatocitos? ¿o un efecto prooxidante?

7 MATERIALES Y METODOS

7.1 <u>Diseño experimental</u>

Las pruebas se realizaron en un modelo *in vitro* con la línea celular inmortalizada HepG2, (células no tumorigénicas con altas tasas de proliferación) (Donato et al., 2015), ya que pueden considerarse modelo para evaluar la eficacia del desarrollo de fármacos preclínicos y herramienta para la comprensión de terapias para tratar enfermedades hepáticas (Collins et al., 2019). Otra de sus características es que sirve como modelo de toxicidad mitocondrial y en protocolos de estrés oxidativo (Pinti et al., 2003).

Las células HepG2 fueron expuestas a diferentes concentraciones de los medicamentos ya probados con actividad antifibrótica (doxazosina, carvedilol) y tamsulosina en tratamientos de 24 a 72 horas en ausencia o presencia del antioxidante curcumina. Se evaluó el porcentaje de viabilidad celular, cambios morfológicos y niveles de expresión genética de marcadores de estrés oxidativo y la capacidad antioxidante de la curcumina ante el posible estrés oxidativo ocasionado por los medicamentos (figura 10).

Se consideró usar un rango de dosis de antifibróticos de 0.1 a 25 μM debido a que (González et al., 2003) reportaron que la concentración de 1 μM/L de doxazosina en un estudio *in vitro* en cardiomiocitos imita las concentraciones que se encuentran a nivel intracelular de manera *in vivo* por la dosis terapéuticas, actualmente a los pacientes de hiperplasia prostática se les administran dosis de 8 y 16 miligramos que equivalen a 0.122 y 0.244 μM/L respectivamente.

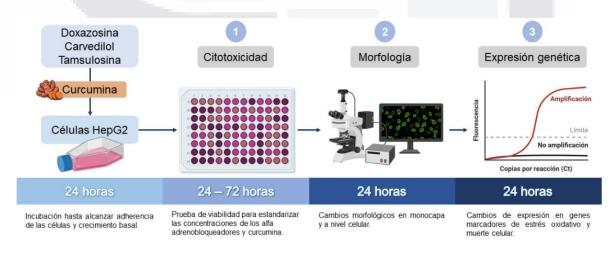


Figura 10. Diseño experimental del proyecto.

7.2 Cultivo celular

Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DMEM (Sigma, D5546) suplementado con 2% de suero bovino fetal (SBF), 2% de L-glutamina (Corning, 25-005-CI) y 1% de penicilina/estreptomicina a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂ y 95% de O₂. Después de la incubación, las células se enjuagaron con buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4), después de la adición de 1 ml de tripsina (EDTA al 0.02%, tripsina al 0.25%) durante 7 min para digerir las células. Se añadió DMEM para terminar la digestión. Luego, las células se recolectaron centrifugando a 2,000 rpm durante 5 minutos. Todas las células estaban en la fase logarítmica de los experimentos.

7.3 Tratamientos con doxazosina, carvedilol y tamsulosina

Se preparó una solución madre de doxazosina (Sigma, D9815), carvedilol (Sigma, PHR1265) y tamsulosina (Sigma, T1330) a una concentración de 50 mM utilizando como disolvente una solución de DMSO al 0.08%. Partiendo de esta solución se obtuvieron, por medio de diluciones, los tratamientos preestablecidos de concentraciones de 0.1 μ M, 0.3 μ M, 10 μ M, 15 μ M y 25 μ M, usando como disolvente el medio completo DMEM. Después de la exposición, se realizaron las siguientes pruebas en las células.

7.4 Prueba de viabilidad celular (MTT)

Las células con una incubación previa de 24 h se trataron con $0.1~\mu\text{M},~0.3~\mu\text{M},~10~\mu\text{M},~15~\mu\text{M}~y~25~\mu\text{M}$ de los antagonistas de los receptores α y β adrenérgicos durante 24, 48 y 72 h. Las interacciones se realizaron en presencia o ausencia de curcumina 1 μM (Sigma, C1386). Se utilizó bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo (MTT) (Sigma, M2128) para evaluar la viabilidad de las células HepG2, a partir de un stock disuelto en 5 mg/ml de PBS, se preparó una solución de 0.5 mg/L utilizando como disolvente medio completo DMEM. Se intercambió el medio con tratamiento por medio con MTT, se incubaron las placas por 4 h a 37°C, se retiró el medio con MTT y los cristales formados se disolvieron con 100 $\mu\text{I/pozo}$ de isopropanol ácido (84 μI de HCl al 25% en 25 ml de isopropanol), la placa se colocó a temperatura ambiente por 10 minutos y se realizó la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro Microplate reader, Bio-Rad® a una longitud de onda de 595 nm con un filtro de referencia de 655 nm.

7.5 Determinación cuantitativa de transaminasas (AST y ALT)

Para el análisis de las transaminasas, alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) se recolectó el medio de cultivo DMEM de las células HepG2 después de los tratamientos en presencia y ausencia del pretratamiento de curcumina y se analizaron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm y se calculó el promedio del incremento de absorbancia por minuto (ΔA/min). Se cuantifico en unidades por litro (U/L), se cuantificaron utilizando un analizador espectrofotométrico semiautomático bts-350 (Biosystems S.A.).

7.6 Tinción de hematoxilina/eosina

Para el análisis de los efectos sobre la morfología de la monocapa del cultivo celular HepG2 con los antagonistas de los receptores α y β adrenérgicos en presencia y ausencia de curcumina, se sembraron las células en cubreobjetos redondos colocados al fondo de la placa, se retiró el tratamiento de las células y se realizó un lavado con PBS 1x, se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 minutos a temperatura ambiente y se lavó con PBS 1x el exceso, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se colocaron 500 μl por pozo de Hematoxilina de Harris por un minuto y se enjuagaron las células con agua destilada. Luego se colocaron 500 μl por pozo de eosina por 20 segundos, se lavaron las células con agua destilada y se montaron los cubreobjetos donde se encontraba la monocapa ya teñida a un portaobjetos con glicerogel y se observaron al microscopio a 20X y 40X.

7.7 Microscopia electrónica de barrido

Las células HepG2 con tratamientos de 24 h de doxazosina, carvedilol y tamsulosina en presencia y ausencia de curcumina, se cultivaron en placas de 24 pozos y al término del tratamiento se retiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS 1x posteriormente las células se fijaron con glutaraldehído al 2.5% por 15 minutos y se desecaron en la cámara del aparato de disección en un cilindro de aluminio con grafito bajo el estereoscopio y por último se cubrieron con oro en el recubridor o bañador de oro marca *Dentuum Vaccum* y se analizaron las imágenes de microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 Low Vacuum SEM).

7.8 Tinción de naranja de acridina

Las células con el tratamiento de los antagonistas de los receptores α y β adrenérgicos (doxazosina, carvedilol y tamsulosina) después de retirar el tratamiento, se colocó el control positivo de daño con 250 μ M de peróxido de hidrogeno al 30% por 15 minutos, después se retiró el H_2O_2 y las células se fijaron con paraformaldehído 2.5% y se tiñeron con 1 μ g/ml de naranja de acridina (concentración de 1 μ g/ml de naranja de acridina en PBS pH 7.4) durante 15 minutos en incubación a 37°C y se lavaron con PBS para detectar orgánulos vesiculares ácidos. Se montaron los cubreobjetos a un portaobjetos con glicerogel y analizaron las imágenes con un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación configurado a 490 nm y 515 nm.

7.9 Tinción de SYTOX green

Después de terminado el tratamiento con los antagonistas de los receptores α y β adrenérgicos las células se fijaron al cubreobjetos donde se cultivaron, se realizó un lavado con PBS 1x hasta eliminar el medio DMEM de las células, se colocó el control positivo de daño con 250 μ M de peróxido de hidrogeno al 30% por 15 minutos, después se retiró el H_2O_2 y se preparó la solución de tinción SYTOX® Green diluyendo la solución madre 1:30,000 (167 nM) en PBS 1x, se añadieron 500 μ I de la solución de tinción hasta cubrir las células, se incubaron durante 17 minutos a 37°C en oscuridad. Se lavaron las células con PBS 1x, se montó el cubreobjetos con glicerogel y se analizaron las imágenes con microscopio de fluorescencia a 504-523 nm.

7.10 Extracción de ARN

Las células tratadas con los antagonistas de los receptores α y β adrenérgicos en presencia y ausencia del pretratamiento con curcumina después de 24 horas fueron procesadas con el kit Direct-zolTM RNA MiniPrep®, siguiendo el protocolo del fabricante. Las células fueron recolectadas en tubos Eppendorf y se centrifugaron hasta contener una pastilla, se agregaron 250 μ l de trizol reagent a las células, posteriormente se mezcló vigorosamente por 30 segundos usando el vórtex hasta eliminar la pastilla, se agregó una cantidad igual de etanol y se mezcló por inversión, se tomaron los 500 μ l y se colocaron en un tubo con columna, se centrifugo por 30 segundos a 14,000 rpm y se eliminó el sobrenadante, luego se agregaron 400 μ L de pre-wash y se centrifugó por 30 segundos a

14,000 rpm y elimino el sobrenadante, después se agregaron 600 µl de buffer wash y se centrifugo por 1 minuto a las mismas rpm. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 30 µl de agua libre de nucleasas y se centrifugo a 14,000 rpm durante 45 segundos. El eluido se alicuotó y colocó en baño de hielo.

7.11 Cuantificación de ARN total

El ARN obtenido fue cuantificado con la absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro BioDrop μLITE® y almacenado a -81°C hasta su uso. La pureza del ARN se determinó con la relación A₂₆₀/A₂₈₀, considerándose como valores puros aquellos mayores a 1.8, y la relación A₂₆₀/A₂₃₀ con valores mayores a 1.5.

7.12 Evaluación de la Integridad del ARN

La integridad fue evaluada por electroforesis en agarosa al 1.5% en buffer SB 1X (ácido bórico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8.5) se cargaron las muestras de ARN (5 µl) con Green Loading Buffer 6X (1 µl) a una migración bajo un campo eléctrico de 90 V durante 30 minutos, en la cámara de electroforesis horizontal Gel Box MidiPlus VWR[®]. Se utilizo un marcador de peso molecular de 100 pb y se tiñó con bromuro de etidio hasta que el marcador de peso molecular fue visible con luz ultravioleta.

7.13 Retotranscripción de ARN

La transcripción inversa se realizó utilizando el kit GoScript Reverse Transcription System de Promega® siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 3. Condiciones de la mezcla de reacción para síntesis de cADN.

| Reactivo | Cantidad |
|-------------------------|----------|
| ARN | 1 μg/μl |
| Oligo dt | 1 µl |
| Agua libre de nucleasas | 10 µl |
| Total | 12 µl |

La reacción se colocó 5 minutos a 65°C en el termociclador Swift™ MiniPro®, luego el volumen de la muestra se ajustó a 20 µl, al agregar los siguientes reactivos:

Tabla 4. Condiciones de la mezcla de reacción para síntesis de cADN.

| Reactivos | Cantidad |
|--|----------|
| 5X Reaction Buffer | 4 µl |
| RiboLock Rnase Inhibitor (20 U/μl) | 1 µl |
| 10 mM dNTP Mix | 2 µl |
| RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase | 1 µl |
| Volumen total | 20 μΙ |

Tabla 5. Protocolo del termociclador para síntesis de cADN.

| Segme | ento | Temperatura | Tiempo |
|-------|---------------------------|-------------|-------------|
| 1. | Desnaturalización inicial | 95°C | 3 minutos |
| 2. | Desnaturalización | 95°C | 45 segundos |
| 3. | Hibridación | 60°C | 30 segundos |
| 4. | Elongación | 72°C | 12 segundos |
| 5. | Elongación final | 72°C | 3 minutos |

^{*}Segmento 2, 3 y 4 se repitieron por 40 ciclos.

7.14 Análisis por PCR en tiempo real

El cADN se ajustó a una concentración de 50 ng/µl para todas las muestras con una dilución 1:5 en agua libre de nucleasas. Se realizaron mezclas en placas de 48 pocillos para qPCR (Applied Biosystems® MicroAmp® -N8010560), qPCR SybGreen (PCR Master Mix, Thermo-Scientific®) y los oligonucleotidos correspondientes (IBT © 2020 Integrated DNA Technologies, Inc.) en dilución 1:20 (10 ng).

Tabla 6. Condiciones de la mezcla de reacción de PCR en tiempo real

| Reactivos | Cantidad |
|----------------------------------|----------|
| Master Mix | 5 µl |
| Oligonucleótido Forward 50 ng/µl | 1 µl |
| Oligonucleótido Reverse 50 ng/µl | 1 µl |
| Templado (cADN) 50 ng/μl | 1 µl |
| Agua libre de nucleasas | 2 µl |
| Volumen total | 10 µl |

Se utilizaron las reacciones para el análisis de los genes utilizando el termociclador Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, con las condiciones demostradas en la tabla 6.

Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para RT-PCR.

| Gen | Oligonucleótido Fw | Oligonucleótido Rv |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|
| Linfoma de células B2 (Bcl-2) | GACTTCGCCGAGATGTCCAG | GAACTCAAAGAAGGCCACAATC |
| El factor de transcripción (Nrf2) | AATGAGCTATTGGCAAGGTACC | CTCTTCAGGAGAGTAGCTGTTG |
| Hemo oxigenasa 1 (HMOX1) | CCTCCCTGTACCACATCTATGT | GCTCTTCTGGGAAGTAGACAG |
| 18S ARN ribosomal (18SrRNA) | AAACGGCTACCACATCCAAG | CCTCCAATGGATCCTCGTTA |

La cuantificación de expresión relativa se determinó con el método ΔΔCt, utilizando 18SrRNA como gen constitutivo para la normalización con la siguiente ecuación:

- Expresión relativa = $2^{-\Delta\Delta Ct}$
- $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct$ tratamiento Cq gen constitutivo del tratamiento
- ΔCt tratamiento = Cq gen problema de tratamiento Cq gen constitutivo de tratamiento
- ΔCt control = Cq gen problema del control -Cq gen constitivo del control

7.15 Análisis Estadístico

Los datos de todas las variables cuantitativas que se obtuvieron fueron capturados y ordenados en una hoja electrónica de Microsoft Excel® para facilitar su análisis. Se utilizó el software *Prism GraphPad* para realizar la prueba de normalidad por D'agostino & Pearson y el análisis de varianza (ANOVA) y se utilizó el post hoc Dunnett para comparaciones múltiples. Se consideró un nivel de probabilidad P<0.05.

8 RESULTADOS

8.1 <u>Citotoxicidad de los antagonistas de los receptores α y β adrenérgicos</u>

La citotoxicidad de los antagonistas de los receptores α y β adrenérgicos se evaluó cuantitativamente mediante un ensayo MTT y cualitativamente por la tinción sytox green. Ambos ensayos de viabilidad mostraron que la doxazosina ejerce un efecto citotóxico dependiente del tiempo y concentración después de 24 h.

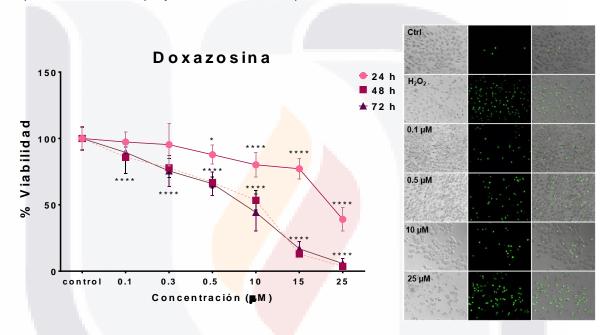


Figura 11. Doxazosina reduce viabilidad celular en la línea celular HepG2. La prueba de MTT de células HepG2 tratadas con doxazosina durante 24, 48 y 72h y la tinción sytox green muestran un decremento tiempo y dosis dependiente relacionado con el control positivo para necrosis (células HepG2 expuestas a 250 μM de peróxido de hidrógeno por 15 min). Los datos se representan como la media ± desviación estándar (n=12).*Estadísticamente significativo en comparación con el control (células intactas) (* P: 0.022, ** P: 0.0025, **** P <0.0001) por análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de Dunnett.

La viabilidad de las células HepG2 comenzó a disminuir a partir de la dosis 10 μ M con una viabilidad del 80% y con la dosis de 25 μ M disminuye hasta un 50% en el tratamiento de 24 h. Sin embargo, a 48 h y 72 h se puede analizar que la viabilidad es de 40% con la dosis de 0.5 μ M, lo que nos indica una citotoxicidad alta. En la tinción de sytox

green se observa que las células comienzan a disminuir y se tiñen los núcleos de la mayoría con las mayoría de las dosis.

Por otro lado, las células HepG2 expuestas a carvedilol aumentaron la viabilidad celular con la dosis de 25 μ M a 50% durante 24 h de exposición, sin embargo, la viabilidad disminuyó al 20% significativamente a las 48 h a las dosis de 01 y 0.5 μ M. En la exposición del fármaco a las 72 h, la viabilidad no muestra cambios, manteniéndose sin diferencias con el control.

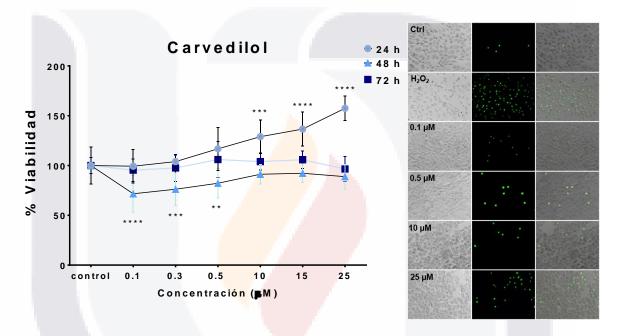


Figura 12. Carvedilol induce proliferación de las células HepG2. Viabilidad celular de células HepG2 tratadas con carvedilol durante 24 48 y 72 h muestra un aumento en el primer periodo de tiempo y una normalización a las 72 h. En la tinción sytox green se utilizaron células HepG2 expuestas a 250 μM de peróxido de hidrógeno como control positivo para la necrosis. Los datos se representan como la media ± desviación estándar (n=12).*Estadísticamente significativo en comparación con el control (** P: 0.0062, *** P: 0.0006, **** P <0.0001) por análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de Dunnett.

En la tinción de sytox green con exposición de 24 h no se muestran tanto núcleos teñidos lo que indica que carvedilol puede no ser tan citotóxico para la línea celular HepG2, a comparación del tratamiento de doxazosina. Las células con la dosis de 0.1 a 10 μ M son las que muestran menor cantidad de núcleos teñidos a comparación con el control.

En la figura 13 se observa que la tamsulosina tiene un comportamiento similar a carvedilol a 24, 48 y 72 h muestra un aumento en la proliferación en la interacción a 24 h con las dosis de 10, 15 y 25 μ M, y cuando el tiempo de exposición alcanza las 48 h la viabilidad se reduce con las dosis de 0.1, 0.3 y 0.5 μ M, sin embargo, a las dosis de 10 a 25 μ M la viabilidad no es diferente al control, y a 72 h no existen diferencias significativas entre todas las dosis y el control.

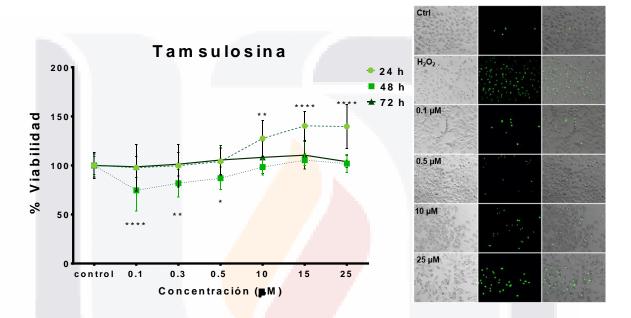


Figura 13. Tamsulosina mantiene la viabilidad y posiblemente induce proliferación en la línea celular HepG2. Viabilidad celular de células HepG2 tratadas con tamsulosina durante 24 h 48 h y 72 h muestra un ligero incremento de la viabilidad. Los datos se representan como la media ± desviación estándar (n=12). *Estadísticamente significativo en comparación con el control, se utilizaron células HepG2 expuestas a 250 μM de peróxido de hidrógeno como control positivo para la necrosis. (*P: 0.049, ** P: 0.0027, ****P<0.0001) por análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de Dunnett.

Para los tratamientos con tamsulosina se observa que la tinción de sytox green tiene un mayor número de núcleos teñidos con las dosis de 10 y 25 μ M en comparación con las dosis 0.1 y 0.5 μ M que tienen muerte celular basal igual al control.

8.2 Determinación de pretratamiento de curcumina

Se realizó un ensayo de viabilidad MTT para encontrar la concentración de curcumina capaz de proteger a las células HepG2 ante la posible citotoxicidad de los α/β adrenobloqueadores, el pretratamiento se realizó con diferentes concentraciones (0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 μ M) durante 24 h. Como se indica en la figura 14, la pérdida de viabilidad celular inicia con una dosis \geq 5 μ M hasta la dosis de 25 μ M que disminuyó significativamente la viabilidad celular hasta un 70%. Por lo tanto, se seleccionó la concentración de curcumina 1 μ M como tratamiento para experimentos posteriores.

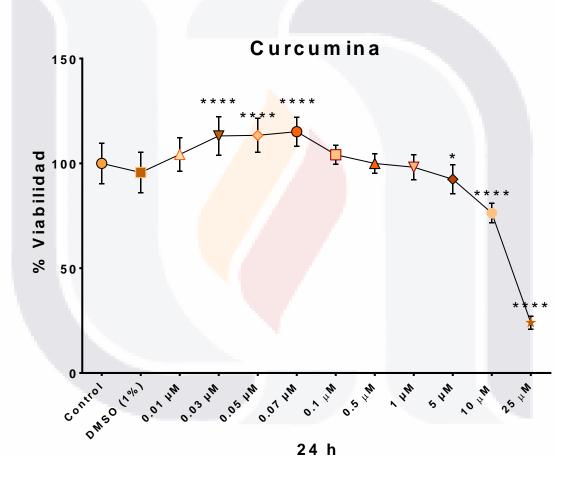


Figura 14. Hormesis de curcumina en células HepG2. La viabilidad celular comienza a disminuir en la dosis mayor a 5 μ M de curcumina. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar (n=18).*Estadísticamente significativo en comparación con el control (*P<0.05, ****P<0.0001) por análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de Dunnett.

8.3 <u>Curcumina inhibe la citotoxicidad inducida por antagonistas de los receptores α y β</u> adrenérgicos

La viabilidad celular se analizó por medio del ensayo MTT y tinción sytox green. Como lo muestran resultados previos, la exposición de las células HepG2 a doxazosina, carvedilol y tamsulosina durante 24 h indujo una citotoxicidad significativa. Sin embargo, el pretratamiento con curcumina 1 µM durante 1 h antes de la exposición a los antagonistas mejoró significativamente la viabilidad resultando en un aumento en la viabilidad hasta no mostrar diferencias significativas contra el control. Estos resultados sugieren que la curcumina ejerce un efecto protector ante el posible estrés oxidativo.

El pretratamiento de curcumina en conjunto con doxazosina no muestra diferencias significativas en comparación con el control lo que nos indica que protege las células ante el posible estrés oxidativo. En la figura 15 se observa de manera cualitativa con la tinción de sytox green que las células mantienen la viabilidad con las diferentes dosis de doxazosina.

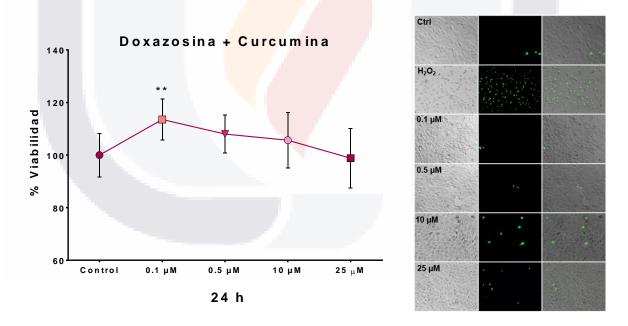


Figura 15. La curcumina reduce la citotoxicidad en las células HepG2 tratadas con doxazosina. La curcumina protege las células HepG2 contra la citotoxicidad inducida por doxazosina. La viabilidad celular se analizó con el ensayo MTT y tinción sytox green, se utilizaron células HepG2 expuestas a 250 μM de peróxido de hidrógeno como control positivo para la necrosis. Los datos se representan como la media ± desviación estándar (n=12). *Estadísticamente

significativo en comparación con el control (** P: 0.0025) por análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de Dunnett.

La curcumina en conjunto con carvedilol no muestra diferencias significativas en comparación con el control en la mayoría de las dosis lo que nos indica que protege las células ante el posible estrés oxidativo y se observa cómo se regula el crecimiento celular que se observa en la figura 12. También se observa en la tinción de sytox green que las células en todas las concentraciones del medicamento se mantienen con el mismo número de muertes que las células no tratadas (figura 16).

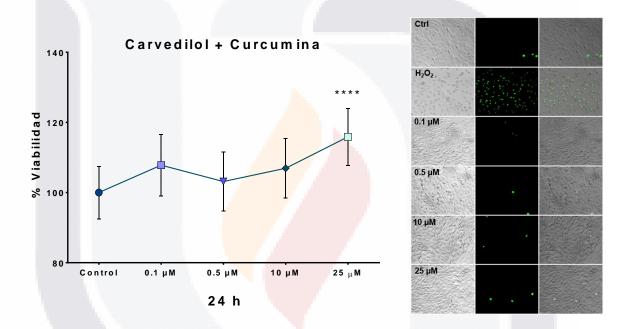


Figura 16. La curcumina regula la proliferación en las células HepG2 tratadas con carvedilol. La viabilidad celular se analizó cuantitativamente con el ensayo MTT y cualitativamente con la tinción sytox green. Los datos se representan como la media ± desviación estándar (n=12). *Estadísticamente significativo en comparación con el control y células HepG2 expuestas a 250 μM de peróxido de hidrógeno como control positivo para la necrosis. (**** P <0.0001) por análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de Dunnett.

Se observa el mismo comportamiento que en la figura 16, ya que el tratamiento de tamsulosina y curcumina no muestra diferencias significativas en comparación con el control en la mayoría de las dosis lo que nos indica que protege las células ante el posible estrés oxidativo y se observa cómo se regula el crecimiento celular que se observa en la figura 12. También se observa en la tinción de sytox green que las células en todas las concentraciones del medicamento se mantienen con el mismo número de muertes que las células no tratadas (figura 16).

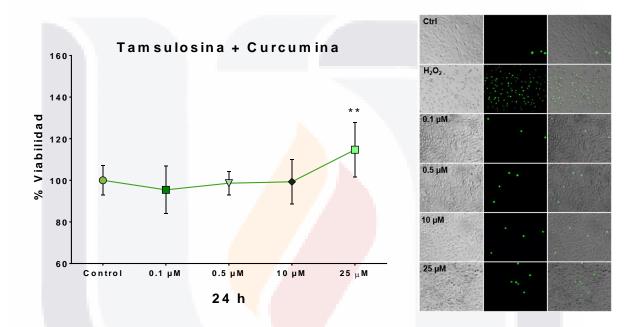


Figura 17. La curcumina mantiene la viabilidad en las células HepG2 tratadas con tamsulosina. La viabilidad celular se analizó ensayo MTT y tinción sytox green, se utilizaron células HepG2 expuestas a 250 μM de peróxido de hidrógeno como control positivo para la necrosis. Los datos se representan como la media ± desviación estándar (n=12). *Estadísticamente significativo en comparación con el control (** P: 0.0024) por análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de Dunnett.

8.4 Determinación de transaminasas (AST y ALT)

La figura 18 muestra que las células HepG2 que no se les agregó ningún fármaco (control) contienen bajas cantidades de AST y ALT intracelular basal. Sin embargo, después de la exposición a los medicamentos durante 72 h, las células mostraron daño en la membrana por permeabilidad debido al alto nivel de ALT y AST intracelular. La figura 18 A y D nos indica que incluso con dosis de 0.1 μ M, doxazosina puede permear hasta el citoplasma y solo las dosis altas entran a mitocondria. La figura 18 B y E muestran que el aumento de ALT se da solo con dosis altas de carvedilol de 25 μ M y AST aumenta con la dosis de 0.1 μ M, pero las demás dosis no muestran diferencias significativas. Por último, el tratamiento de 72 h con tamsulosina muestra un comportamiento similar a doxazosina debido a que ambos medicamentos son α adrenobloqueadores, pero tamsulosina muestra un menor aumento de ALT y con AST no se observan diferencias entre las dosis y el control solo con 25 μ M.

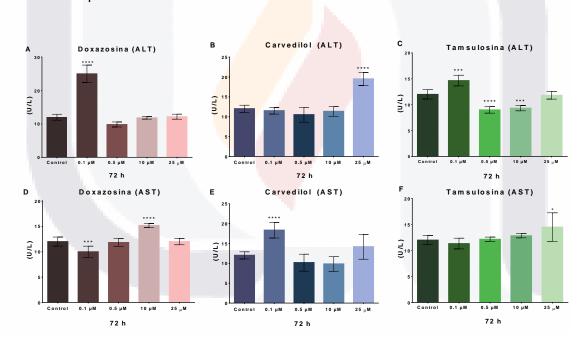


Figura 18. Cambios en la permeabilidad celular durante el tratamiento con los α y β adrenobloqueadores mediante la determinación de AST y ALT. Los medicamentos doxazosina, carvedilol y tamsulosina aumentan la concentración de transaminasas por lo menos con una dosis. El contenido de ALT y AST fue determinado después de 72 h. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar (n=6). *Estadísticamente significativo en comparación con el control (*P<0.05, ***P<0.001 ****P<0.0001) por análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de Dunnett.

Los resultados de la figura 19, muestran como la curcumina controla la liberación de enzimas AST y ALT, gracias al posible efecto protector de la permeabilidad. En las células tratadas con curcumina y doxazosina no se observa diferencia significativa entre el control y las diferentes dosis (figura 19, A,B). Con carvedilol se presenta un incremento en ambas enzimas AST y ALT con las dosis $0.1~y~0.5~\mu M$. El medicamento tamsulosina con curcumina solo presenta aumento en la enzima AST en las dosis más altas del tratamiento $10~y~25~\mu M$, sin diferencias significativas en relación con ALT. El control de curcumina $1~\mu M$ curcumina no muestra diferencias significativas en relación con el control, lo que nos indica que no altera las cantidades de AST y ALT intracelulares basales.

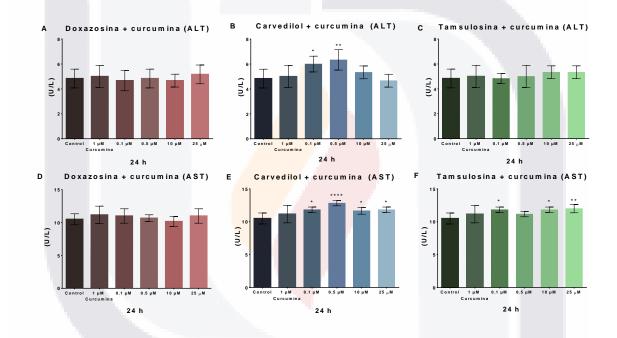


Figura 19. La curcumina controla la liberación de enzimas de daño celular AST y ALT por un posible cambio en la permeabilidad. La curcumina protegió a las células HepG2 contra el estrés oxidativo inducido por los medicamentos doxazosina, carvedilol y tamsulosina. El contenido de ALT y AST en las células con pretratamiento de curcumina y los α /β adrenobloqueadores fue determinado después de 24 h. Los datos se representan como la media ± desviación estándar (n=6). *Estadísticamente significativo en comparación con el control (*P<0.05, **P<0.001, ***** P<0.0001) por análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de Dunnett.

8.5 Efectos de α y β adrenobloqueadores en la monocapa de las células HepG2

Los cambios morfológicos de las células HepG2 a nivel monocapa después de la exposición a los α y β adrenobloqueadores durante 24 h mostraron una disminución en la

interacción entre las células a comparación con el control, agregados de células eosinofílicas con carvedilol y tamsulosina y balonización dependiente de la dosis con doxazosina. En la figura 20 se observa el daño general a la morfología celular, y a la monocapa con doxazosina se pierden las conexiones celulares y con carvedilol y tamsulosina existen conglomerados celulares con las dosis de 25 µM. Sin embargo, cuando se hace el pretratamiento con curcumina se observó que se protege la viabilidad y la morfología del cultivo celular durante una interacción con doxazosina, tamsulosina y carvedilol. Viéndose reflejado en la disminución de la muerte celular, se mantiene la integridad de la monocapa debido al aumento de interacción entre las células, se visualizan menos agregados celulares y disminuye la cantidad de células balonizadas (figura 21).

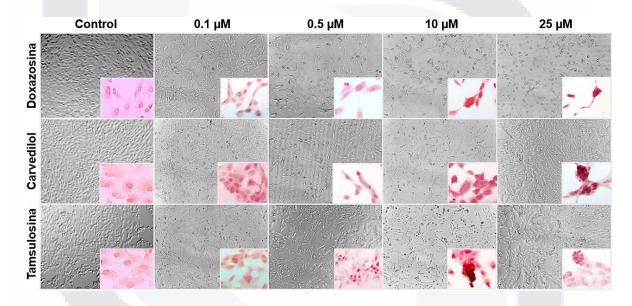


Figura 20. Efectos de doxazosina, carvedilol y tamsulosina sobre la integridad de la monocapa de la línea celular HepG2. Los principales cambios morfológicos en las células se observan como: alteración de la monocapa, disminución de la interacción celular, agregados de células eosinofílicas y balonización. En doxazosina los cambios observados son disminución de la interacción celular y balonización y son dependientes de la dosis. Carvedilol y tamsulosina muestran agregados de células eosinofílicas con las dosis de 10 y 25 μΜ. Los tratamientos durante 24 h se visualizaron mediante tinción de hematoxilina y eosina (40x).

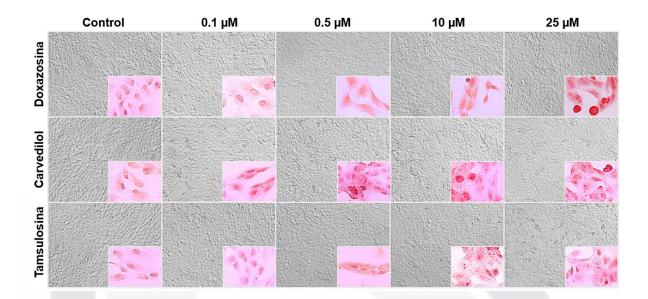


Figura 21. La curcumina protege la integridad de la monocapa durante una interacción con los medicamentos ya probados antifibróticos. La curcumina disminuye la muerte celular, mantiene la integridad de la monocapa, aumenta la interacción entre las células, menos agregados celulares y disminuye la balonización. Con curcumina y doxazosina la muerte celular y células balonizadas disminuyeron hasta recuperar por completo la integridad de la monocapa. Con curcumina en conjunto con carvedilol y tamsulosina no se observan agregados celulares eosinofílicos. Los tratamientos durante 24 h se visualizaron mediante tinción de hematoxilina y eosina (40x).

8.6 Efectos ultraestructurales de las células HepG2

Las células HepG2 mostraron cambios posiblemente pro-apoptóticos dependientes del tiempo y de la dosis de los medicamentos, en la interacción a 24 horas, se identificó que las células HepG2 sufrían contracción citoplasmática, condensación nuclear y desprendimiento de las células vecinas (Fig. 22). Las células expuestas a dosis ≥ 10 μM de los medicamentos presentaron características como: balonización o redondeo celular, condensación de orgánulos citoplasmáticos, seguido de la aparición de irregularidades en la superficie celular y formación de vesiculaciones seguidas de fragmentación celular y aparición de cuerpos apoptóticos.

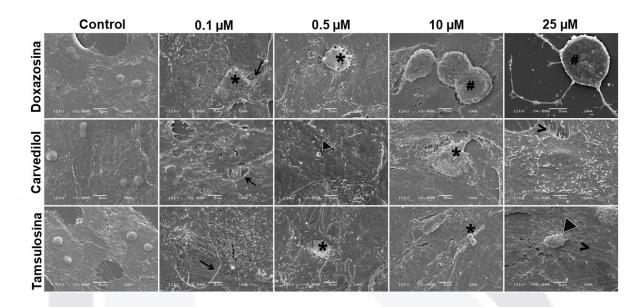


Figura 22. Efectos ultraestructurales de doxazosina, carvedilol y tamsulosina sobre las células HepG2. Los efectos ultraestructurales en las células HepG2 expuestas a los α y β adrenobloqueadores muestran cambios progresivos característicos de la muerte celular programada (apoptosis), los efectos fueron dependientes de la dosis de los medicamentos. Flecha (→): superficie celular irregular con pliegues de la membrana celular, Asterisco (*): contracción celular con formación de vesículas seguidas de fragmentación, Numeral (#): balonización que resulta en separación de células vecinas, Mayor que (>): superficie celular irregular con proyecciones radiadas, Punta de flecha (Δ): posible cuerpo apoptótico. Los tratamientos durante 24 h se visualizaron bajo un Microscopio Electrónico de Barrido (Aumento 3000x, barra de escala de 5 μm).

Sin embargo, cuando las células se exponen al tratamiento de curcumina en conjunto con los α/β adrenobloqueadores (figura 23), la morfología no muestran diferencias entre las células tratadas y las células no tratadas (controles), las características morfológicas que se pueden describir son: a) microvellosidades de las uniones intercelulares normales, b) núcleos o binúcleos de tamaño y forma normal, c) interacción entre células y morfología normal, d) no se observa la formación de vesículas que indiquen inicio de apoptosis o necrosis.

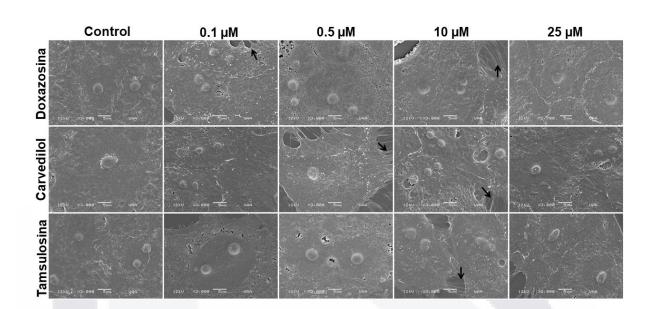


Figura 23. La curcumina reduce las variaciones morfológicas relacionadas con daño celular ocasionadas por los fármacos α y β adrenobloqueadores. La morfología de las células expuestas a curcumina como tratamiento previo a los medicamentos presenta vellosidades y uniones intercelulares normales señaladas con una flecha (→), las células presentan núcleos o binúcleos de tamaño y forma normal, no se observa la formación de vesículas o balonización celular lo que nos indica que las células no están en procesos de muerte celular (apoptosis o necrosis). Los tratamientos durante 24 h se visualizaron bajo un Microscopio Electrónico de Barrido (Aumento 3000x, barra de escala de 5 μm)

8.7 Evaluación de la expresión genética de marcadores de estrés oxidativo en células HepG2 y detección de apoptosis

La expresión genética se evaluó, en células HepG2 expuestas al rango de dosis de los αβ adrenobloqueadores de 0.1 a 25 μM por 24 h. Mediante la técnica de RT-PCR se analizó la expresión del gen: factor de transcripción Nrf2, hemo oxigenasa 1 (HO-1) marcadores de estrés oxidativo, linfoma de células B2 (Bcl-2) gen anti apoptótico y el gen constitutivo 18S RNA ribosomal (18SrRNA). La integridad del RNA de las células tratadas con los medicamentos en ausencia y presencia de curcumina fue analizada en el gel de agarosa (figura 24, 1). La comprobación de los oligonucleotidos forward y reverse se observan en la (figura 24, 2) y la reacción en cadena de la polimerasa para analizar la calidad del cDNA se observa en la figura (24, 3) de muestras al azar y como comprobación de la retrotranscripción se observan las bandas correspondientes a 700 pb del control actina.

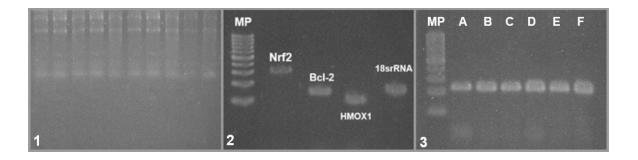


Figura 24. Validación de la integridad de RNA y especificidad de los oligonucleotidos para blancos y constitutivos. 1) Integridad de ARN de células HepG2 tratadas con doxazosina, carvedilol y tamsulosina. 2) Comprobación de oligonucleotidos forward y reverse usados en RT-PCR. MP: marcador de peso molecular, Bcl-2: Linfoma de células B2, El factor de transcripción (Nrf2), HMOX1: Hemo oxigenasa 1 y 18srARN ribosomal. 3) Reacción en cadena de la polimerasa de muestras de cDNA con oligonucleótidos control de actina: MP) Marcador de Peso Molecular A) Doxazosina 0.1 μM B) Doxazosina 0.5 μM C) Tamsulosina 25 μM D) Tamsulosina 0.1 μM E) Carvedilol 0.5 μM F) Carvedilol 25 μM.

Otro resultado a analizar es la curva de fusión de los productos, estas se obtuvieron después de la amplificación y como consecuencia del decaimiento de la señal fluorescente debido a la fusión dependiente de temperatura de los bancos. Se analizó la gráfica de amplificación con la sonda SYBR Green y no se observan productos inespecíficos o dímeros de oligonucleotidos en ningún gen.

En la figura 25 se observan las pruebas de validación de los oligonucleotidos utilizados tanto blancos de expresión como constitutivos, además, se muestra la curva de fusión de renaturalización y desnaturalización. Así como los gráficos de amplificación para el gen constitutivo 18srRNA donde se observa que amplifica en un rango de CT de aproximadamente 20 ciclos. En la figura 26 se muestra la curva de fusión de renaturalización y desnaturalización. Así como los gráficos de amplificación para el gen anti apoptótico Bcl-2 donde se observa que amplifica en un rango de CT de aproximadamente 20 ciclos.

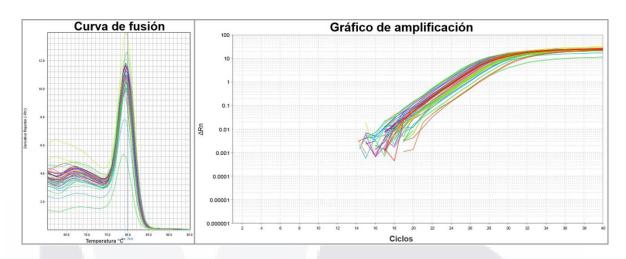


Figura 25. Curva de fusión y grafica de amplificación de RT-PCR de expresión de 18srRNA en células HepG2 en tratamiento con α/β adrenobloqueadores en ausencia y presencia de curcumina. No muestran productos inespecíficos o dímeros de oligonucleotidos.

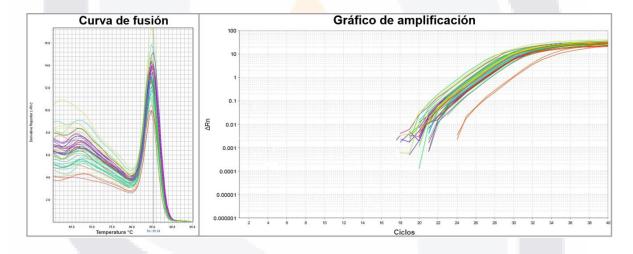


Figura 26. Curva de fusión y grafica de amplificación de RT-PCR de expresión de Bcl-2 en células HepG2 en tratamiento con α/β adrenobloqueadores en ausencia y presencia de curcumina. No muestran productos inespecíficos o dímeros de oligonucleotidos.

En la figura 27 se observa la expresión de los genes de células HepG2 tratadas con doxazosina y co-tratamiento con curcumina y se puede ver en la figura 27 (A y D), el tratamiento con doxazosina redujo la expresión de Bcl-2 y con curcumina aumento su expresión. Los marcadores de estrés oxidativo Nrf2 y HO-1 mostraron una relación dosisefecto y Nrf2 aumentó con las dosis bajas y disminuyó con el aumento de dosis posiblemente debido a la muerte celular.

Las características morfológicas de células apoptóticas inducidas por los medicamentos se determinaron mediante tinción de naranja de acridina. Los resultados demostraron que después de la incubación de los doxazosina por 24 horas las células HepG2 existen una serie de cambios morfológicos que incluyen vesiculación y formación de cuerpos apoptóticos con relación a las células control que muestran una morfología normal o con respecto a las células tratadas con curcumina, siendo el co-tratamiento con curcumina un protector ante el posible efecto pro apoptótico de doxazosina.

Los tratamientos con carvedilol un β adrenobloqueador con propiedades antioxidantes muestran el aumento de la expresión de Bcl-2 con las dosis de 0.1 y 0.5 μM, y un aumento dosis dependiente en Nrf2 con y sin curcumina. En el gen HO-1 se observa un decremento conforme aumentan las dosis del medicamento con y sin curcumina. Posiblemente con un efecto prooxidante cuando se hace el co-tratamiento con curcumina ya que en la tinción naranja de acridina se observa una mayor concentración celular pero también un aumento en la coloración de posibles cuerpos apoptóticos o células con vesículas (figura 28).

Los tratamientos tamsulosina inducen el aumento en la expresión de Bcl-2 con las dosis de 10 y 25 µM y con el co-tratamiento de curcumina se observa un aumento de hasta el doble, la expresión del gen Nrf2 con las dosis de 10 y 25 µM aumenta hasta 30 veces a comparación con el control y con curcumina disminuye la expresión. En el gen HO-1 se observa un aumento con tamsulosina, sin embargo, con curcumina la expresión no muestra cambios significativos con el control. La expresión genética nos indican que la tamsulosina con curcumina no altera los marcadores de muerte celular ni los marcadores de estrés oxidativo (figura 29).

El tratamiento con los α y β adrenobloqueadores muestra una coloración dependiente de la dosis similar a la del control de H_2O_2 que refleja células altamente comprometidas con una alta coloración roja que indica contracción de a membrana y formación de vesículas como respuesta a muerte apoptótica. La tinción naranja de acridina nos indica que con el tratamiento de curcumina en sinergia con los medicamentos existe una reducción en la coloración roja que se puede comparar con la coloración en células sanas (control) ya que se observa una tinción distribuida en el citoplasma.

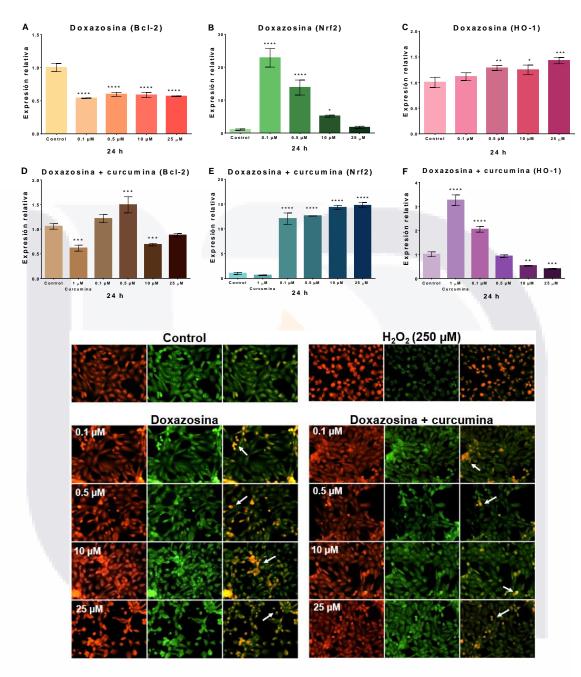


Figura 27. Efecto protector de la curcumina en el co-tratamiento con doxazosina mediante la posible activación de marcadores de regulación de estrés oxidativo. 1) En ausencia de la curcumina se observó disminución en la expresión de Bcl-2, en presencia de la curcumina aumento la expresión de Nrf2 controlando la apoptosis, la expresión de Nrf2 muestra un decremento dependiente de la dosis y HO-1 incremento. 2) Detección de células apoptóticas (flecha) en células HepG2 expuestas a doxazosina en presencia o ausencia de curcumina, existe mayor tinción de vesículas en el tratamiento con doxazosina. Los tratamientos durante 24 h se visualizaron mediante tinción naranja de acridina (20x).

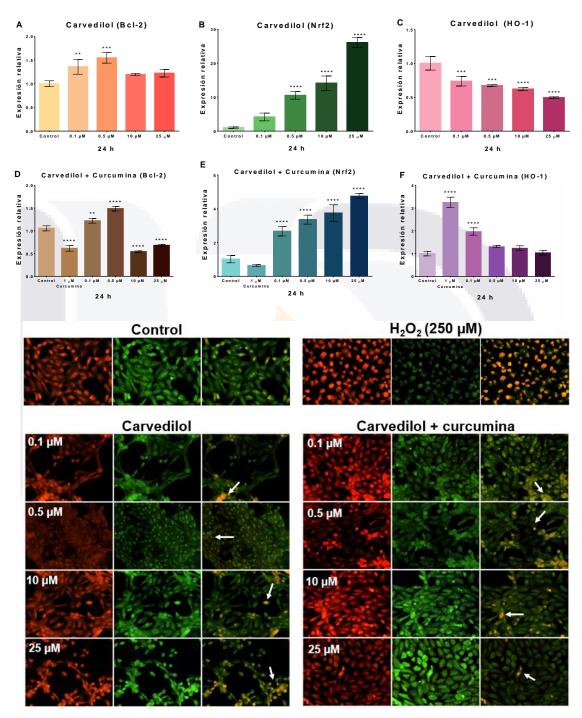


Figura 28. El co-tratamiento de carvedilol y curcumina afecta la activación de marcadores de regulación de estrés oxidativo y las células son susceptibles al proceso de apoptosis. 1) Aumento en la expresión de Bcl-2 y Nrf2. Decremento en la expresión de HO-1 en ausencia y presencia de curcumina. 2) Detección de células apoptóticas (flecha) en la línea celular HepG2 con carvedilol la tinción no muestra diferencias al tratamiento de curcumina y carvedilol. Los tratamientos durante 24 h se visualizaron mediante tinción naranja de acridina (20x).

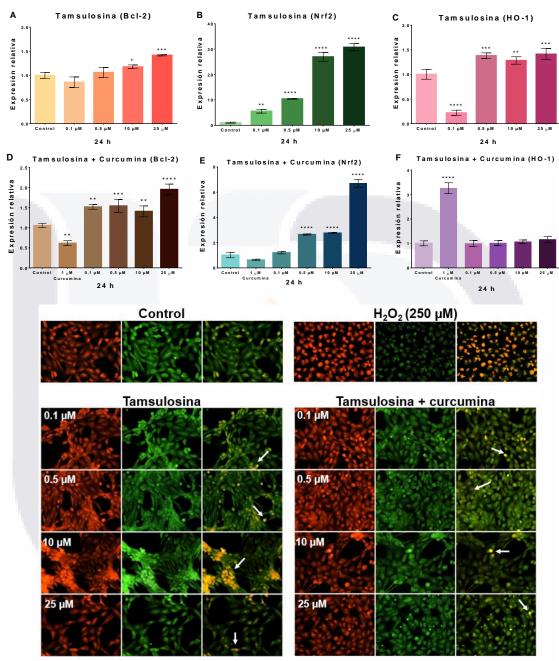


Figura 29. El co-tratamiento de curcumina con tamsulosina no altera los marcadores de regulación de estrés oxidativo y por lo tanto no se inicia el proceso apoptótico regulado por Bcl-2. 1) Cambios en la expresión de los genes Bcl-2, HO-1 y Nrf2 generados por la interacción de la tamsulosina con las células HepG2, en presencia y ausencia de curcumina aumenta la expresión de Bcl-2 y Nrf2. 2) Detección de células apoptóticas (flecha) en la línea celular HepG2 con el tratamiento de tamsulosina las células aumentaron la coloración y con curcumina se disminuyeron las células apoptóticas. Los tratamientos durante 24 h se visualizaron mediante tinción naranja de acridina (20x).

9 DISCUSIÓN

En relación con los antecedentes donde se utilizan los medicamentos en la fibrosis hepática se han observado cambios morfológicos y alteración en marcadores de proliferación hepática. A partir de estos resultados se desarrolló el presente proyecto donde observamos estos principales hallazgos: 1) citotoxicidad, 2) cambios morfológicos y 3) cambios en la expresión de genes de respuesta antioxidante y de muerte celular en hepatocitos. Estas alteraciones morfológicas, en citotoxicidad y expresión han sido reguladas por el pretratamiento con curcumina.

En el estudio de (González-Juanatey et al., 2003) se investigó la citotoxicidad de diferentes alfa adrenobloqueadores doxazosina, prazosina, 5-metilirapidil y teratozina en células HL-1 (derivadas de cardiomiocitos) como modelo *in vitro* porque mantienen el fenotipo y los elementos intracelulares y de superficie celular. Se reporta que todos los alfa adrenobloqueadores doxazosina y prazosina indujeron apoptosis de manera dosis dependiente y doxazosina muestra cambios significativos en disminución de viabilidad con la dosis de 0.1 μ M/L, estos resultados fueron confirmados con tinción de Hoechst y los estudios se hicieron de 24, 48 y 72 h. En nuestros resultados se puede observar que doxazosina tiene el mismo comportamiento dosis y tiempo dependiente. Se muestran cambios en la viabilidad a partir de la dosis de 0.1 μ M a 24 horas y se confirmaron los resultados con la tinción sytox green. Sin embargo, carvedilol (β adrenobloqueador) con actividad antioxidante y tamsulosina antagonista selectivo de los adrenoceptores α 1A y α 1B mostraron un aumento significativo en la viabilidad celular dependiente de la dosis a 24 h, y después de 72 h el mecanismo de proliferación celular fue normalizado.

La doxazosina es el único de los tres medicamentos usados en el presente trabajo con una alta citotoxicidad, esta característica adversa de la doxazosina también ha sido reportado por diferentes autores entre ellos (Garrison et al., 2006), que describen a la doxazosina como agente citotóxico a dosis de 25 µM en líneas celulares epiteliales de próstata, por esta razón se utilizó esta dosis en este trabajo como marcador de daño. El mecanismo de daño propuesto es a través del aumento de la activación de la caspasa 8 por la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC) la caspasa 8 puede detener el ciclo celular en la fase G2-M y activar la caspasa 3 así como la tBid encargada de la liberación del citocromo c en el receptor BAX/Bak (Desiniotis & Kyprianou, 2011). Esto

resulta como la liberación de factores inductores proapoptóticos relacionados con estrés mitocondrial: citocromo c Smac/DIABLO, AMID y AIF (Harris et al., 2007).

Forbes et al., en (2016) reporto que la mayor activación de la caspasa 3 en la línea celular CaP es con el tratamiento de doxazosina, en el estudio se utilizaron diferentes α adrenobloqueadores: teratozina, silodosina, tamsulosina y alfuzosina. Doxazosina aumenta hasta 6 veces más la activación de la caspasa 3 en las células que son dependientes de andrógenos, es decir, estas células son más sensibles a la toxicidad del medicamento. La caspasa 3 es un marcador de apoptosis que se activa por medio de DISC por el aumento de FADD (Batty et al., 2016).

Los estudios de (Forbes et al., 2016) también compararon la citotoxicidad de doxazosina y tamsulosina y demostraron que existe un aumento dependiente de la dosis en la activación de la caspasa 3 seguida de respuesta apoptótica cuando existe la estructura quinazolina para confirmar esto se reportó un decremento de HIF-1 que es un mediador de resistencia en la línea LNCaP después de que se expusieron a quinazolina. En nuestro trabajo también se compararon ambos a adrenobloqueadores a nivel citotóxico y doxazosina muestra mayor decremento en la viabilidad celular incluso en tratamientos de 24 h se propone debido a que doxazosina tiene una estructura basada en quinazolina y tamsulosina en sulfonamida.

Se demostró en las investigaciones de (Lin et al., 2007) que doxazosina provoca un aumento en la fragmentación del ADN, detención del ciclo celular en la fase G2 y apoptosis por la inactivación de CDK1. También, se sugiere que la doxazosina interrumpe el ciclo celular por las quinazolinas gracias a la inhibición competitiva de ATP de la tirosina quinasa y la inhibición de la fosforilación de PI3K de los receptores HER2, EGF y VEGF (Anglin et al., 2002).

(Desiniotis & Kyprianou, 2011) propusieron que, en adición al daño por citotoxicidad, la quinazolina altera la integridad del ADN por la intercalación, fenómeno que ocurre en quimioterapias con antraciclinas. En comparación con nuestro trabajo donde se usó una dosis de 25 μM como indicador de daño, se demostró que la doxazosina a esa dosis fragmenta el ADN porque inhibe la topoisomerasa 1 e incrementa la apoptosis y detención del ciclo celular que tiene como efectos la disminución de supervivencia celular y no existe

la migración ni adhesión celular (Tahmatzopoulos et al., 2005). Efectos que no han sido probados en tamsulosina.

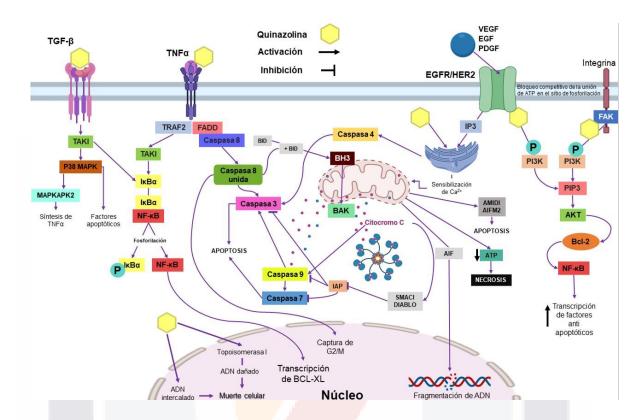


Figura 30. Mecanismos citotóxicos propuestos a los α-antagonistas basados en quinazolina. Imagen modificada de (Batty et al., 2016).

(Partin et al., 2003) demostraron que las quinazolinas regulan negativamente VEGF, que resulta en la reducción de la represión del receptor TGF-β y es responsable de la transcripción de varios factores de apoptosis así como del aumento de IκΒα; el inhibidor de NF-κB (Anglin et al., 2002; Desiniotis & Kyprianou, 2011). (Forbes et al., 2016) también demostraron que existe un aumento en diferentes factores de estrés como p38α y MAPK, en las células PCa tratadas con α-antagonistas, lo que indica que se activó TGF-β. La inhibición de esta vía de señalización bloquea Bcl-2, un factor inhibidor de anoikis que se identifica en CRPC y es un mediador de la inmunidad celular a través de mutaciones de la vía de derivación (Desiniotis & Kyprianou, 2011) (Figura 30).

Diversos autores han estudiado el uso de la curcumina con fines terapéuticos, por sus propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes (Hatcher, Planalp, Cho, Torti, & Torti, 2008). Es un excelente candidato por su baja toxicidad. Aunque una de las

principales características de la curcumina, es poseer propiedades antioxidantes y prooxidantes que están estrechamente relacionadas con los procesos de muerte celular y autofagia. Por esta razón se hizo una estandarización con ensayo MTT para determinar la concentración de curcumina que no indujera muerte celular en la línea celular HepG2 y encontrar una dosis para posteriores experimentos (figura 14).

En investigaciones *in vitro* de (Rainey, Motte, Aggarwal, & Petit, 2015) se informó que la curcumina en dosis muy bajas (≤1 μM) se comporta como antioxidante, pero a dosis medias en un rango de (5 a 10 μM) se comporta como un inductor de autofagia por la reducción de la acetilación de proteínas citoplasmáticas (Pietrocola et al., 2012) y bloquea el ciclo celular, por ultimo con dosis mayores a 25 μM, se induce la muerte celular.

Gracias a esto decidimos hacer un ensayo de MTT con diferentes concentraciones con rangos de 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 25 μ M durante 24 h, y observamos que las dosis \leq 1 μ M incluso aumentaron la viabilidad a comparación del control, las células tratadas con dosis \geq 5 μ M disminuyeron significativamente la viabilidad. Por esto se decidió usar la concentración de 1 μ M.

(Moustapha et al., 2015) demostró en estudios *in vitro* en células Huh-7 que la curcumina es absorbida rápidamente por las células, en una proporción 1/20 a comparación con la concentración externa debido a que es lipofílica y puede acumularse en las membranas intracelulares. Además, detectaron curcumina a nivel de retículo endoplásmico y lisosomas. En otro experimento demostraron que la curcumina desestabiliza la mitocondria que se manifiesta con la caída de $\Delta\Psi_m$ y producción de ROS.

Se sugiere que la curcumina es un mediador de la apoptosis celular a través de la desestabilización lisosomal, ya que cuando logra entrar a la célula desestabiliza la membrana lisosomal que desencadena en liberación de enzimas lisosomales en el citosol e induce metaloproteinasas de matriz extracelular por la escisión de Bid y deslocalización de Bax que termina como inflamación mitocondrial, liberación del citocromo C y producción de ROS. Posteriormente el exceso de ROS desestabiliza la integridad de la membrana lisosomal y mejora la permeabilización de la membrana lisosomal de las células tratadas con curcumina (Moustapha et al., 2015).

Nuestros resultados de viabilidad celular con pretratamiento de curcumina 1 μM mostraron una recuperación de la viabilidad celular en MTT como en tinción sytox green hasta de un 100% a comparación con las células control. Posiblemente debido a que los medicamentos doxazosina, carvedilol y tamsulosina inducen estrés oxidativo en las células y la curcumina induce procesos de "supervivencia" autofágica, que intentan descartar las mitocondrias no funcionales y salvar a las células de una mayor destrucción. Sin embargo, si el contraste inicial entre la apoptosis y la autofagia no tiene éxito, una tercera vía conduce a la muerte celular. En este caso, la permeabilización de la membrana lisosomal da como resultado la liberación de catepsinas que activan la caspasa 8 y 3/9, para garantizar la muerte de las células (Moustapha et al., 2015).

Por lo tanto, los α y β adrenobloqueadores podrían estar causan disfunción de plegamiento de proteínas, y proteínas acumuladas mal plegadas/desplegadas e inducir estrés reticular, gracias a un desequilibro en el estado redox, o por la alteración de la función del RE, como la glicosilación y el transporte al complejo de Golgi (Kaufman, 1999).

En un estudio se demostró que la autofagia podría ser activada por los inductores clásicos de estrés reticular en células de mamíferos. Sin embargo, la autofagia reduce el estrés del RE y reduce la muerte celular en las células cancerosas, pero no en las no transformadas (Ding et al., 2007).

El estrés oxidativo es considerado como un estímulo apoptótico importante en diferentes enfermedades y las producción de ROS pueden desencadenar la apoptosis (Yoon et al., 2017). Las principales enzimas indicadoras de estrés oxidativo y daño hepático son MDA, AST y ALT. La MDA es el producto final de la peroxidación lipídica y los niveles de MDA reflejan la extensión del daño celular debido al estrés oxidativo (Torun et al., 2009).

Estudios previos han demostrado en un modelo de células HepG2 el efecto del glicirrizato (un antioxidante) en los sistemas de defensa antioxidantes analizando los niveles de AST, ALT y MDA con y sin H₂O₂, demostrando que el H₂O₂ induce aumento de AST, ALT y MDA y reducción en la actividad de SOD y el pretratamiento con glicirrizato protegió eficazmente a las células HepG2 del daño inducido y disminuyó el nivel de ALT, AST y MDA (Su et al., 2016).

Con base en lo anterior en el presente trabajo se analizaron las enzimas AST y ALT de las células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de α y β adrenobloqueadores y se observó un aumento en ambas enzimas con la concentraciones de 0.1 y 10 μM de doxazosina y 0.1 y 25 μM carvedilol y 0.1 μM de tamsulosina, sin embargo, el pretratamiento de curcumina disminuyó el nivel de AST y ALT contrarrestando el efecto oxidante de los medicamentos.

(Faa et al., 1994) estudiaron el efecto de la cicloheximida en células hepáticas a nivel histológico con tinción de hematoxilina y eosina como en el nivel ultraestructural con microscopia electrónica de barrido. Describieron las etapas de apoptosis en hepatocitos de rata, en cuatro fases secuenciales: 1) contracción celular, 2) fragmentación celular, 3) liberación de glóbulos en los sinusoides, 4) fagocitosis y digestión de los glóbulos por hepatocitos y células Kupffer. Otra de las características observadas en los hepatocitos fue ultraestructuras de coloración blanca o con mayor brillo en la fotografía, debido a la pérdida progresiva de agua, y esto sugiere una fragmentación progresiva del cuerpo celular y cada fragmento da lugar a un cuerpo apoptótico.

En nuestro trabajo los resultados de las ultraestructuras analizadas con microscopia electrónica de barrido indican que doxazosina, carvedilol y tamsulosina inducen proceso pro apoptóticos que son dependientes de la dosis, sin embargo, doxazosina muestra más cambios morfológicos como balonización y separación de las células que resultan en formación de vesículas o cuerpos apoptóticos y tamsulosina muestra menores cambios en las células como superficies irregulares con proyecciones radiadas. Con el tratamiento de curcumina la morfología celular presenta vellosidades y uniones intercelulares normales sin presencia de vesículas, lo que indica que inhibe el proceso apoptótico.

En la evaluación de la monocapa celular por hematoxilina y eosina se observa que los α y β adrenobloqueadores alteran la formación de la monocapa y disminuyen la interacción celular y existen agregados eosinofílicos o fase 3 del proceso apoptótico, sin embargo, con curcumina se restablece la monocapa y la interacción celular.

De acuerdo con (Brenner, Galluzzi, Kepp, & Kroemer, 2013) el hígado está expuesto a estímulos biológicos y químicos, y los hepatocitos deben mantener la homeostasis celular. Los procesos clave en este contexto son la respuesta al estrés del retículo endoplásmico, la autofagia y la respuesta al estrés redox.

La apoptosis puede ser activada por vía intrínseca o extrínseca, en ambas vías las caspasas son un grupo de cisteína proteasa específica del aspartato, que tienen un papel clave en el proceso de la apoptosis inducida por el estrés oxidativo. Inicialmente la caspasa-3 es un efector importante en el proceso apoptótico, y la caspasa-9 es un iniciador de la caspasa-3 en la vía dependiente de la mitocondria (B. Jiang, Xiao, Shi, Liu, & Xiao, 2005).

En el estudio de Su et al., en (2016) células HepG2 se sometieron a un tratamiento con H₂O₂ y se reportó un aumentó la expresión de caspasa-9 indicativo de la activación de la vía apoptótica mitocondrial por estrés oxidativo. Después de la activación de la cascada de caspasas las proteínas Bcl-2 son las reguladoras de la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas mitocondriales. Bcl-2 es el principal protector contra la muerte celular y las proteínas Bax promueven la apoptosis, en el estudio se demostró que el glicirrizato (antioxidante) inhibe la expresión de Bax y aumenta Bcl-2.

En nuestro estudio los tratamiento de los α y β adrenobloqueadores con curcumina en las células HepG2 aumentaron la expresión relativa en el gen Bcl-2, por lo que se podría concluir que la muerte celular resultado de los tratamientos con los medicamentos está regulada por las proteínas de la familia Bcl-2 y su baja expresión induce liberación del citocromo c de las mitocondrias dañadas que se une a la molécula adaptadora APAF-1 y a una caspasa iniciadora que se encuentra inactiva (procaspasa 9) dentro del complejo multiprotéico llamado apoptosoma, que conduce a la activación de la caspasa 9 y termina como la activación de las caspasas 3 y 7 que produce cambios morfológicos y bioquímicos asociados con la apoptosis (Su et al., 2016). Por lo tanto, la expresión positiva de Bcl-2 de curcumina puede ser un mecanismo clave para regular la antiapoptosis inducida por ROS en células HepG2.

Estudios de (Singh et al., 2006) demostraron que Nrf2 influye en la resistencia a los fármacos en función de su propiedad para inducir enzimas desintoxicantes, proteínas antioxidantes y transportadoras de fármacos. Aunque el mecanismo todavía se desconoce Niture & Jaiswal, (2012) demostraron que Nrf2 puede reducir la muerte celular por apoptosis en células HepG2 por la resistencia a fármacos. Nrf2 puede aumentar la regulación de la proteína anti apoptótica Bcl-2 y disminuir Bax, el citocromo c es liberado de las mitocondrias, se activan las caspasas y hay una disminución de la fragmentación del ADN y hay una reducción significativa de la muerte celular apoptótica y aumento supervivencia.

(Niture & Jaiswal, 2012) demostraron en cinco líneas celulares entre ellas HepG2 que la regulación positiva de Bcl-2 puede ser mediada por Nrf2 y puede disminuir la apoptosis y llevar a la supervivencia celular y resistencia a fármacos. Reportaron que la inhibición de Bcl-2 en células activadas por t-BHQ/Nrf2 aumentó la muerte celular y redujo la supervivencia celular en comparación con t-BHQ/Nrf2/Bcl-2 células activadas. Estos resultados sugieren que la activación de Nrf2 y el aumento de Bcl-2 contribuyen a la regulación de Nrf2 de la muerte y supervivencia celular apoptótica celular. También se hicieron estudios de mutagénesis por deleción y transfección y estos identificaron AREr3 entre los nucleótidos 3148 y 3140 del promotor del gen Bcl-2 como el elemento de ADN que se unía a Nrf2 y activaba la expresión del gen Bcl-2.

Nrf2 regula positivamente de manera coordinada la expresión del gen Bcl-2 junto con un conjunto de genes citoprotectores que codifican enzimas desintoxicantes, proteínas antioxidantes y transportadores de fármacos (Kaspar et al., 2009). Por lo tanto, se puede reportar que la activación de las proteínas protectoras contra estrés oxidativo como HO-1 y Bcl-2 contribuyen a la reducción de la apoptosis y al aumento de la supervivencia celular (Niture & Jaiswal, 2011).

Se ha demostrado en cultivo celular de astrocitos que la inducción de HO-1 por curcumina se asocia con cambios transitorios y marcados en la proporción intracelular de GSH/GSSG, debido a que Keap1 contiene residuos de cisteína altamente reactivos; y aunque actualmente se desconoce la modificación química que señala la disociación del complejo Keap1-Nrf2, existe una modulación específica de tioles por electrófilos en Keap1 que podría promover un cambio conformacional que libere la proteína Nrf2, favoreciendo así su translocación al núcleo. Se propone que la curcumina puede funcionar como receptora de la reacción de Michael como inductora de enzimas desintoxicantes por la reactividad del grupo tiol (Dinkova-Kostova et al., 2001). El hecho de que el donante de tiol N-acetil-L-cisteína sea incapaz de prevenir el aumento de la actividad de la hemo oxigenasa por los tratamientos con curcumina puede indicar que los compuestos poli fenólicos reaccionan con cisteínas selectivas ubicadas en factores de transcripción u otras proteínas involucradas en las vías de transducción de señales (Balogun et al., 2003).

En la figura 9 se muestra un posible mecanismo del papel de la curcumina en la ruta de Nrf2 y Bcl-2 en la reducción de la apoptosis y supervivencia celular. La administración de curcumina (antioxidante) lleva a la disociación de Nrf2 de Keap1, Nrf2 se estabiliza y se

transloca al núcleo donde se une a la respuesta del elemento antioxidante (ARE) en la región promotora del gen Bcl-2, lo que resulta en un aumento en la transcripción del gen Bcl-2 y genes de respuesta al estrés oxidativo como HO-1. El aumento en las transcripciones del gen Bcl-2 se traducen en un aumento en la proteína Bcl-2 y desencadena una disminución significativa de Bax, liberación de citocromo c, caspasas 3/7 y culmina con la supervivencia celular debido a la reducción de la apoptosis reflejado en la expresión genética de estos genes y disminución de células teñidas con naranja de acridina.

En estudios *in vitro*, en células HepG2 de (Plemel et al., 2017) se estudiaron los mecanismos de muerte celular a partir de la señal roja de la tinción de naranja de acridina de diferentes compuestos generadores de estrés oxidativo como H₂O₂. Relacionando una mayor señal con la fragmentación de estructuras celulares e inicio del proceso apoptótico. El control positivo de daño mostraba alta coloración roja dentro del núcleo. En nuestro trabajo se observa que los tres medicamentos inducen la respuesta apoptótica dependiente de la dosis por el aumento de coloración en las células comparadas con nuestro control de daño (H₂O₂) sin embargo cuando se analizaron las células con curcumina esta señal roja disminuyo probando que puede tener un efecto anti-apoptótico.

En este estudio, el tratamiento con curcumina puede aminorar los daños por estrés oxidativo, sin embargo, se observó en la expresión genética de los marcadores de estrés oxidativo y la tinción naranja de acridina del tratamiento de curcumina y carvedilol podrían estar causando apoptosis en las células debido a un efecto prooxidante, posiblemente debido a que según estudios previos de (Budni et al., 2012) se ha sugerido que carvedilol tiene propiedades protectoras ante enfermedades cardiovasculares por su efecto antioxidante. (Nakamura et al., 2002) determino que los niveles de peróxidos de lípidos se elevan con miocardiopatía dilatada y el carvedilol reduce la peroxidación de lípidos. El carvedilol, al ser un agonista específico de los AR β 1 y β 2, activa selectivamente la señalización mediada por β -arrestina (Wisler et al., 2007) y también se ha demostrado que activa la señalización de EGFR-ERK, que protege a los cardiomiocitos a través de la β -arrestina 1 (Kim et al., 2008). Por lo que no es recomendable utilizar un co-tratamiento con el antioxidante curcumina y carvedilol.

10 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demostró que el antioxidante curcumina protege a las células HepG2 de los efectos secundarios de estrés oxidativo causados por el tratamiento con α adrenobloqueadores (doxazosina y tamsulosina) y β adrenobloqueador carvedilol.

Doxazosina disminuye la viabilidad celular, dependiendo del tiempo de exposición y de la concentración, así mismo, altera la morfología normal de la línea celular HepG2 a una forma balonizada que coincide con un proceso de autofagia celular que finalizara en apoptosis. La curcumina disminuye los cambios morfológicos en la línea celular HepG2 y aumenta la viabilidad de las células tratadas con doxazosina posiblemente debido a un incremento en la expresión de los mecanismos antioxidantes generados por la vía de Nrf2.

Carvedilol y tamsulosina muestran un aumento en la proliferación celular dependiente de la dosis y modifican la morfología celular, sin embargo, la curcumina regula estos efectos secundarios.

Con base a los antecedentes del proyecto y a los resultados obtenidos, y en proyección a un modelo *in vivo* con fibrosis hepática inducida, se infiere que la curcumina puede generar las condiciones necesarias para que se dé el proceso de regeneración del parénquima hepático, una vez que se dio la regresión de la fibrosis dada por los tratamientos con los α adrenobloqueadores (doxazosina y tamsulosina) y β adrenobloqueador carvedilol.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., & Sung, B. (2013). Curcumin: An orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *British Journal of Pharmacology*, 169(8), 1672–1692. https://doi.org/10.1111/bph.12131
- Aggarwal, B. B., & Sung, B. (2009). Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(2), 85–94. https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.11.002
- Akiyama-Uchida, Y., Ashizawa, N., Ohtsuru, A., Seto, S., Tsukazaki, T., Kikuchi, H., & Yano, K. (2002). Norepinephrine enhances fibrosis mediated by TGF-β in cardiac fibroblasts. *Hypertension*, *40*(2), 148–154. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000025443.61926.12
- Anglin, I. E., Glassman, D. T., & Kyprianou, N. (2002). Induction of prostate apoptosis by α1-adrenoceptor antagonists: mechanistic significance of the quinazoline component.

 *Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 5(2), 88–95. https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500561
- Arechaga, I., & Fotiadis, D. (2007). Reconstitution of mitochondrial ATP synthase into lipid bilayers for structural analysis. *Journal of Structural Biology*, 160(3), 287–294. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.09.007
- Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killen, E., Green, C. J., Foresti, R., & Motterlini, R. (2003). Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochemical Journal*, 371(3), 887–895. https://doi.org/10.1042/bj20021619
- Batty, M., Pugh, R., Rathinam, I., Simmonds, J., Walker, E., Forbes, A., & Chess-Williams, R. (2016). The Role of α1-Adrenoceptor Antagonists in the Treatment of Prostate and Other Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1339. https://doi.org/10.3390/ijms17081339
- Boise, L. H., González-García, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., & Thompson, C. B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant

- regulator of apoptotic cell death. *Cell*, *74*(4), 597–608. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90508-N
- Brand, M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental Gerontology*, 45(7–8), 466–472. https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003
- Brenner, C., Galluzzi, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2013). Decoding cell death signals in liver inflammation. *Journal of Hepatology*, *59*(3), 583–594. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.033
- Budni, P., Pedrosa, R. C., Garlet, T. R., Dalmarco, E. M., Dalmarco, J. B., Lino, M. R. de O., & Filho, D. W. (2012). Carvedilol attenuates oxidative stress in chronic chagasic cardiomyopathy. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 98(3), 218–224. https://doi.org/10.1590/S0066-782X2012005000015
- Cai, W., Zhang, B., Duan, D., Wu, J., & Fang, J. (2012). Curcumin targeting the thioredoxin system elevates oxidative stress in HeLa cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 262(3), 341–348. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.05.012
- Cai, Z., & Yan, L.-J. (2013). Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, 1(1), 15–26. Retrieved from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23662248
- Chattopadhyay, D., Somaiah, A., Raghunathan, D., & Thirumurugan, K. (2014). Dichotomous Effect of Caffeine, Curcumin, and Naringenin on Genomic DNA of Normal and Diabetic Subjects. *Scientifica*, 2014(1), 1-7. https://doi.org/10.1155/2014/649261
- Collins, S. D., Yuen, G., Tu, T., Budzinska, M. A., Spring, K., Bryant, K., & Shackel, N. A. (2019). In Vitro Models of the Liver: Disease Modeling, Drug Discovery and Clinical Applications. *Hepatocellular Carcinoma*, 47–67. https://doi.org/10.15586/hepatocellularcarcinoma.2019.ch3
- Copple, I. M., Goldring, C. E., Kitteringham, N. R., & Park, B. K. (2008). The Nrf2-Keap1 defence pathway: Role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology*, *246*(1), 24–33. https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.10.029

- Cox, D., Leader, J., Milson, J., & Singleton, W. (1986). The antihypertensive effects of doxazosin: a clinical overview. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *21*(1), 83-90. https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1986.tb02858.x
- Crews, C. M. (2007). Analysis From Exotic Spice to Modern Drug? *Cell*, *130*(5), 765–768. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.024
- Del Río, L. A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2827–2837. https://doi.org/10.1093/jxb/erv099
- Desiniotis, A., & Kyprianou, N. (2011). Advances in the design and synthesis of prazosin derivatives over the last ten years. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *15*(12), 1405–1418. https://doi.org/10.1517/14728222.2011.641534
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1), 1245049. https://doi.org/10.1155/2016/1245049
- Ding, W. X., Ni, H. M., Gao, W., Hou, Y. F., Melan, M. A., Chen, X., & Yin, X. M. (2007).

 Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival.

 Journal of Biological Chemistry, 282(7), 4702–4710.

 https://doi.org/10.1074/jbc.M609267200
- Dinkova-Kostova, A. T., Massiah, M. A., Bozak, R. E., Hicks, R. J., & Talalay, P. (2001). Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(6), 3404–3409. https://doi.org/10.1073/pnas.051632198
- Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. In *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, 150(1), 77–93. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5
- Dunn, C. J., Matheson, A., & Faulds, D. M. (2002a). Tamsulosin: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the management of lower urinary tract symptoms. *Drugs and Aging*, 19(2), 135–161. https://doi.org/10.2165/00002512-

200219020-00004

- Dunn, C. J., Matheson, A., & Faulds, D. M. (2002b). Tamsulosin. *Drugs & Aging*, 19(2), 135–161. https://doi.org/10.2165/00002512-200219020-00004
- El-Demerdash, E., Abdel-Sattar, S. A., El-Bakly, W. M., & Mohamed, E. A. (2017). Antifibrotic Effects of Carvedilol and Impact of Liver Fibrosis on Carvedilol Pharmacokinetics in a Rat model. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 42(5), 767–779. https://doi.org/10.1007/s13318-016-0391-9
- Enomoto, A., Itoh, K., Nagayoshi, E., Haruta, J., Kimura, T., O'Connor, T., & Yamamoto, M. (2001). High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicological Sciences*, *59*(1), 169–177. https://doi.org/10.1093/toxsci/59.1.169
- Faa, G., Ledda-Columbano, G. M., Amhu, R., Congiu, T., Coni, P., Riva, A., & Columbano, A. (1994). An electron microscopic study of apoptosis induced by cycloheximide in rat liver. *Liver*, *14*(5), 270–278. https://doi.org/10.1111/j.1600-0676.1994.tb00087.x
- Fonarow, G. C. (2009). Role of carvedilol controlled-release in cardiovascular disease.

 Expert Review of Cardiovascular Therapy, 7(5), 483–498. https://doi.org/10.1586/erc.09.15
- Food and Drug Administration. (2005). Flomax ® (tamsulosin hydrochloride). 1–20.

 Retrieved from https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/020579s016lbl.pdf
- Forbes, A., Anoopkumar-Dukie, S., Chess-Williams, R., & McDermott, C. (2016). Relative cytotoxic potencies and cell death mechanisms of α 1 -adrenoceptor antagonists in prostate cancer cell lines. *The Prostate*, *76*(8), 757–766. https://doi.org/10.1002/pros.23167
- Freudenthal, B. D., Beard, W. A., Perera, L., Shock, D. D., Kim, T., Schlick, T., & Wilson, S. H. (2015). Uncovering the polymerase-induced cytotoxicity of an oxidized nucleotide. *Nature*, *517*(7536), 635–639. https://doi.org/10.1038/nature13886

- Frick, M., Halttunen, P., Himanen, P., Huttunen, M., Porsti, P., & Pitkajarvi, T., (1986). A long-term double-blind comparison of doxazosin and atenolol in patients with mild to moderate essential hypertension. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *21*(1), 55-62. https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1986.tb02854.x
- Friedman, S. L. (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2247–2250. https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2247
- Garrison, J. B., & Kyprianou, N. (2006). Doxazosin induces apoptosis of benign and malignant prostate cells via a death receptor-mediated pathway. *Cancer Research*, 66(1), 464–472. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2039
- Goel, A., & Aggarwal, B. B. (2010). Curcumin, the Golden Spice From Indian Saffron, Is a Chemosensitizer and Radiosensitizer for Tumors and Chemoprotector and Radioprotector for Normal Organs. *Nutrition and Cancer*, *62*(7), 919–930. https://doi.org/10.1080/01635581.2010.509835
- Gonzalez-Albadalejo, J., Sanz, D., Claramunt, R. M., Lavandera, J. L., Alkorta, I., & Elguero, J. (2015). Curcumin and curcuminoids: Chemistry, structural studies and biological properties. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, *81*(4),) 1697-4298. https://analesranf.com/wp-content/uploads/2015/81_04/8104_02.pdf
- González-Juanatey, J. R., Iglesias, M. J., Alcaide, C., Piñeiro, R., & Lago, F. (2003). Doxazosin Induces Apoptosis in Cardiomyocytes Cultured In Vitro by a Mechanism That Is Independent of α₁-Adrenergic Blockade. *Circulation*, *107*(1), 127–131. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000043803.20822.D1
- Gupta, R. K., Patel, A. K., Shah, N., Chaudhary, A. K., Jha, U. K., Yadav, U. C., & Pakuwal, U. (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *15*(11), 4405–4409. https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.11.4405
- Harris, A. M., Warner, B. W., Wilson, J. M., Becker, A., Rowland, R. G., Conner, W., & Kyprianou, N. (2007). Effect of alpha1-adrenoceptor antagonist exposure on prostate cancer incidence: an observational cohort study. *The Journal of Urology*, *178*(5), 2176–

- 2180. https://doi.org/10.1016/j.juro.2007.06.043
- Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2008). Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*(11), 1631–1652. https://doi.org/10.1007/s00018-008-7452-4
- Hines, K. M., Ross, D. H., Davidson, K. L., Bush, M. F., & Xu, L. (2017). Large-Scale Structural Characterization of Drug and Drug-Like Compounds by High-Throughput Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 89(17), 9023–9030. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01709
- Hori, M., Sasayama, S., Kitabatake, A., Toyo-Oka, T., Handa, S., Yokoyama, M., & Hosoda, S. (2004). Low-dose carvedilol improves left ventricular function and reduces cardiovascular hospitalization in Japanese patients with chronic heart failure: The Multicenter Carvedilol Heart Failure Dose Assessment (MUCHA) trial. *American Heart Journal*, 147(2), 324–330. https://doi.org/10.1016/j.ahj.2003.07.023
- Hsu, C. T. (1992). The role of the sympathetic nervous system in promoting liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride, using the essential hypertensive animal (SHR). Journal of the Autonomic Nervous System, 37(3), 163–173. https://doi.org/10.1016/0165-1838(92)90038-I
- Hsu, C. T. (1995). The role of the aut<mark>onomic nervous system in chemically-induced liver damage and repair using the essential hypertensive animal model (SHR). *Journal of the Autonomic Nervous System*, *51*(2), 135–142. https://doi.org/10.1016/0165-1838(94)00124-3</mark>
- Iwaki, M., Niwa, T., Bandoh, S., Itoh, M., Hirose, H., Kawase, A., & Komura, H. (2016). Application of substrate depletion assay to evaluation of CYP isoforms responsible for stereoselective metabolism of carvedilol. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 31(6), 425–432. https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2016.08.007
- Jain, A., Saxena, S., & Rani, V. (2018). Comprehensive Assessment of Curcumin as a Functional Food. In V. Rani & U. C. S. Yadav (Eds.), *Functional Food and Human Health* (pp. 107–118). https://doi.org/10.1007/978-981-13-1123-9_6

Jana, N. R., Dikshit, P., Goswami, A., & Nukina, N. (2004). Inhibition of Proteasomal Function by Curcumin Induces Apoptosis through Mitochondrial Pathway. *Journal of*

Biological Chemistry, 279(12), 11680–11685. https://doi.org/10.1074/jbc.M310369200

- Jiang, B., Xiao, W., Shi, Y., Liu, M., & Xiao, X. (2005). Heat shock pretreatment inhibited the release of Smac/DIABLO from mitochondria and apoptosis induced by hydrogen peroxide in cardiomyocytes and C2C12 myogenic cells. *Cell Stress & Chaperones*, 10(3), 252–262. https://doi.org/10.1379/csc-124r.1
- Jiang, Q. (2014). Natural forms of vitamin E: Metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 72, 76–90. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.035
- Kaplan, S. A. (2005). alpha-Blocker Therapy: Current Update. *Reviews in Urology*, *7 Suppl* 8(8), 34–42. Retrieved from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16985889
- Kappus, H., & Sies, H. (1981). Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*, 37(12), 1233–1241. https://doi.org/10.1007/BF01948335
- Kaspar, J. W., Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, *47*(1), 1304–1309. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.035
- Kaufman, R. J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: Coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes and Development*, *13*(14), 1898. https://doi.org/10.1101/gad.13.10.1211
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. (2007). Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 89–116. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046
- Kim, I. M., Tilley, D. G., Chen, J., Salazar, N. C., Whalen, E. J., Violin, J. D., & Rockman, H. A. (2008). β-Blockers alprenolol and carvedilol stimulate β-arrestin- mediated EGFR transactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*

- of America, 105(38), 14555-14560. https://doi.org/10.1073/pnas.0804745105
- Kirby, R. S., Andersen, M., Gratzke, P., Dahlstrand, C., & Høye, K. (2001). A combined analysis of double-blind trials of the efficacy and tolerability of doxazosin-gastrointestinal therapeutic system, doxazosin standard and placebo in patients with benign prostatic hyperplasia. *BJU International*, *87*(3), 192–200. https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.2001.02032.x
- Klimova, N., Fearnow, A., & Kristian, T. (2020). Role of NAD+—modulated mitochondrial free radical generation in mechanisms of acute brain injury. *Brain Sciences*, *10*(7), 1–13. https://doi.org/10.3390/brainsci10070449
- Kurutas, E. B. (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*, *15*(1), 71. https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5
- Kyprianou, N. (2003). Doxazosin and terazosin suppress prostate growth by inducing apoptosis: Clinical significance. *Journal of Urology*, 169(4), 1520–1525. https://doi.org/10.1097/01.ju.0000033280.29453.72
- Lin, S.-C., Chueh, S.-C., Hsiao, C.-J., Li, T.-K., Chen, T.-H., Liao, C.-H., & Guh, J.-H. (2007). Prazosin displays anticancer activity against human prostate cancers: targeting DNA and cell cycle. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *9*(10), 830–839. https://doi.org/10.1593/neo.07475
- Ling, L., Li, G., Wang, G., Meng, D., Li, Z., & Zhang, C. (2019). Carvedilol improves liver cirrhosis in rats by inhibiting hepatic stellate cell activation, proliferation, invasion and collagen synthesis. *Molecular Medicine Reports*, 20(2), 1605–1612. https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10401
- Luangmonkong, T., Suriguga, S., Mutsaers, H. A. M., Groothuis, G. M. M., Olinga, P., & Boersema, M. (2018). Targeting Oxidative Stress for the Treatment of Liver Fibrosis. In B. Nilius, P. de Tombe, T. Gudermann, R. Jahn, & R. Lill (Eds.), Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 175 (pp. 71–102). https://doi.org/10.1007/112_2018_10

- Macías-Pérez, J. R., Vázquez-López, B. J., Muñoz-Ortega, M. H., Aldaba-Muruato, L. R., Martínez-Hernández, S. L., Sánchez-Alemán, E., & Ventura-Juárez, J. (2019). Curcumin and α/β -Adrenergic Antagonists Cotreatment Reverse Liver Cirrhosis in Hamsters: Participation of Nrf-2 and NF- κ B. *Journal of Immunology Research*, 2019, 1–12. https://doi.org/10.1155/2019/3019794
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, *32*, 595–603. https://doi.org/10.1016/S0009-9120(99)00075-2
- Molavian, H., Madani Tonekaboni, A., Kohandel, M., & Sivaloganathan, S. (2015). The Synergetic Coupling among the Cellular Antioxidants Glutathione Peroxidase/Peroxiredoxin and Other Antioxidants and its Effect on the Concentration of H2O2. *Scientific Reports*, *5*(1), 13620. https://doi.org/10.1038/srep13620
- Morgan, T. (1994). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Carvedilol. *Clinical Pharmacokinetics*, 26(5), 335–346. https://doi.org/10.2165/00003088-199426050-00002
- Mormone E., George J., & Nieto N. (2012). Molecular Pathogenesis of Hepatic Fibrosis and. *Chem Biol Interact*, 193(3), 225–231. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.07.001.MOLECULAR
- Moustapha, A., Pérétout, P. A., Rainey, N. E., Sureau, F., Geze, M., Petit, J.-M., & Petit, P. X. (2015). Curcumin induces crosstalk between autophagy and apoptosis mediated by calcium release from the endoplasmic reticulum, lysosomal destabilization and mitochondrial events. *Cell Death Discovery*, 1(1), 15017. https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.17
- Nakamura, K., Kusano, K., Nakamura, Y., Kakishita, M., Ohta, K., Nagase, S., & Ohe, T. (2002). Carvedilol decreases elevated oxidative stress in human failing myocardium. *Circulation*, 105(24), 2867–2871. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000018605.14470.DD
- Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2011). INrf2 (Keap1) targets Bcl-2 degradation and controls cellular apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 18(1), 439–451.

- https://doi.org/10.1038/cdd.2010.114
- Niture, Suryakant K., Jain, A. K., & Jaiswal, A. K. (2009). Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-δ-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *Journal of Cell Science*, 122(24), 4452–4464. https://doi.org/10.1242/jcs.058537
- Niture, Suryakant K., & Jaiswal, A. K. (2012). Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 9873–9886. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.312694
- Niture, Suryakant K, Jain, A. K., Shelton, P. M., & Jaiswal, A. K. (2011). Src subfamily kinases regulate nuclear export and degradation of transcription factor Nrf2 to switch off Nrf2-mediated antioxidant activation of cytoprotective gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(33), 28821–28832. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.255042
- Oben, J. A., Roskams, T., Yang, S., Lin, H., Sinelli, N., Torbenson, M., & Diehl, A. M. (2004). Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut*, *53*(3), 438–445. https://doi.org/10.1136/gut.2003.026658
- Partin, J. V, Anglin, I. E., & Kyprianou, N. (2003). Quinazoline-based alpha 1-adrenoceptor antagonists induce prostate cancer cell apoptosis via TGF-beta signalling and I kappa B alpha induction. *British Journal of Cancer*, 88(10), 1615–1621. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600961
- Pfizer Canada Inc. (2017). *CARDURA* (doxazosin mesylate). Retrieved from https://www.pfizer.ca/sites/default/files/201710/CARDURA_PM_Eng_201486_4Apr20 17.pdf
- Pfizer Pharmaceuticals Group. (2009). Material Safety Data Sheet. Retrieved June 3, 2020, from Pfizer Inc website: https://pfe-pfizercom-d8-prod.s3.amazonaws.com/products/material_safety_data/PZ01040.pdf
- Pietrocola, F., Mariño, G., Lissa, D., Vacchelli, E., Malik, S. A., Niso-Santano, M., & Kroemer,

- G. (2012). Pro-autophagic polyphenols reduce the acetylation of cytoplasmic proteins. *Cell Cycle*, *11*(20), 3851–3860. https://doi.org/10.4161/cc.22027
- Pinti, M., Troiano, L., Nasi, M., Ferrares, R., Dobrucki, J., & Cossarizza, A. (2003). Hepatoma HepG2 cells as a model for in vitro studies on mitochondrial toxicity of antiviral drugs: Which correlation with the patient? *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 17(2), 166–171. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14518717
- Plemel, J. R., Caprariello, A. V, Keough, M. B., Henry, T. J., Tsutsui, S., Chu, T. H., & Stys, P. K. (2017). Unique spectral signatures of the nucleic acid dye acridine orange can distinguish cell death by apoptosis and necroptosis. *The Journal of Cell Biology*, 216(4), 1163–1181. https://doi.org/10.1083/jcb.201602028
- Prajapati, H., Sharma, R., & Patel, D. (2016). Carvedilol: a review of its use in the management of heart failure. *Drugs & Therapy Perspectives*, 33(1), 147–152. https://doi.org/10.1007/s40267-016-0370-x
- Radi, R. (2013). Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of Functional Effects. *Accounts of Chemical Research*, *46*(2), 550–559. https://doi.org/10.1021/ar300234c
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219–236. Retrieved from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18044138
- Rainey, N., Motte, L., Aggarwal, B. B., & Petit, P. X. (2015). Curcumin hormesis mediates a cross-talk between autophagy and cell death. *Cell Death and Disease*, *6*(12), e2003. https://doi.org/10.1038/cddis.2015.343
- Ruffolo, R. R., & Feuerstein, G. Z. (1997). *Pharmacology of Carvedilol: Rationale for Use in Hypertension*, *Coronary Artery Disease*, and *Congestive Heart Failure*. 11(1), 247–256. https://doi.org/10.1023/A:1007735729121.
- Sabarwal, A., Kumar, K., Shyanti, R., & Singh, R. P. (2018). Curcumin in Cancer Prevention. In V. Rani & U. C. S. Yadav (Eds.), *Functional Food and Human Health* (pp. 329–374).

- https://doi.org/10.1007/978-981-13-1123-9_16
- Scott, P. J. W., Hosie, J., & Scott, M. G. B. (1988). A double-blind and cross-over comparison of once daily doxazosin and placebo with steady-state pharmacokinetics in elderly hypertensive patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*, *34*(2), 119–123. https://doi.org/10.1007/BF00614546
- Serna-Salas, S. A., Navarro-González, Y. D., Martínez-Hernández, S. L., Barba-Gallardo,
 L. F., Sánchez-Alemán, E., Aldaba-Muruato, L. R., & Muñoz-Ortega, M. H. (2018).
 Doxazosin and Carvedilol Treatment Improves Hepatic Regeneration in a Hamster
 Model of Cirrhosis. BioMed Research International, 2018.
 https://doi.org/10.1155/2018/4706976
- Sheng, Y., Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Maroney, M. J., Miller, A.-F., Teixeira, M., & Valentine, J. S. (2014). Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chemical Reviews*, 114(7), 3854–3918. https://doi.org/10.1021/cr4005296
- Sies, H., & Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 311(1152), 617–631. https://doi.org/10.1098/rstb.1985.0168
- Sies, H, Berndt, C., & Jones, D. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 715–748. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037
- Sies, Helmut. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, *4*(1), 180–183. https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002
- Singh, A., Misra, V., Thimmulappa, R. K., Lee, H., Ames, S., Hoque, M. O., & Biswal, S. (2006). Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Medicine*, 3(10), 1865–1876. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030420
- Su, M., Yu, T., Zhang, H., Wu, Y., Wang, X., & Li, G. (2016). The Antiapoptosis Effect of Glycyrrhizate on HepG2 Cells Induced by Hydrogen Peroxide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 6849758. https://doi.org/10.1155/2016/6849758
- Sun, J., Kong, D., Zhen, Y., Li, Q., Zhang, W., Zhang, J., & Ren, L. (2013). Stereoselective binding of doxazosin enantiomers to plasma proteins from rats, dogs and humans in

- vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(12), 1568–1574. https://doi.org/10.1038/aps.2013.120
- Tahmatzopoulos, A., Sheng, S., & Kyprianou, N. (2005). Maspin sensitizes prostate cancer cells to doxazosin-induced apoptosis. *Oncogene*, *24*(34), 5375–5383. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208684
- Takehara, T., Tatsumi, T., Suzuki, T., Rucker, E. B., Hennighausen, L., Jinushi, M., & Hayashi, N. (2004). Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology*, *127*(4), 1189–1197. https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.07.019
- Torun, A. N., Kulaksizoglu, S., Kulaksizoglu, M., Pamuk, B. O., Isbilen, E., & Tutuncu, N. B. (2009). Serum total antioxidant status and lipid peroxidation marker malondialdehyde levels in overt and subclinical hypothyroidism. *Clinical Endocrinology*, *70*(3), 469–474. https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03348.x
- Turrens, J. F., & Boveris, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal*, 191(2), 421–427. https://doi.org/10.1042/bj1910421
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Vlahovic-Palcevski, V., Milic, S., Hauser, G., Protic, A., Župan, Ž., Reljic, M., & Štimac, D. (2010). Toxic epidermal necrolysis associated with carvedilol treatment. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 48(8), 549–551. https://doi.org/10.5414/CPP48549
- Wang, J. X., Gao, J., Ding, S. L., Wang, K., Jiao, J. Q., Wang, Y., & Li, P. F. (2015). Oxidative Modification of miR-184 Enables It to Target Bcl-xL and Bcl-w. *Molecular Cell*, *59*(1), 50–61. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.003
- Wehr, N. B., & Levine, R. L. (2013). Quantification of protein carbonylation. Methods in

- SIS TESIS TESIS TESIS
 - Molecular Biology, 965(1), 265-281. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_18
 - Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., & Wilson, M. (2018). DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(1), 1074–1082. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037
 - Wisler, J. W., DeWire, S. M., Whalen, E. J., Violin, J. D., Drake, M. T., Ahn, S., & Lefkowitz, R. J. (2007). A unique mechanism of β-blocker action: Carvedilol stimulates β-arrestin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(42), 16657–16662. https://doi.org/10.1073/pnas.0707936104
 - Yoon, J.-Y., Baek, C.-W., Kim, E.-J., Park, B.-S., Yu, S.-B., Yoon, J.-U., & Kim, E.-N. (2017). Propofol protects against oxidative-stress-induced COS-7 cell apoptosis by inducing autophagy. *Journal of Dental Anesthesia and Pain Medicine*, 17(1), 37–46. https://doi.org/10.17245/jdapm.2017.17.1.37
 - Young, R. A., & Brogden, R. N. (1988). Doxazosin: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy in Mild or Moderate Hypertension. *Drugs*, *35*(5), 525–541. https://doi.org/10.2165/00003495-198835050-00003
 - Yovchev, M. I., Xue, Y., Shafritz, D. A., Locker, J., & Oertel, M. (2014). Repopulation of the fibrotic/cirrhotic rat liver by transplanted hepatic stem/progenitor cells and mature hepatocytes. *Hepatology*, *59*(1), 284–295. https://doi.org/10.1002/hep.26615

APÉNDICE

Solución de α/β adrenobloqueadores

Tabla 8. Solución madre de doxazosina, tamsulosina y carvedilol

| | Doxazosina | Tamsulosina | Carvedilol |
|----------------|--------------|--------------|--------------|
| Concentración | 0.010 M | 0.010 M | 0.010 M |
| Volumen | 182 µl | 220 µl | 230 µl |
| Gramos | 0.001 gr | 0.001 gr | 0.001 gr |
| Peso Molecular | 547.58 g/mol | 444.97 g/mol | 406.47 g/mol |

Cálculos:

Sol. madre Doxazosina =
$$\frac{\text{Gramos/}_{\text{Peso Molecular}}}{\text{Litros solución}} = \frac{\frac{0.001 \text{ gr}}{547.58 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}}{0.000182 \text{ L}} = \mathbf{0.010 \text{ mM}}$$

Sol. madre Tamsulosina =
$$\frac{\text{Gramos/}_{\text{Peso Molecular}}}{\text{Litros solución}} = \frac{0.001 \text{ gr}/_{444.97 \text{ g/mol}}}{0.000220 \text{ L}} = \mathbf{0.010 \text{ mM}}$$

Sol. madre Carvedilol =
$$\frac{\text{Gramos/}_{\text{Peso Molecular}}}{\text{Litros solución}} = \frac{\frac{0.001 \text{ gr}}{406.47 \text{ g/mol}}}{0.000230 \text{ L}} = \mathbf{0.010 \text{ mM}}$$

Doxazosina, tamsulosina y carvedilol 1 milimolar (0.001 M)

Volumen =
$$\frac{0.001 \text{ molar (60 microlitros)}}{0.01 \text{ molar}} = 6 \text{ microlitros solución madre medicamento}$$

60 microlitros — 6 microlitros medicamento = **54 microlitros medio suplementado**

❖ Doxazosina, tamsulosina y carvedilol 25 micromolar (0.000025 M)

$$Volumen = \frac{0.000025 \text{ M (1 ml)}}{0.001 \text{ molar}} = \textbf{25 microlitros solución madre medicamento}$$

1000 microlitros — 25 microlitros medicamento = **975 microlitros medio suplementado**

Doxazosina, tamsulosina y carvedilol 15 micromolar (0.000015 M)

$$Volumen = \frac{0.000015 \text{ M (1 ml)}}{0.001 \text{ molar}} = \textbf{15 microlitros solución madre medicamento}$$

1000 microlitros — 15 microlitros medicamento = **985 microlitros medio suplementado**

❖ Doxazosina, tamsulosina y carvedilol 10 micromolar (0.000010 M)

$$Volumen = \frac{0.000010 \text{ M (1 ml)}}{0.001 \text{ molar}} = \textbf{10 microlitros soluci\'on madre medicamento}$$

1000 microlitros — 10 microlitros medicamento = **990 microlitros medio suplementado**

❖ Doxazosina, tamsulosina y carvedilol 1 micromolar (0.000001 M)

Volumen =
$$\frac{0.000001 \text{ M (1 ml)}}{0.001 \text{ molar}} = 1 \text{ microlitros solución madre medicamento}$$

1000 microlitros — 1 microlitros medicamento = **999 microlitros medio suplementado**

❖ Doxazosina, tamsulosina y carvedilol 0.5 micromolar (0.0000005 M)

1000 microlitros — 500 microlitros medicamento = **500 microlitros medio suplementado**

Doxazosina, tamsulosina y carvedilol 0.3 micromolar (0.0000003 M)

$$Volumen = \frac{0.0000003 \text{ M (1 ml)}}{0.000001 \text{ molar}} = 300 \text{ microlitros solución madre medicamento}$$

1000 microlitros - 300 microlitros medicamento = 700 microlitros medio suplementado

❖ Doxazosina, tamsulosina y carvedilol 0.1 micromolar (0.0000001 M)

$$Volumen = \frac{0.0000001 \text{ M (1 ml)}}{0.000001 \text{ molar}} = 100 \text{ microlitros solución madre medicamento}$$

1000 microlitros — 100 microlitros medicamento = **900 microlitros medio suplementado**

ESIS TESIS TESIS TESIS

Tabla 9. Concentración y pureza de ARN de células HepG2 con α/β adrenobloqueadores.

| | Doxazosina | | | | | | |
|---------------------|-----------------------------------|--------|--------|-------|-------|--|--|
| | Control 0.1 μM 0.5 μM 10 μM 25 μM | | | | | | |
| Concentración ng/µl | 430.4 | 837.6 | 450.4 | 78.4 | 625.6 | | |
| 260/230 | 2.03 | 2.029 | 2.004 | 1.75 | 1.921 | | |
| 260/280 | 1.928 | 1.939 | 1.935 | 1.922 | 1.96 | | |
| | Control | 0.1 μΜ | 0.5 µM | 10 μM | 25 µM | | |
| Concentración ng/µl | 480.8 | 496.8 | 428.8 | 897.6 | 437.6 | | |
| 260/230 | 2.162 | 2.119 | 2.119 | 2.086 | 2.188 | | |
| 260/280 | 1.97 | 1.978 | 1.978 | 1.965 | 1.968 | | |

| | Carvedilol | | | | | | |
|---------------------|---------------------|--------|--------|-------|--------|--|--|
| | Control | 0.1 µM | 0.5 μΜ | 10 μM | 25 µM | | |
| Concentración ng/µl | 508.8 | 1216 | 442.4 | 400.8 | 541.6 | | |
| 260/230 | 2.149 | 2.165 | 2.079 | 2.141 | 2.149 | | |
| 260/280 | 1.963 | 1.959 | 1.947 | 1.927 | 1.945 | | |
| | Control | 0.1 µM | 0.5 μΜ | 10 µM | 25 µM | | |
| Concentración ng/µl | 2276.8 | 1588.8 | 2011.2 | 556.8 | 1653.6 | | |
| 260/230 | 1 <mark>.844</mark> | 2.106 | 1.981 | 2.161 | 2.122 | | |
| 260/280 | 1.659 | 1.906 | 1.819 | 1.939 | 1.895 | | |

| | | Tamsulosina | | | | | |
|---------------------|---------|-------------|--------|-------|-------|--|--|
| | Control | 0.1 µM | 0.5 µM | 10 μM | 25 µM | | |
| Concentración ng/µl | 547.2 | 853.6 | 805.6 | 820 | 511.2 | | |
| 260/230 | 2.144 | 2.151 | 1.925 | 2.026 | 1.395 | | |
| 260/280 | 1.966 | 1.976 | 1.971 | 1.967 | 1.925 | | |
| | Control | 0.1 µM | 0.5 µM | 10 μM | 25 μM | | |
| Concentración ng/µl | 856.8 | 1198.4 | 344 | 886.4 | 733.6 | | |
| 260/230 | 2.092 | 2.027 | 2.205 | 2.098 | 2.178 | | |
| 260/280 | 1.991 | 2.005 | 1.991 | 2.007 | 2.002 | | |

Tabla 10. Concentración y pureza de ARN de células HepG2 con α/β adrenobloqueadores en cotratamiento con curcumina.

| | Doxazosina + CURCUMINA | | | | | |
|---------------------|------------------------|--------|--------|-------|-------|--|
| | Control | 0.1 µM | 0.5 μM | 10 μM | 25 μM | |
| Concentración ng/µl | 552 | 924.8 | 881.6 | 626.4 | 1200 | |
| 260/230 | 2.123 | 2.137 | 1.968 | 2.055 | 1.689 | |
| 260/280 | 1.922 | 1.917 | 1.917 | 1.933 | 1.913 | |
| | Control | 0.1 µM | 0.5 μΜ | 10 μM | 25 µM | |
| Concentración ng/µl | 465.6 | 401.6 | 339.2 | 483.2 | 336.8 | |
| 260/230 | 2.064 | 2.1 | 2.109 | 2.134 | 2.137 | |
| 260/280 | 1.902 | 1.88 | 1.91 | 1.924 | 1.914 | |

| | Carvedilol + CURCUMINA | | | | | | |
|---------------------|------------------------|----------------------|--------|-------|-------|--|--|
| | Control | 0.1 µM | 0.5 μM | 10 μM | 25 μM | | |
| Concentración ng/µl | 400.8 | 175.2 | 291.2 | 249.6 | 291.2 | | |
| 260/230 | 2.352 | 1 <mark>.91</mark> 1 | 2.111 | 2.889 | 2.141 | | |
| 260/280 | 1.965 | 1.921 | 2.056 | 2.108 | 1.916 | | |
| | Control | 0.1 µM | 0.5 μM | 10 μM | 25 µM | | |
| Concentración ng/µl | 697.6 | 804 | 1162.4 | 737.6 | 451.2 | | |
| 260/230 | 2.052 | 2.171 | 2.185 | 2.18 | 2.136 | | |
| 260/280 | 1.955 | 1.963 | 1.958 | 1.949 | 1.952 | | |

| | Tamsulosina + CURCUMINA | | | | | | |
|---------------------|-------------------------|--------|--------|--------|-------|--|--|
| | Control | 0.1 μM | 0.5 µM | 10 µm | 25 µM | | |
| Concentración ng/µl | 852 | 1917.6 | 2194.4 | 973.6 | 637.6 | | |
| 260/230 | 2.105 | 2.035 | 1.842 | 2.15 | 2.103 | | |
| 260/280 | 1.958 | 1.889 | 1.72 | 1.95 | 1.963 | | |
| | Control | 0.1 µM | 0.5 µM | 10 μM | 25 μM | | |
| Concentración ng/µl | 588.8 | 998.4 | 1373.6 | 1073.6 | 751.2 | | |
| 260/230 | 2.085 | 2.155 | 2.162 | 2.14 | 2.046 | | |
| 260/280 | 1.927 | 1.923 | 1.91 | 1.917 | 1.882 | | |