

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**PAPEL DE LA TAMSULOSINA EN RECUPERACIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO
SUBCRÓNICO INDUCIDO CON TIOACETAMIDA EN UN MODELO DE RATA
WISTAR.**

PRESENTA:

Samson Soleil

PARA OPTAR EL GRADO DE
Maestría en Ciencia en Área de Toxicología

COMITÉ TUTORAL

Dr. Javier Ventura Juárez

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega

Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino

Aguascalientes, Ags 05 de enero del 2023

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CCBASICAS 001/2023

SAMSON SOLEIL
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL Y TOXICOLOGÍA
PRESENTE.

Estimado Alumno Soleil:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o trabajo práctico titulado: **"PAPEL DE LA TAMBUSULOSINA EN RECUPERACION DEL DAÑO HEPÁTICO SUBCRÓNICO INDUCIDO CON TIOACETAMIDA EN UN MODELO DE RATA WISTAR"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags., 3 de enero del 2023

PROF. DECANO
M. en C. JORGE MARTIN ALFEREZ CHAVEZ

c.c.p.- Archivo Centro de Ciencias Básicas



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

CARTA DE VOTO APROBATORIO COMITÉ TUTORAL

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **SAMSON SOLEIL** con ID **194134** quien realizó *la tesis* titulado: **PAPEL DE LA TAMSULOSINA EN RECUPERACIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO SUBCRÓNICO INDUCIDO CON TIOACETAMIDA EN UN MODELO DE RATA WISTAR**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *el* pueda proceder a imprimir *la* así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 16 de *diciembre* de 2022.

Dr. Javier Ventura Juárez
Tutor de tesis/trabajo práctico

Dr. Martin Humberto Muñoz Ortega
Co-Tutor de tesis/trabajo práctico

Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino
Asesor de tesis/trabajo práctico



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-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 04/01/2023

NOMBRE: Samson Soleil ID 194134
PROGRAMA: Maestría en Ciencia en Area Toxicología LGAC (del posgrado): Toxicología
TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo práctico
TÍTULO: PAPEL DE LA TAMSULOSINA EN RECUPERACIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO SUBCRÓNICO INDUCIDO CON TIOACETAMIDA EN UN MODELO DE RATA WISTAR.
IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): En salud, se probó una nueva actividad farmacológica para la Tamsulosina

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- X El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
X La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
X Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
X Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
X Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
X El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
X Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
X Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- X Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
X Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
X Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
X Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
X Coincide con el título y objetivo registrado
X Tiene congruencia con cuerpos académicos
X Tiene el CVU del Conacyt actualizado
NA Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- Aceptación o Publicación de los artículos 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 trabajo 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

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Si X
No

FIRMAS

Elaboró: Dra. Elsa Marcela Ramírez López
NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: Dra. Raquel Guerrero Alba
Revisó: Dr. Juan J. Balcázar Balcázar
Autorizó: M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

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

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
Revisado por: D. Control Escolar/ D. Gestión de Calidad.
Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SEE-FO-15
Actualización: 01
Emisión: 20/06/19



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al CVU 1092424, parte del programa de la maestría en ciencia en área Toxicología del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Agradecimiento

Al Gran Arquitecto del Universo por su luz y amor incondicional que me ha brindado durante este viaje.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo de financiamiento durante los dos años.

A Dr. Javier Ventura Juárez por su conocimiento, sus críticas constructivas y su orientación durante todo el periodo de la maestría.

A Dr. Martin Humberto Muñoz Ortega por haber dado la oportunidad de participar a este proyecto, por la confianza y el apoyo brindado y por estar siempre al pendiente para poder concluir el proyecto.

A Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino por escucharme y compartirme su conocimiento, consejo y experiencia que ha ayuda a concluir este proyecto.

A Dr. Emmanuel Cabaña García por compartirme el gusto a la ciencia de la investigación y animarme a entrar a la maestría.

A Lic. Gustavo Gutiérrez Serna por animarme iniciar este viaje.

A Dra. Argelia Calvillo Robledo por su apoyo y su metodología de trabajar.

A AQB. Emmanuel Poblano Sánchez por su apoyo en analizar las muestras de suero.

Al todo el equipo del laboratorio Patología Molecular del departamento de Química de UAA QFB. Roberto Buendía, M.C. Mariana Medina, AQB. Cynthia Esquivel, Dr. David Ibarra, Fernanda Velazco Pachicano y Diana por contribuir a este proyecto.

Al equipo del laboratorio de Morfología AQB. Mariana Pérez Villalobos, Dr. Manuel Ávila Blanco, Dra. Sandra Luz Martínez Hernández, QFB. Silvia Valeria Padilla por el apoyo brindado.

Al equipo del laboratorio de Neurofarmacología y fisiología de la UAA

A los coordinadores y maestros de la 14^o generación de la maestría por sus conocimiento y apoyo durante este periodo.

Dedicatoria

A mi familia:

Mis hijos Samantha Sarahi, Scarlette Isabella y Steve Matthieu Soleil Soto por ser mi motivación y parte de mi desarrollo tanto personal como profesional.

Mis padres Marguerite Pierre y Estime Soleil por su educación, amor y motivación durante toda la vida.

Mis ocho hermanos Simone, Christine, Enos, Yolette, Elie, Nadege, Renel y Chedeline Soleil y todos mis sobrinos por su motivación y apoyo brindado.

Sarahi Soto por su apoyo.

A la familia Trisquel 10 por la luz y conocimiento que me han brindado para a ser mejor persona.

A todo el equipo del laboratorio de Patología Molecular de la UAA

A todos mis amigos especialmente Juan Fernando Gutiérrez, Gustavo Gutiérrez y Emmanuel Regalado.

El verdadero investigador es el que es insiste, resiste, persiste y nunca desiste a pesar de las grandes adversidades.

“El que ha llegado tan lejos que ya no se confunde, ha dejado también de trabajar”.

Max Planck (1858-1947).

Contenido

Acrónimo 6

Resumen..... 9

Abstract 11

Capítulo 1 :..... 12

INTRODUCCIÓN..... 12

 INTRODUCCIÓN..... 13

MARCO TEÓRICO 16

 Hígado..... 16

 Sistema simpático y parasimpático del hígado..... 21

 Daños hepáticos..... 23

 Agentes hepatotóxicos..... 30

 Tratamiento actual..... 31

 Tamsulosina 32

Capítulo 2 :..... 34

JUSTIFICACIÓN 34

 Justificación..... 35

Capítulo 3 :..... 36

HIPÓTESIS 36

 Hipótesis 37

Capítulo 4 38

OBJETIVOS: 38

 Objetivos..... 39

 General 39

 Particulares..... 39

Capítulo 5 40

MATERIALES Y METODOLOGÍA..... 40

 Materiales y metodología 41

 Modelo experimental..... 41

Sacrificio de los animales..... 42

 Análisis de marcadores de daño hepático..... 43

 Análisis histológicos 43

Análisis de marcadores moleculares.....	44
Medición de la actividad locomotora	45
Medición de la hipersensibilidad (test respuesta al dolor)	46
Análisis estadístico.....	46
Capítulo 6	47
RESULTADOS	47
EVALUACIÓN DEL DAÑO CAUSA POR LA TAA	48
Tras la inducción con la TAA durante las 5 semanas, Se evaluó diferentes parámetros desde la observación, el suero y el tejido extraído. Se comparó los parámetros con el animal intacto, es decir el grupo de animal que no fue sometido a ningún tratamiento	48
Evaluación del peso.....	48
Descripción macroscópica y la variación de peso del hígado del grupo dañado contra el grupo intacto.	49
Evaluación del peso de los hígados.....	49
Descripción microscópica de la arquitectura hepática en el grupo dañado e intacto.	50
Cuantificación de las células activadas.	51
Evaluación de las fibras de colágenos por Densitometría.....	52
Evaluación de daño hepática mediante el perfil hepática y la medición de glucosa.	54
Evaluación de marcadores moleculares.....	55
Evaluación del daño sobre la actividad locomotora por la TAA.....	57
Evaluación de la hipersensibilidad por la inducción el daño hepático	58
EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TAMSULOSINA SOBRE LA REGRESIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO.	59
Evaluación del peso.....	60
Observación macroscópica y el peso del hígado tras las 2 semanas de tratamiento	61
Evaluación de la variación del peso	62
Evaluación microscópica de la arquitectura hepática de las ratas tratadas.	63
Cuantificación de las fibras de colágenos por densitometría en los grupos tratados	67
Evaluación de los marcadores de daño hepático en lo grupo tratados.....	68
Evaluación de la glucosa.....	70
Evaluación de los marcadores moleculares.....	70

Evaluación de la recuperación de la actividad locomotora por los tratamientos con la tamsulosina y el vehículo tras el daño hepático causado por la TAA.....	73
Actividad locomotora durante la fase de recuperación.	76
Evaluación de recuperación de la hipersensibilidad tras las dos semanas de tratamiento.....	76
EVALUACIÓN DEL POSIBLE DAÑO CAUSADO POR LA TAMSULOSINA	78
Observación macroscópica del hígado.....	78
Evaluación microscópica de la arquitectura hepática mediante H/E	79
Evaluación de marcadores de daño hepático.....	80
Evaluación de la actividad locomotora.....	81
Evaluación de la actividad locomotora.....	81
Evaluación de la hipersensibilidad por la tamsulosina	82
Capítulo 7	85
Discusión	85
Discusión	86
Capítulo 8	94
Conclusión	94
Conclusión.....	95
Capítulo 9	96
Bibliografía	96
Bibliografía	97
Capítulo 10	112
Apéndice	112
Apéndice.....	113

Índice de figuras

<i>Figura 1.1 Posición del hígado.</i>	16
<i>Figura 1.2. Observación de la circulación hepática.</i>	17
<i>Figura 1.3. anatomía microscópica del hígado,</i>	18
<i>Figura 1.4. Las células hepáticas</i>	20
<i>Figura 1.5. Observación de las fibras nerviosas simpáticas y parasimpáticas intrínsecas a nivel hepático</i>	23
<i>Figura 1.6. Se observa el proceso de incremento de amonio en la sangre</i>	25
<i>Figura 1.7. En esta ilustración se observa la cinética de la población de células de Kupffer en el daño hepático por CCl4</i>	27
<i>Figura 1.8. Se observa la comparación de las células hepática en estado normal.</i>	28
<i>Figura 1.9: El mecanismo de daño causado por la célula hepática durante el proceso de fibrosis hepáticas</i>	30
<i>Figura 1.10. Observación de la estructura de la tamsulosina</i>	32
<i>Figura 6: Distribución de los 7 grupos experimentales que fueron inducidos y tratados.</i>	42
<i>Figura 6.1.2: La vista macroscópica del hígado dañado y el hígado intacto</i>	49
<i>Figura 6.1.3: Evaluación del daño hepática mediante análisis microscópico</i>	51
<i>Figura 6.1. 6.a. Observación de la fotografía</i>	53
<i>Figura 6.2.1. Observación macroscópica de los hígados extraídos por grupos.</i>	62
<i>Figura 6.2.2. evaluación microscópica de la arquitectura hepática mediante diferentes tinciones</i>	65
<i>Figura 6.2.3. Fotografía panorámica de las muestras procesadas con tinción rojo Sirio y tomada en microscopio con luz polarizada y analizada en fiji.</i>	67
<i>Figura 6.3.1. Vista macroscópica de los hígados sanos que fueron administrados las dos dosis de la tamsulosina.</i>	79
<i>Figura 6.3.2. observación microscópica de la arquitectura hepática.</i>	80

Índice de gráficas

<i>Gráfica 6.1.1 Observación de la variación del peso en el grupos intacto y dañado por inducción con TAA al inicio y al final de las 5 semana.</i>	48
<i>Grafica 6.1.3: El promedio de los pesos de hígado dañado e intacto grupos</i>	50

Gráfica 6.1.5.: se observó la inducción con la TAA en los grupos genera activación de la citocina NF-kB 52

Gráfica 6.1.6b. Se observó que hubo diferencias significativas en el porcentaje de las fibras tanto tipo I como tipo III en el grupo inducido con la TAA 53

Gráfica 6.1.7. Evaluación de diferentes parámetros de daños 54

Figura 6.1.8. observación de las expresiones de marcadores moleculares..... 56

Gráfica 6.1.9. Evaluación de la actividad locomotora por el daño hepático. 58

Gráfica 6.1.10. Evaluación del umbral al dolor 59

Gráfica 6.2.1. Variación de los grupos de animales experimentales durante 3 periodo del experimento 60

Gráfica 6.2.2. Evaluación del peso por grupo 62

Gráfica 6.2.3. cuantificación de las células activadas por campo..... 66

Gráfica 6.2.4. cuantificación de las fibras por densitometría 68

Gráfica 6.2.5. evaluación de los marcadores de daño hepático mediante el perfil hepático en suero..... 69

Gráfica 6.2.6. Evaluación de la recuperación de la glucosa en sangre tras las dos semanas de tratamiento 70

Gráfica 6.2.7.1 Evaluación de los marcadores proinflamatorios. 71

Gráfica 6.2.7.2. Evaluación de los marcadores antiinflamatoria..... 71

Gráfica 6.2.7.3. Evaluación de los marcadores fibrogénicos 72

Gráfica 6.2.7.4. Evaluación del EGF marcador de proliferación de células epiteliales..... 72

Gráfica 6.2.7.5. Evaluación del marcador molecular AFP 73

Gráfica 6.2.8. Evaluación de los tres periodos durante el experimento..... 75

Gráfica 6.2.8.1. Separación de las dos semanas de recuperación de la fase d exposición a la TAA 76

Gráfica 6.2.9.1. Evaluación de la recuperación del umbral tras las 2 semanas de la aplicación de la tamsulosina a 11 µg/kg..... 77

Gráfica 6.2.9.2. Evaluación de la recuperación del umbral tras las 2 semanas de la aplicación de la tamsulosina a 93 µg/kg..... 78

Gráfica 6.3.1. Evaluación de marcadores de daño hepático..... 81

Gráfica 6.3.2. Evaluación del posible daño en la actividad locomotora por la tamsulosina..... 82

Gráfica 6.3.3.1. Evaluación de la tamsulosina a dosis 11 µg/kg sobre el umbral al dolor..... 83

Gráfica 6.3.3.2 Evaluación de la tamsulosina a dosis 93 µg/kg sobre el umbral al dolor..... 84



Acrónimo

AFP: Alfafetoproteína

ALP: fosfatasa alcalina

ALT: alanina aminotransferasa

AST: Aspartato aminotransferasa

CCK: Colecistocinina

CEH: Células estelar hepática

CHC: Hepatocarcinoma celular

CYP: citocromo P450

DAMP: patrones moleculares asociados al daño

DX: Doxasosina

ECH: enfermedad hepática crónica

EGF: Factor de Crecimiento epidérmico

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico

EHA: Esteatohepatitis alcohólica

EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica

el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF)

HE: Encefalopatía hepática

IFN- γ : interferón gamma

IL: Interleucina

MEC: matriz extracelular

MMP: Metaloproteinasas

NE: Norepinefrina

NF- κ B: factor de transcripción nuclear kappa b

OMS: Organización mundial de la salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas

RA: Receptores adrenérgico

ROS: Reactivas de oxígeno

TAA: Tioacetamida

Tamsu: Tamsulosina

TGF β : Factor de crecimiento transformante β

TNF: Factor de necrosis tumoral

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de hepatitis C

α -SMA: Actina músculo liso

µg: Microgramo



Resumen

Introducción: El hígado es uno de los órganos más importantes en el cuerpo humano por su multifuncionalidad. Por tal motivo, cualquier daño que afecte a este órgano puede promover un desequilibrio sistémico, comenzando desde hígado graso, formación de fibrosis hepática, hasta encefalopatía por el aumento de amonio. En la actualidad, las enfermedades hepáticas han mostrado incrementos a nivel mundial, siendo los principales causantes el abuso de alcohol y la esteatohepatitis no alcohólica por diabetes, obesidad entre otros. La reversión del daño y la recuperación de la funcionalidad del tejido hepático sigue siendo un reto para el campo de la investigación de la salud, teniendo como única alternativa el trasplante de hígado. Sin embargo, el número de donantes es escaso lo que disminuye significativamente la esperanza de vida de los pacientes. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la tamsulosina en posible recuperación de la función hepática en un modelo de daño hepático en ratas Wistar. **Material y Métodos:** La inducción del daño hepático se realizó mediante la administración por vía intraperitoneal de un esquema de dosis creciente de tioacetamida (200-300 mg/kg) durante 5 semanas. Tras el daño, dos grupos fueron tratados a dosis de 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y un grupo fue tratado con el vehículo durante dos semanas. El daño fue evaluado en un grupo tras las 5 semanas de inducción y comparado con un grupo intacto. Para determinar el daño y la regeneración del hígado, se realizaron pruebas bioquímicas: el perfil hepático y glucosa; marcadores inflamatorios, profibrogenicos, de proliferación y cancerígenas. Se realizaron tinciones histológicas con H/E y Rojo sirio, e inmunohistoquímica evaluando marcadores inflamatorios. Se evaluó La actividad locomotora, la hipersensibilidad al dolor, el posible daño causado por la tamsulosina y la actividad antioxidante **Resultados:** en diferentes parámetros las ratas que fueron tratadas con tamsulosina mostraron una mejora significativa en la recuperación del peso y la actividad locomotora, en referencia con el intacto y vehículo. **Conclusión:** El uso de tamsulosina a dosis a 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ puede ser considerada como una opción terapéutica para la recuperación del daño

hepático, sin embargo, se requieren realizar otros ensayos y pruebas que avalen su eficiencia en pacientes.



Abstract

Introduction: The liver is one of the most important organs in human due to its multifunctionality. For this reason, any damage affecting this organ can promote a systemic imbalance, starting from the formation of hepatic fibrosis to encephalopathy due to the increase of ammonium. At present, liver diseases have shown an increase worldwide, the main causes being alcohol abuse and non-alcoholic steatohepatitis due to diabetes, obesity, among others. Reversing the damage and recovering the functionality of liver tissue remains a challenge for the field of health research, having liver transplantation as the only alternative. However, the number of donors is scarce which significantly decreases the life expectancy of patients.

Objective: To evaluate the effect of tamsulosin on possible recovery of liver function in a model of liver damage in Wistar rats. **Material and Methods:** Induction of liver damage was performed by intraperitoneal administration of an increasing dose schedule of thioacetamide (200-300 mg/kg) for 5 weeks. After damage, two groups were treated at doses of 11 µg/kg and 93 µg/kg, and the vehicle was treated for two weeks. Damage was assessed in one group after 5 weeks of induction and compared to an intact group. To determine liver damage and regeneration, biochemical tests were performed: liver profile and glucose; inflammatory, profibrogenic, proliferative and carcinogenic markers; histological staining with H/E and Syrian Red, and immunohistochemistry evaluating inflammatory markers. Locomotor activity, pain hypersensitivity, possible damage caused by tamsulosin, and antioxidant activity were evaluated.

Results: in different parameters, rats treated with tamsulosin showed a significant improvement in weight recovery and locomotor activity, compared to intact and vehicle. **Conclusion:** The use of tamsulosin at doses 11 µg/kg y 93 µg/kg can be considered as a therapeutic option for the recovery of liver damage; however, further trials and tests are required to support its efficiency in patients.



Capítulo 1 :
INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El hígado, debido a su multifuncionalidad, es un centro crítico para numerosos procesos fisiológicos. Es susceptible de sufrir lesiones causadas por diversos factores tales como el exceso de alcohol o medicamentos, trastornos metabólicos, infecciones como la hepatitis vírica y cáncer (Trefts & al, 2017). Las células estelares (CEH) son uno de los principales protagonistas por su activación de forma autocrina y paracrina. En respuesta a las lesiones, las células de Kupffer y Estelares hepáticas (CEH) se ponen en marcha produciendo fibras de colágenos para reparar y regenerar el hígado dañado, evitando su fracaso. Cuando el daño es crónico, la regeneración se desvía, perjudicando la función hepática y causando cirrosis (Garrido & Djouder, 2021).

La muerte relacionada con los daños hepáticos es una grave amenaza en todo el mundo. La fibrosis hepática progresiva, inducida por trastornos víricos y metabólicos crónicos ha convertido en una de las 10 principales causas de muerte (OMS, 2020). En los últimos años, debido a la promoción del tratamiento antiviral de acción directa, la mortalidad por cirrosis causada por el VHC se ha disminuido. Sin embargo, la tasa de las enfermedades hepáticas por el consumo de alcohol y la EHNA ha aumentado constantemente incrementando la tendencia de mortalidad (Ye & al, 2022; Sarin & Maiwall, 2021) .

En México la cirrosis hepática es la tercera causa más común de mortalidad en hombres y la séptima en mujeres. Siendo el consumo de alcohol, el hígado graso (esteatohepatitis no alcohólica) y las enfermedades metabólicas (resistencia a la insulina, diabetes mellitus) (IMSS & Kershenobich, 2015). El país es considerado como uno de los países con mayor consumo de alcohol, mayor incremento de obesidad y de diabetes; por lo cual reúne con diferentes factores que aumenta la incidencia de las enfermedades hepáticas (OPS/OMS, 2021).

Las principales alternativas para curar o controlar el proceso de fibrosis son el trasplante y la eliminación del agente causante. Sin embargo, existe ciertos inconvenientes que afecta el éxito del tratamiento. En caso de la retirada del agente causante, la regresión suele ser demasiada lenta, lo cual puede complicarse llevando a la mortalidad sobre todo en la fibrosis avanzada (Roehlen, Crouchet, & Baumert, 2020). Para el trasplante hepático, el reto es el número insuficiente de donantes en comparación con la creciente demanda de candidatos a trasplante (Meirelles-Júnior & al, 2015).

No existen fármacos antifibróticos o pro-regenerativos específicos aprobados para esta enfermedad. Sin embargo, han estado evaluando varios fármacos con el fin de revertir o regresar el proceso fibrótico (Fallowfield, Jimenez-Ramos, & Robertson, 2021). Los receptores adrenérgicos α -1 son importantes en la fisiología animal y humana, se han encontrado en diferentes partes del organismo, mayormente en el musculo liso de las vías urinarias. Los ligandos de estos receptores son la norepinefrina (NE) y la epinefrina. En el hígado, la norepinefrina es capaz de promover en la actividad de las CEH produciendo fibras de colágeno (Oben et al 2003).

Los antagonistas de los receptores α -1 son fármaco que se usa para hipertensión, inhibiendo el tono basal y disminuyen la frecuencia y amplitud peristálticas. Algunos de ellos como el caso de la doxazosina (DX) ha demostrado ser antifibrótico revirtiendo el fenotipo fibrogénico de las CEH e induciendo el fenotipo de senescencia (Serna-Salas & al, 2021).

La tamsulosina es un antagonista α -1 selectivo comúnmente usado para tratar hipertensión prostática benigna. A nivel renal, se han demostrado que la tamsulosina inhibe las expresiones de factores de fibrosis inducidas por la glucosa alta reduciendo las expresiones de MMP-2 y MMP-9 (Sun, Sun, & al, 2021). Aún no se han demostrado el efecto antifibrótico de la tamsulosina a nivel hepático. Por ello la presente investigación pretende evaluar si el tratamiento con el fármaco tamsulosina reduce el proceso de daño hepático logrando una posible

recuperación de la función hepática en un modelo de daño hepático en ratas Wistar.



MARCO TEÓRICO

Hígado

El hígado es uno de los órganos más importante y representativo del organismo por las múltiples funciones relacionadas entre sí que se realiza y su fisiología compleja. anatómicamente comparando la forma y la posición del hígado de cada especie, en todas se encuentra localizado en la parte adyacente del diafragma en el hipocondrio derecho (figura 1) (Rosas, 2010; Frandson & Spurgeon, 1995).

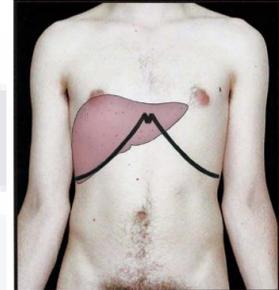


Figura 1.1 Posición del hígado. Proyección del hígado sobre la superficie del tronco.

Anatomía del hígado

Normalmente el hígado es de color marrón con un peso normal de entre 1400 a 1800 g en humano, está recubierto por tejido conjuntivo fibroso llamado cápsula de Glisson. Dicho tejido es penetrado por el hilio hepático rodeando las ramificaciones portales, arteriales y biliares. Además, está muy inervada por el sistema simpático; y una capa serosa, el peritoneo visceral del hígado (Wojciech & Ross, 2016). El aporte de sangre y nutrientes al hígado es por dos grandes vías: la primera, la cual representa el 80% del aporte total, es dada la vena porta formada por la unión de la vena esplénica superior proveniente del bazo y las venas mesentéricas provenientes del intestino delgado. El resto 20% es por la arteria suprahepática proveniente del tronco celíaco. Por otro la salida del flujo se hace mediante la vena hepática conduciendo la sangre a la vena cava inferior (fig. 2) (Sibulesky, 2013; Whitney, 2020; Lira & garcia-compean, 2016).

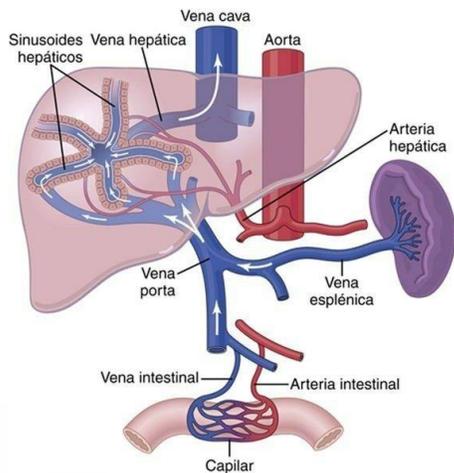


Figura 1.2. Observación de la circulación hepática. La sangre venosa proveniente de los órganos gastrointestinales y del bazo llega al hígado para realizar diferentes tipos de procesos, posteriormente se regresa al corazón. Por otra parte, la arteria hepática es encargada de transportar nutrientes y sangre oxigenada hacia las células hepáticas (Rodríguez, Biblioteca, 2021; Rodríguez, Circulación hepática, 2006).

Histología del hígado

La estructura del hígado es tridimensionalmente compleja por elementos epiteliales y mesenquimales que lo organizan en unidades microscópicas repetitivas. Existe diferentes formas de conceptualizar la estructura microscópica hepática siendo las más comunes el lobulillo y el acino. El hígado está compuesto por lóbulos que a su vez se organiza en lobulillo hepático. El lobulillo hepático representa la unidad estructural y funcional del hígado. Presenta una forma poligonal, formado básicamente por una vena central, las trabéculas de remak y las capilares sinusoidales; y está rodeado de tejidos conectivos donde se encuentra el espacio portal que contiene el triado portal formado por la vena porta, la arteria hepática y el conductillo biliar (Martínez-Chantar, 2017; Krishna, 2014).

El acino hepático descrito por Rappaport en 1958, es considerado como la unidad funcional más pequeña compuesto de tres zonas; la zona 1 también conocido como periportal que rodea el espacio porta, la zona 2 conocido como la zona

intermedia o media y la zona 3 conocida como pericentral que rodea a la vénula hepática. El aporte de nutriente y oxígeno hacia estas tres zonas es de mayor a menor siendo la zona periportal es la que recibe la mayor cantidad y la zona pericentral la menor. Lo que diferencia las funciones de los hepatocitos de cada zona (Deldado-Coello & Mas-Oliva, 2017; Krishna, 2014). Los hepatocitos de la zona 1, participan en funciones como la gluconeogénesis, la síntesis de urea y la beta-oxidación de los ácidos grasos. Por otro lado, los de la zona 3 intervienen en proceso del glucolisis y de la lipogénesis; y por la presencia de mayor cantidad de citocromo p 450, complejo enzimático y retículo endoplásmico liso, esta zona encargan de realizar la biotransformación, bioactivación y detoxificación de medicamentos, compuestos químicos y tóxicos que ingresa al organismo (Gumicio & Miller, 1981; Stanger, 2015).

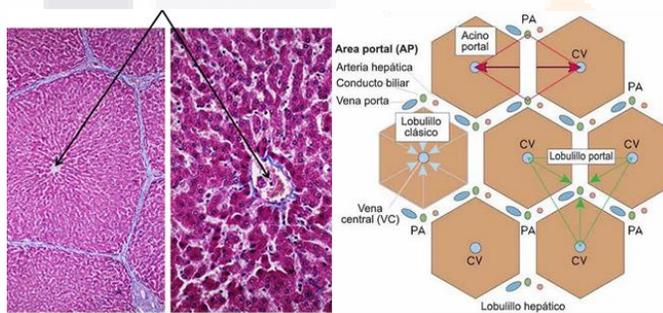


Figura 1.3. anatomía microscópica del hígado, se observa los diferentes componentes básicos del hígado, el lobulillo hepático (Poo, 2022; Le Vay, 2015).

Organización estructural del hígado

El hígado consta de entre 50 a 100 mil lobulillos los cuales en conjunto forman el parénquima hepático. El parénquima hepático está compuesto de células epiteliales que son los hepatocitos y los colangiocitos, células endoteliales y células no parenquimatosas residentes entre las que están las células estelares hepáticas (CEH) y las células de Kupffer, el sinusoides que es la unidad microvascular y el espacio subendotelial de Disse, donde residen las CEH (Torre-Delgadillo & Kershenobich, 2012).

a) Hepatocitos

Los hepatocitos representan el 60 a 80% de las células en el hígado y 50 a 60 % del volumen del hígado, están dispuestas en trabéculas o laminillas constituyendo el lobulillo hepático. Su función varía según la localización dentro del lobulillo (Lira-Pedrin & Garcia-Compean, 2016).

b) Células de Kupffer

Conocido como macrófagos propiamente del hígado. Fueron identificado por primera vez en 1876 por Karl W. von Kuppfer. Se encuentran localizado en el espacio sinusoidal y mayormente en la zona periportal y son comprometidas en mantener la homeostasis del hígado mediante la liberación de quimiocinas y citocinas después de entrar en contacto con las bacterias, endotoxinas bacterianas y residuos microbianos procedentes del tracto gastrointestinal (Cubero & Nieto, 2006; Steib & Gerbes, 2010). Tras algún daño hepático por endotoxina o alcohol y en la patogénesis de la inflamación y fibrosis, las células de Kupffer son lo primero en activarse de forma autocrina y paracrina estimulando la activación de las CEH (Clària & Titos, La célula de Kupffer, 2004).

c) Células estelares

También conocidas como células de Ito, en su estado quiescente representa el 5-8% de la población de las células hepáticas. Son células encargadas de almacenar la vitamina A. Se localizan el espacio de Disse, espacio que limita el endotelio y los hepatocitos. Participan en controlar la homeostasis tisular y mantener una especie de equilibrio fisiológico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz extracelular (MEC) (Sarema, Znaidaka, Macías, & Rey, 2006). En presencia de daño crónico las células de Kupffer y las CEH son las principales células implicadas en la producción de MEC bajo la influencia de diversos factores de liberación de citocinas y quimiocinas. Esta población de células se activa cuando se presenta la pérdida de retinoides y de la regulación de la síntesis de la matriz extracelular y colágena, causando la fibrosis. Además, las CEH de regular la producción de metaloproteasas (MMPS), la degradación

de matriz extracelular y el inhibidor tisular de la metaloproteinasa (TIMPS) (Lira & garcia-compean, 2016).

d) Matriz extracelular

La MEC, situada en el espacio subendotelial de Disse, está compuesta por una compleja mezcla de proteínas: sistema colágeno, sistema elástico, proteoglicanos glicoproteínas multifuncionales que confieren las propiedades estructurales de células y tejidos (Silvera-Arenas & Barrios, 2002). En condiciones normales se trata de una matriz de baja densidad, que contiene sustancias nutritivas, factores de crecimiento y permite la diferenciación celular a través diferentes estímulos celulares. La MEC es inervada por las fibras nerviosas vegetativas, cuyas terminaciones libres constituyen auténticas sinapsis a distancia tanto de las propias células de la matriz como de las células parenquimatosas más próximas (Álvaro-Naranjo, Noguera-Salvá, & Fariñas-Guerrero, 2009).

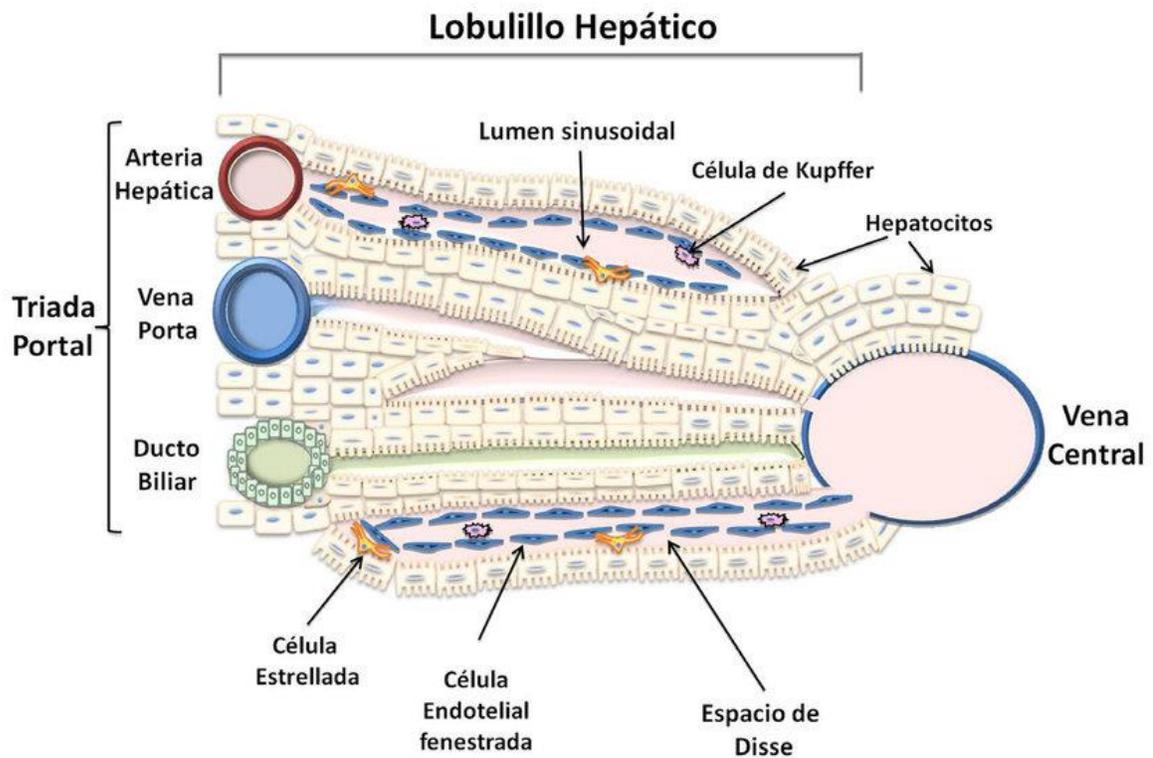


Figura 1.4. Las células hepáticas. observación de los diferentes tipos de células que forman el parénquima y la mesénquima hepática (Deldado-Coello & Mas-Oliva, 2017).

Fisiología del hígado

a) Sistema hepatobiliar

El sistema hepatobiliar consiste en que el hígado produce y segrega bilis hepática en los canalículos que atraviesa una serie de conductos biliares de tamaño creciente hasta los conductos hepáticos. El flujo desde los hepatocitos es de dirección opuesta a la sangre arterial hepática y la vena porta, es decir desde la periferia hacia el centro. Mediante esta unión la bilis hepática es recolectado por el conducto colédoco para llevar hacia el duodeno o por el conducto cístico hacia la vesícula biliar. Esta trayectoria es regulada por el esfínter de Oddi. La cantidad de bilis producida por las células hepáticas no es suficiente para emulsionar adecuadamente a los lípidos del intestino delgado. La vesícula es encargada de almacenar para distribuirla cuando es necesario. La vesícula biliar por si sola es capaz de contraer para impulsar la salida de la bilis con la estimulación de la colecistocinina (CCK) (Preton, Wilson, & Palacios Martinez, 2013).

b) Metabolismo

El hígado es encargado de metabolismo y procesar todos los nutrientes, fármacos y hormonas que ingresan y/o almacenan en el organismo vivo. En presencia de ayuno, es el principal órgano capaz catalizar moléculas de glucógenos, lípidos y aminoácido transformándolas en glucosa para después liberarlas en el torrente sanguíneo para obtener energía. Sintetiza y almacena lípidos, proteínas y carbohidratos para el funcionamiento del organismo. (Ramírez Rico, 2013).

Sistema simpático y parasimpático del hígado

Sistema nervioso hepático

La inervación del hígado es muy compleja aún falta por investigar para conocerla bien. Sin embargo, el hígado como el resto del cuerpo, tiene inervación neural tanto parasimpática como simpática (Abdel-Misih). Los nervios hepáticos provienen de los nervios espláncnicos y vagales los cuales rodean la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar (Mizuno & Ueno, 2016). El nervio vago está compuesto por fibras motoras y sensoriales, mientras que los nervios espláncnicos constan de fibras viscerales eferentes y aferentes, así como de fibras sensoriales. Estos nervios transmiten diferentes tipos de informaciones desde el hígado hacia al cerebro a través de las neuronas aferentes. Por otra parte, el hígado recibe diversas señales, como el flujo sanguíneo, la secreción de bilis y el metabolismo a través de las neuronas eferentes por lo que esta inervación hepática puede ser asociada a la fibrosis hepática, la regeneración y el ritmo circadiano (Jensen, Alpini, & Glaser, 2013).

La inervación simpática es postganglionar, originando en los ganglios celíacos y mesentéricos superiores que reciben fibras preganglionares de la columna intermediolateral de la médula espinal principalmente en T7-T12 (Yi, la Fleur, Fliers, & Kalsbeek, 2010). Los nervios parasimpáticos son ramificación proveniente del nervio vago los cuales inervan directamente al hígado siendo fibras preganglionares que se originan en el núcleo motor dorsal del tronco encefálico, o bien hacen sinapsis en los ganglios situados en el hilio hepático y en los espacios hiliares (Hoover & Barron, 1982; McCuskey, 2004).

A diferencia con otras especies, la inervación hepática de los roedores es rara vez detectada por dentro de los lóbulos. Por lo que las fibras nerviosas de todo tipo se concentran en el pedículo hepático y en los campos periportales y algunas se encuentran a lo largo de las venas hepáticas (Neuhuber & Tiegs, 2004).

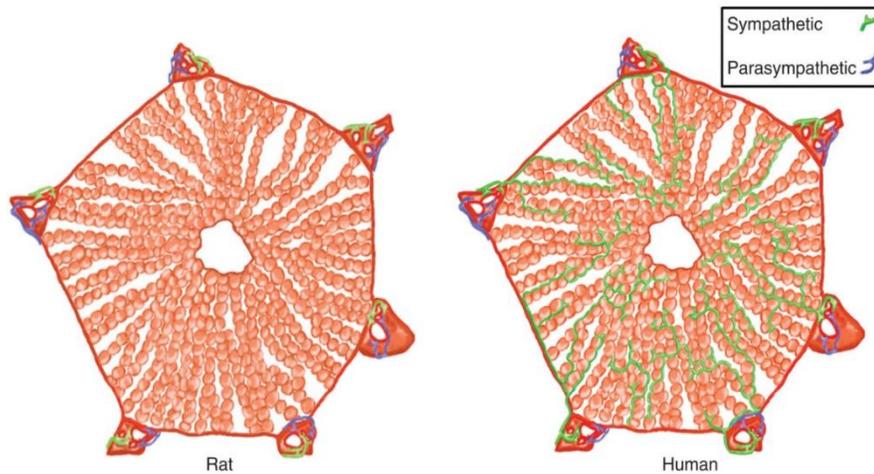


Figura 1.5. Observación de las fibras nerviosas simpáticas y parasimpáticas intrínsecas a nivel hepático. Así como las diferencias entre las ratas y los otros mamíferos. En todas las especies de mamíferos, las fibras simpáticas y parasimpáticas rodean la zona porta (Kendal, Alpini, & Glaser, 2013)

Daños hepáticos

El daño hepático ha sido un tema muy importante tanto para el área de la medicina como en el área de la investigación biológica. Al ser uno órgano que participa en diversas funciones del organismo, es muy propenso a afectar por lesiones, agente patógeno o sustancias tóxicas (Litin, 2018). Tras de un daño hepático, el hígado somete a diferentes cambios morfofisiológicos dando resultado a la producción y acumulación de fibras de colágeno en el espacio de Disse. La fibrosis es un factor clave para la evolución de los daños hepática y el riesgo de hepatocarcinoma celular (CHC) (Roehlen, Crouchet, & Baumert, 2020). Las principales etiologías de las enfermedades hepáticas crónicas comprenden el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de hepatitis C (VHC), la esteatohepatitis alcohólica (EHA) y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) caracterizado por múltiples factores de riesgo tales como el sobrepeso, la obesidad central, la dislipidemia, la resistencia a la insulina y el *Diabetes Mellitus* tipo 2 (Castro & al,

2015). Abarca diversos grados de daño hepático iniciando con la esteatosis a la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (Sigala & al, 2013); así como las enfermedades autoinmunes y genéticas (LLOvet & al, 2016). La progresión de la fibrosis es caracterizada por un cuadro de inflamación crónica, la acumulación excesiva de colágeno y de otras proteínas de matriz extracelular (MEC), conducen a una distorsión de la arquitectura hepática normal afectando las funciones hepáticas (Castro Narro G, 2016).

La retirada o eliminación del agente causante es capaz de controlar la progresión de la fibrosis. Por lo contrario, la fibrosis es capaz de desarrollar en cirrosis y hepatocarcinoma celular (CHC) distorsionando la arquitectura del parénquima hepático con la formación de nódulos regenerativos, lo que lleva a ciertas complicaciones como la insuficiencia hepática, la hipertensión portal y la encefalopatía hepática (Aldaba-Muruato, Moreno, & al, 2013). Lo que causada un desequilibrio a nivel sistémico manifestar con alteraciones en la función sintética hepática con problemas en la coagulación, manejo del nitrógeno y sistemas de detoxificación, así como datos de hipertensión portal con formación de ascitis y hemorragia por várices esofágicas, susceptibilidad aumentada a infecciones (D'Amico, Morabito, D'Amico, & al, 2018).

La encefalopatía hepática (HE), síndrome neuropsiquiátrico producido durante la enfermedad hepática crónica (ECH), es caracterizado por un incremento de desecho de metabolismo principalmente el amonio al nivel cerebral (Ochoa-Sanchez & Rose, 2018). En condiciones normales el hígado es encargado de la depuración de desechos tales como amonio que se realiza mediante el ciclo de la urea. En presencia de una disfunción hepática grave este mecanismo se disminuye causando a una hiperamonemia que produce cambios en la conducta y afecta la capacidad neurológica y motora del individuo. Se sabe que el amonio es producido a nivel intestinal por la acción de la glutaminasa sobre la aminoácido glutamina que se transforma en glutamato y amonio (fig. 6) (Granados, 2018). Y la acumulación de líquido en el peritoneo por el disfuncionamiento renal; son las principales manifestaciones del desequilibrio sistémica (Domínguez et al., 2009; Moreno, 2015).

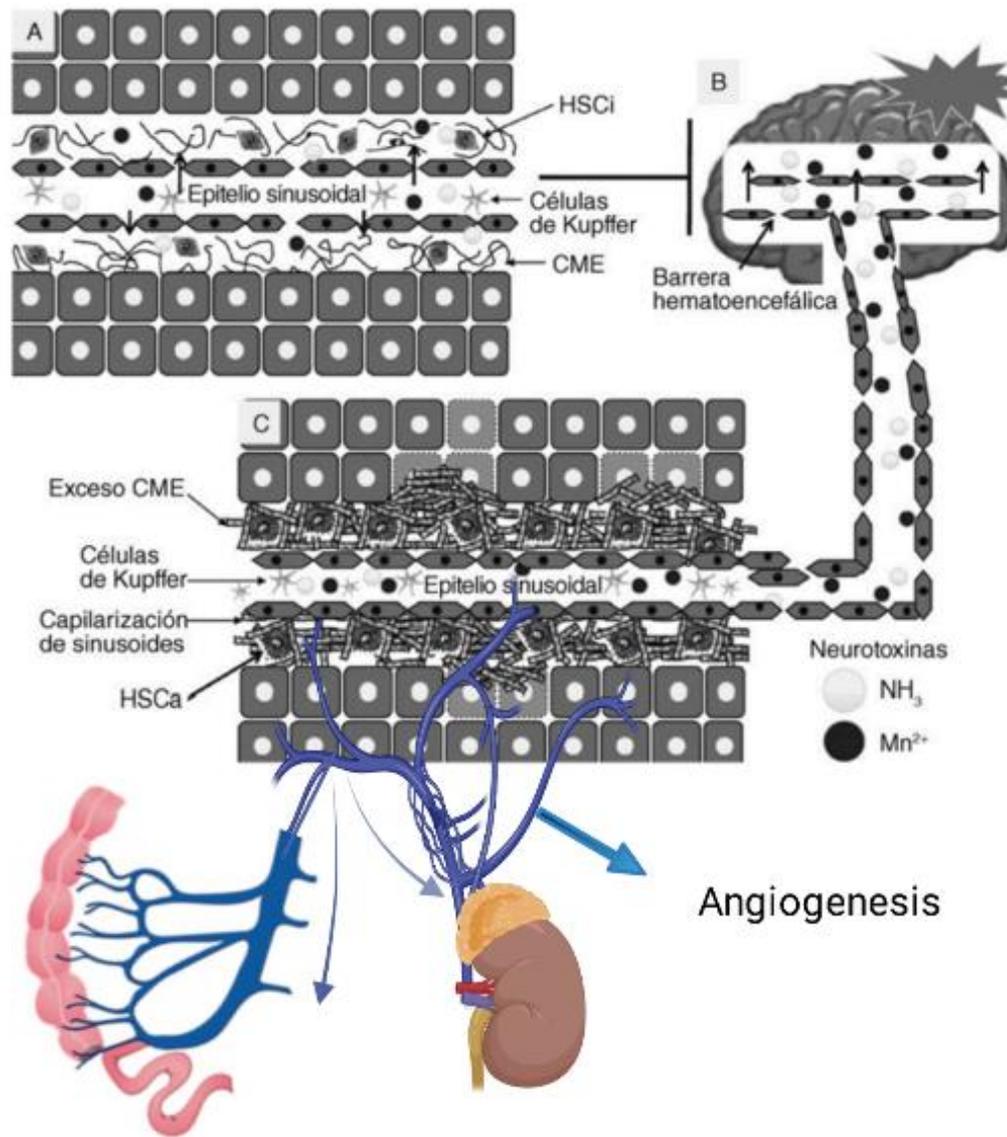


Figura 1.6. Se observa el proceso de incremento de amonio en la sangre por la activación de las células estelares y la producción de fibras de colágeno en la matriz extracelular (Márquez-Aguirre, Galvez-Gastelum, Canales-AguirreaU, & Gómez-Pinedob, 2010).

El mecanismo de daño hepático

En presencia de una lesión hepatocelular estimulada por algún agente, las células endoteliales sinusoidales del hígado se desregulan presentando una

desdiferenciación hacia un fenotipo capilarizado. Este proceso está acompañado de la producción y liberación de factores que activan a las células vecinas promoviendo la activación de las células de Kupffer y las CEH (Marrone, Shah, & Gracia-Sancho, 2016). La cronicidad de la lesión conduce a la inflamación y la fibrosis del hígado. Durante el proceso de fibrosis, las CEH juegan papel de mediadores de moléculas de matriz, proteasas y varios inhibidores que participan en la respuesta de cicatrización fibrosa del hígado (Friedman S. , 2003). La cicatrización resulta la acumulación de proteínas de la matriz extracelular (MEC), principalmente colágenos reticulados de tipo I y III, que sustituyen al tejido normal dañado (Kisseleva & Brenner, 2021). Tanto las CEH como las células de Kupffer, durante su activación, ellas son capaces de reclutar citocinas inflamatorias derivadas de la médula ósea y producir TGF β que estimula la síntesis excesiva de fibras de colágenos que forma la cicatriz fibrosa (Bataller & Brenner, 2005).

Activación de las células de Kupffer.

Las células de Kupffer son macrófagos específicos del tejido hepático. Los estudios han demostrado que, al activarse durante el proceso de fibrosis hepática, produce citoquinas por la estimulación paracrina. Luego activan las CEH secretando α -SMA que promueven la síntesis de colágeno y el proceso de fibrosis hepática (Zhang & Yuan, 2021). Las células de Kupffer en su activación liberan cantidades masivas de citocinas como IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , radicales libres de oxígeno y aniones superóxido, IFN- α y γ ; y eicosanoides como PGD₂,

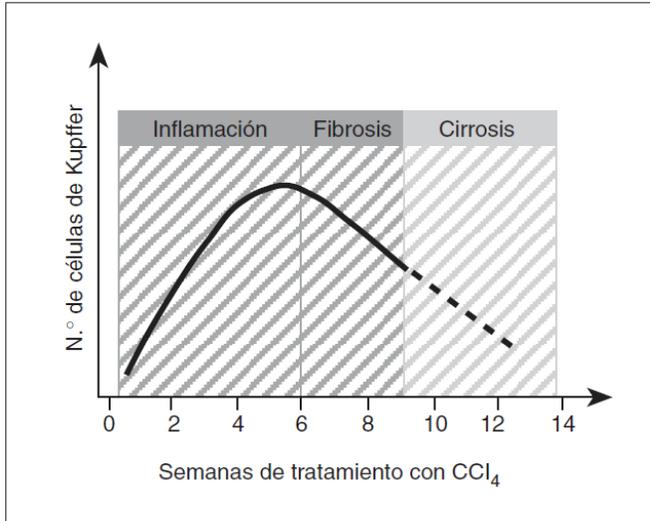


Figura 1.7. En esta ilustración se observa la cinética de la población de células de Kupffer en el daño hepático por CCl₄. Este gráfico muestra de forma resumida los datos disponibles sobre el crecimiento de la población de células de Kupffer durante el curso de la enfermedad hepática inducida por CCl₄ en ratas (Geerts, Schellinck, Bouwens, & Wisse, 1988; Clària & Titos, La célula de Kupffer, 2004).

PGE2 y leucotrienos que conducen a la inflamación y necrosis en el tejido hepático (Clària & Titos, La célula de Kupffer, 2004). La activación de las células de Kupffer puede ser de dos tipos diferentes: M1 y M2. El M1 con CD86 y CD40 como marcadores de superficie, y el tipo M2 con CD163 como principal marcador de superficie. Se han demostrado que CD163 es una molécula antiinflamatoria, que es inhibida por la estimulación proinflamatoria y se encuentran en la región del tejido regenerativo después de una lesión isquémica (Grønbæk, Sandahl, & al, 2012)..

Activación de las células estelares hepáticas

La liberación de las citocinas por parte de las células de Kupffer produce una activación paracrina de la CEH. Las CEH se proliferan, se contraen y depositan una cantidad elevada de fibras de colágeno y moléculas de matriz extracelular en el parénquima hepático, contribuyendo a la rigidez del órgano y perturbando todas las funciones celulares. La acumulación de colágeno en el espacio de Disse puede contribuir a la pérdida de fenestraciones endoteliales, agravando la fibrosis hepática. Por lo tanto, un ciclo que se autoperpetúa entre las CEH activadas productoras de colágeno y las células endoteliales sinusoidales capilarizadas se estimulan mutuamente, contribuyendo a la fibrosis hepática (Marrone, Shah, & Gracia-Sancho, 2016).

El proceso de fibrosis está dado por un daño crónico lo que provoca la producción de proteínas de MEC excede a la degradación, posteriormente se desarrolla un engrosamiento progresivo de los septos fibróticos y el entrecruzamiento de las fibras de colágeno. La MEC puede modular la activación y la proliferación de la CEH, angiogénesis y la disponibilidad y actividad de los factores de crecimiento y la metaloproteinasa (Torre-Delgadillo & Kershenobich, 2012) (Hynes, 2009).

El proceso de fibrosis hepática está fuertemente asociada al estrés oxidativo, el aumento de la producción de TGF- β , la activación de NF- κ B, la inflamación crónica y la muerte de los hepatocitos. El TGF- β es la citocina fibrogénica más potente que estimula la activación de las células estrelladas hepáticas CEH, que promueven la producción de la MEC, además, el TGF- β inhibe la degradación de la MEC estimulando la producción de inhibidores tisulares de metaloproteasas (Aldaba-Muruato L. R., Moreno, Shibayama, Tsutsumi, & Muriel, 2012) como se observa en la figura 1.8.

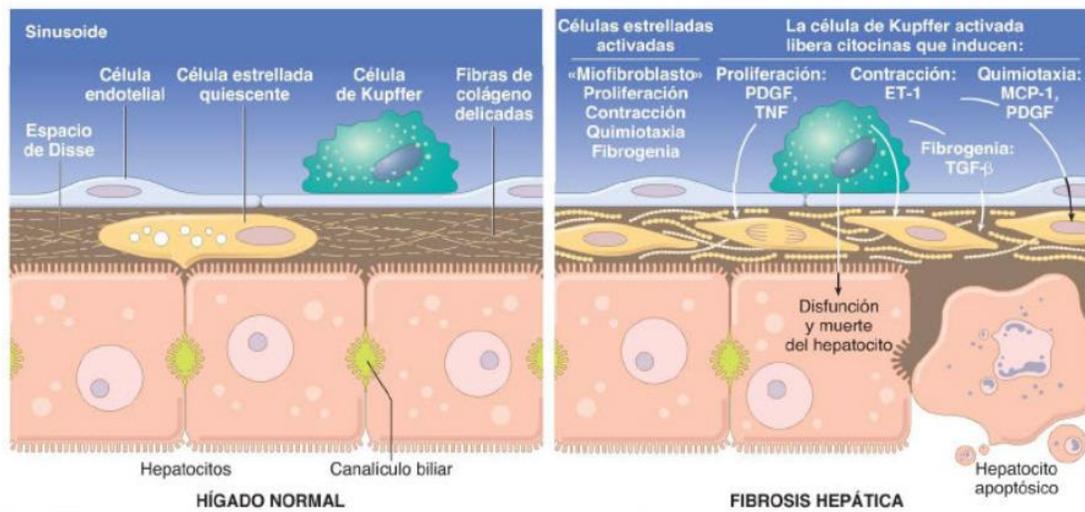


Figura 1.8. Se observa la comparación de las células hepática en estado normal. tras un daño se observar una activación de las células, la cual lleva a la acumulación de fibras de colágeno en el espacio de Disse.

Respuesta inmunitaria al daño hepática

Tras los daños hepáticos, las células epiteliales muertas liberan mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF), la IL-6, la IL-1 β y las especies reactivas de oxígeno (ROS) y patrones moleculares asociados al daño (DAMP) que provoca una respuesta inflamatoria (Heymann & Tacke, 2016; Pellicoro & al, 2014). A su vez, se presenta estimulación autocrina y paracrina de diferentes células del hígado liberando factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) y citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-6) que activan las vías de señalización relacionada a la proliferación celular, la migración, la secreción de proteínas de la MEC y contractilidad que promueven la activación de la CEH, células mesenquimales precursoras en miofibroblastos fibrogénicos (Friedman S. L., 2008; Higashi, Friedman, & Hoshida, 2017). Con el fin de limitar el daño celular, el sistema inmunológico modula la respuesta proinflamatoria mediante liberación de citocinas antiinflamatorias como el antagonista del receptor de la IL-1 [IL-1 ra], el TGF- β , las interleucinas 4, 6, 10, 11, 13 y 17, y los receptores específicos para la IL-1, el TNF y la interleucina 18 (de Pablo Sánchez & al, 2005). La activación las CEH conduce a la expresión de TGF- β 1 que aumenta la secreción de colágenos (tipos I y III) y de α -actina músculo liso (α -SMA) (Yang, Yang, Zhang, & al, 2020; Wang, Tu, Liu, & al, 2019).

Sistema simpático en presencia de daño hepático

En estudios realizados, han descubierto que la netrina-1, una proteína de guía neuronal derivado de los macrófagos que estimula la fibrosis. La sobreexpresión de la netrina-1 impulsa la fibrosis asociada al nervio adrenérgico lo que produce incrementa de la liberación de noradrenalina (Barnault, Verzeroli, & al, 2022; Gao, Peng, & al, 2021).

Agentes hepatotóxicos

Tioacetamida (TAA)

La tioacetamida es un compuesto organoazufrado. Se conoce por ser uno de los agentes fungicidas comúnmente utilizado en el campo de la investigación para inducir modelos animales de fibrosis hepática y cirrosis, ya que la exposición prolongada da lugar a fibrosis hepática y cirrosis histológicamente (Yuan, Hai-Ping, Hong, Zhao-Xian, & Guang-Ji, 2013; Emam & al, 2018). Es metabolizado a nivel hepático por acción de las isoenzimas 2E1 pertenecientes a la súper familia del Citocromo P450 produciendo estrés oxidativo, peroxidación lipídica y daño al DNA como se observa en la ilustración 9 (Cinvestav, 2022). La inducción con TAA aumenta las transaminasas hepáticas (alanina aminotransferasa [ALT] y aspartato aminotransferasa [AST]), la fosfatasa alcalina (ALP) y la bilirrubina total

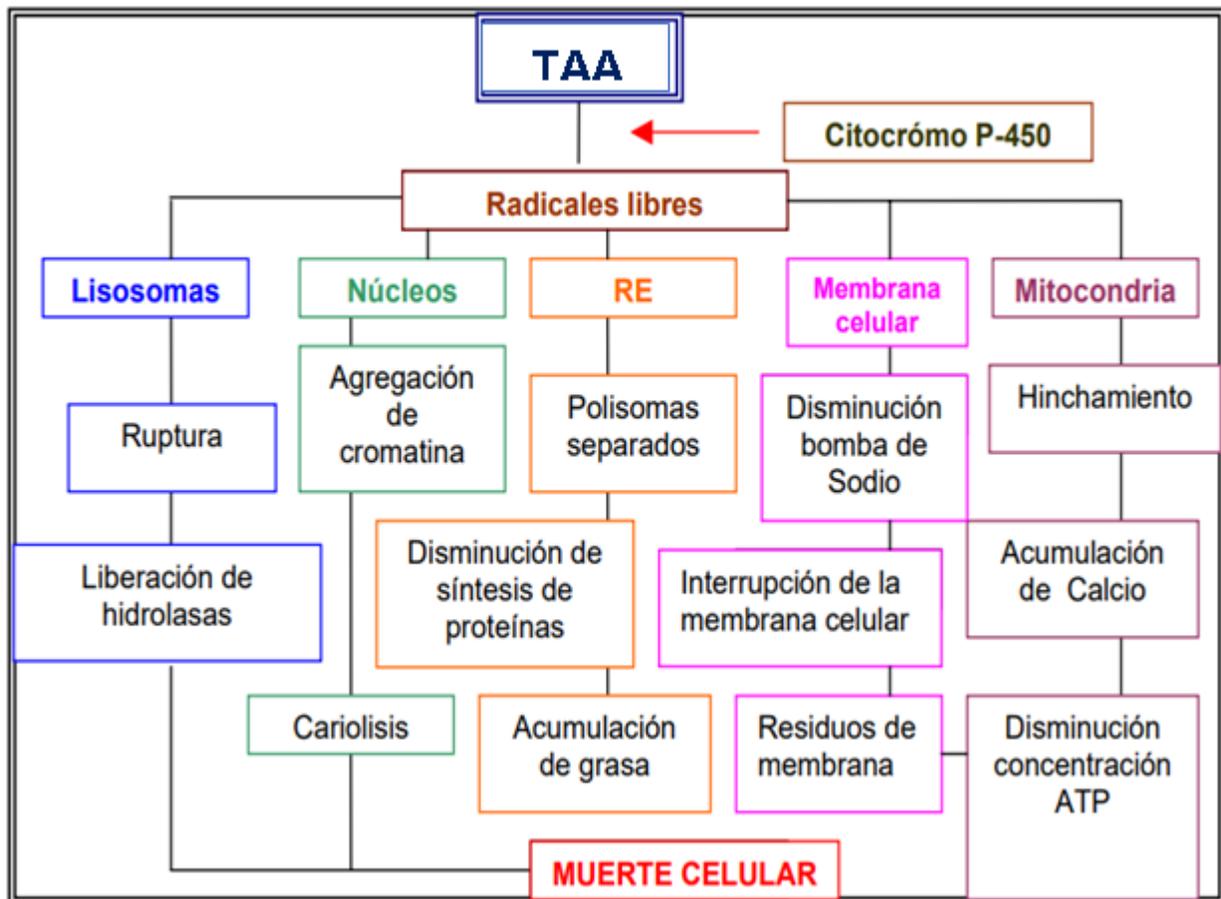


Figura 1.9: El mecanismo de daño causado por la célula hepática durante el proceso de fibrosis hepáticas.

Tratamiento actual

Tratamiento

Los fármacos para revertir la fibrosis que mejoren y recuperen la función hepática, muy pocos han sido aprobados (Fallowfield, Jimenez-Ramos, & Robertson, 2021). Han utilizado diferentes tipos de tratamientos con el fin de contrarrestar las complicaciones clínicas como ascitis, hemorragia digestiva, encefalopatías hepáticas, la translocación bacteriana, el síndrome hepatorenal entre otros. Algunos de ellos son los antiinflamatorios como los corticosteroides inhiben la respuesta inmune y tienen acción antifibrogenica en paciente con hepatitis crónica autoinmune o con hepatitis alcohólica. Sin embargo, su utilidad en el resto de hepatopatía no ha sido demostrada (Altamirano Gomez & al., 2012; Mathurin & al., 2011). Otros son los moduladores de la activación y/o proliferación de las células estelares como el uso de antioxidantes ha mostrado tener efecto benéfico en retrasar la progresión de la FH (Sanya & al., 2010; Castro Narro G, 2016).

Las CEH tienen receptores adrenérgicos (RA) que median sus actividades metabólicas, proliferativas y regenerativas. La activación de los RA inicia cambios profibróticos en las CEH. Además, los antagonistas de los α -RA disminuyen la presión portal reduciendo la resistencia intrahepática. Recientemente han demostrado que el daño hepático se reduce en modelos de ratones mediante el uso de prazosina, un antagonista del α 1-RA, a través de una simpatectomía química inducida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigala & al, 2013). La doxazosina otro α -RA es un hipotensor utilizado para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna e hipertensión arterial debido a la inducción de apoptosis de las células epiteliales y del músculo liso de la próstata. Además, cuando se inhibe la sobreexpresión de TGF- β , se reduce la fibrosis hepática. Además, cuando se inhibe la sobreexpresión del TGF- β , se reduce la fibrosis hepática, por lo que los inhibidores del TGF- β como posibles fármacos

antifibróticos. Sin embargo, a nivel de regeneración la doxazosina provocó ligeros cambios morfológicos en los hepatocitos, como su balonización, sin afectar a la función hepática, (Muñoz-Ortega & al, 2016; Cervantes-Garcia & al, 2017) Al igual que la doxazosina la Tamsulosina es un α 1-RA se utiliza para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna e hipertensión arterial debido a la inducción de apoptosis de las células epiteliales y del músculo liso de la próstata, pero no hay estudio sobre el efecto antifibrótico a nivel hepático.

Tamsulosina

La tamsulosina es un antagonista selectivo de los adrenoceptores alfa-1A y 1B aprobada por primera vez por la FDA el 15 de abril de 1997. Ejerce su mayor efecto en la próstata y la vejiga, donde estos receptores son más frecuentes. Se utiliza para tratar los signos y síntomas de la hipertrofia prostática benigna (DrugBank, 2022; PubChem, 2022). Su efecto consiste en inhibir los receptores adrenérgicos alfa presentes en el músculo liso del cuello de la vejiga y la próstata. Los receptores α 1 son generalmente postsinápticos, que presentan en los músculos lisos vasculares y no vasculares.

Existen varios subtipos de receptores α 1 que incluyen el α 1A, el α 1B y el α 1D. Los receptores

α 1A se encuentran localizados predominantemente en los músculos lisos del tracto genitourinario, son los principales reguladores del tono del músculo liso en el cuello de la vejiga y la próstata. Los receptores α 1B están presentes en el músculo liso vascular y regulan el tono vascular. El subtipo α 1D media la contracción del músculo de la vejiga (Manjunatha, Pundarikaksha, & al., 2016;

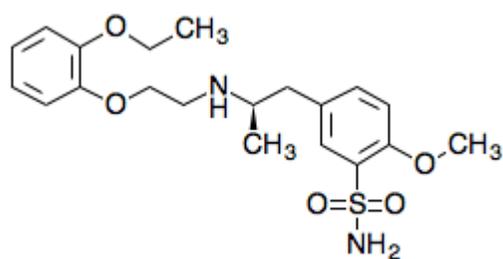
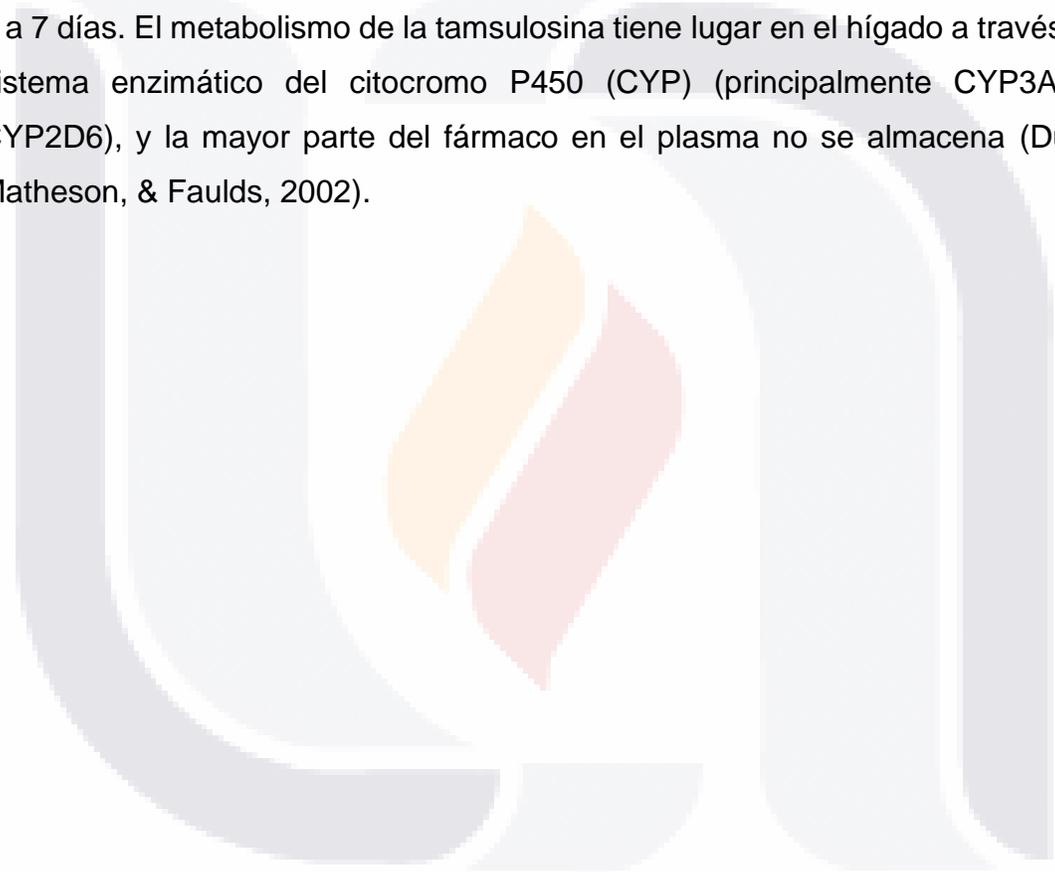


Figura 1.10. Observación de la estructura de la tamsulosina. (Kegg, 2022)

Rossi & Roumeguère, 2010). En estudios anteriores, se han revelado que la tamsulosina está altamente asociada a las proteínas plasmáticas por lo que su eliminación es principalmente por el metabolismo hepático (Matsushima, y otros, 1999). En tratamiento de hiperplasia prostática benigna, se recomienda una dosis de 0.4 a 0.8 mg en ayuno (Carretero-Colomer, 2006). La tamsulosina presenta una cinética lineal tras la administración de dosis únicas y múltiples. Las concentraciones plasmáticas están asociadas a una considerable variabilidad interindividual, en estado estacionario se alcanzan generalmente en un plazo de 4 a 7 días. El metabolismo de la tamsulosina tiene lugar en el hígado a través del sistema enzimático del citocromo P450 (CYP) (principalmente CYP3A4 y CYP2D6), y la mayor parte del fármaco en el plasma no se almacena (Dunn, Matheson, & Faulds, 2002).

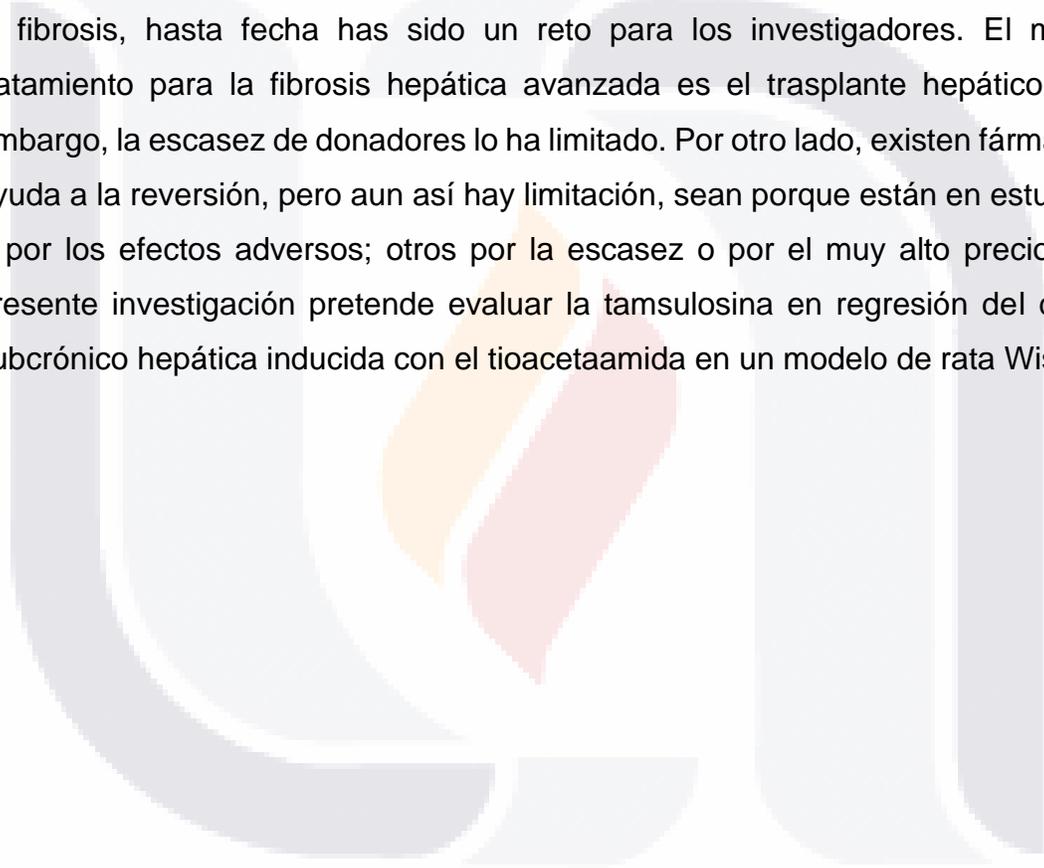




Capítulo 2 :
JUSTIFICACIÓN

Justificación

La fibrosis hepática es la acumulación de fibras de colágeno en la matriz extracelular causada por cualquier daño a nivel del hígado. Puede progresar desde leve, moderado hasta severo y a su vez reversible o irreversible afectando a nivel sistémico del organismo. Existe diversos factores causantes que dañan el hígado siendo el abuso del alcohol como el principal a nivel mundial. México se encuentra dentro de los 10 países con mayor mortalidad a nivel mundial. Revertir la fibrosis, hasta fecha ha sido un reto para los investigadores. El mejor tratamiento para la fibrosis hepática avanzada es el trasplante hepático; sin embargo, la escasez de donadores lo ha limitado. Por otro lado, existen fármacos que ayudan a la reversión, pero aun así hay limitación, sean porque están en estudios o por los efectos adversos; otros por la escasez o por el muy alto precio. La presente investigación pretende evaluar la tamsulosina en la regresión del daño subcrónico hepático inducido con el tioacetamida en un modelo de rata Wistar.





Capítulo 3 :
HIPÓTESIS

Hipótesis

El tratamiento con tamsulosina reducirá el proceso del daño hepático en un modelo de daño subcrónico en ratas Wistar inducido con el tioacetamida.





Capítulo 4

OBJETIVOS:

Objetivos

General

Analizar si el tratamiento con tamsulosina reduce el proceso de daño hepático en un modelo de daño subcrónico en rata Wistar inducido con tioacetamida.

Particulares

- Establecer un modelo de daño subcrónico hepático y las condiciones para su posible recuperación.
- Demostrar el efecto de la tamsulosina en la posible recuperación de la función y estructura histológica hepática tras el daño subcrónico inducido con tioacetamida.
- Evaluar el efecto de la tamsulosina sobre la actividad locomotor durante el proceso de daño subcrónico en rata Wistar inducido con tioacetamida.
- Evaluar marcadores moleculares relacionados con daño hepático en el modelo de daño subcrónico en rata Wistar inducido con tioacetamida y tratado con tamsulosina.



Capítulo 5

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Materiales y metodología

Modelo experimental

Las pruebas experimentales fueron realizadas en 42 ratas Wistar macho de 6 a 8 semanas de edad, 100 a 250 g. todos fueron manejados de acuerdo con las directrices del Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, que se basa en la guía de NHI para la investigación animal (Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, 2011). La dieta consistía en Purina Chow y agua ad libitum durante todo el experimento. Los animales fueron previamente desparasitados bisemanalmente durante una semana con una suspensión que contiene fenbendazol de 500 mg, toltrazuril de 150 mg y prazicuantel de 50 mg.

Las 42 ratas fueron distribuidas en 7 grupos (n= 6) de los cuales: un grupo intacto, un grupo inducido de daño hepático con TAA durante 5 semanas a una dosis creciente de 200 a 300 mg/kg de peso. Tres grupos inducidos de daño fueron tratados durante 2 semanas, dos con a tamsulosina a dosis de 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso de acuerdo con la dosis aplicado en humano y a una dosis de 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso de acuerdo con el factor de equivalencia de humana a rata y el otro con agua de garrafón. Finalmente, para evaluar el daño por el tratamiento, los dos grupos restantes fueron tratados con tamsulosina a 11 y 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pesos. Durante la inducción y el tratamiento, las ratas fueron evaluados mediante el registro del peso semanalmente, el registro de la actividad física diaria usando una rueda de actividad y el control de la hipersensibilidad cada 15 días. Previamente de la inducción se evaluó la actividad basal.

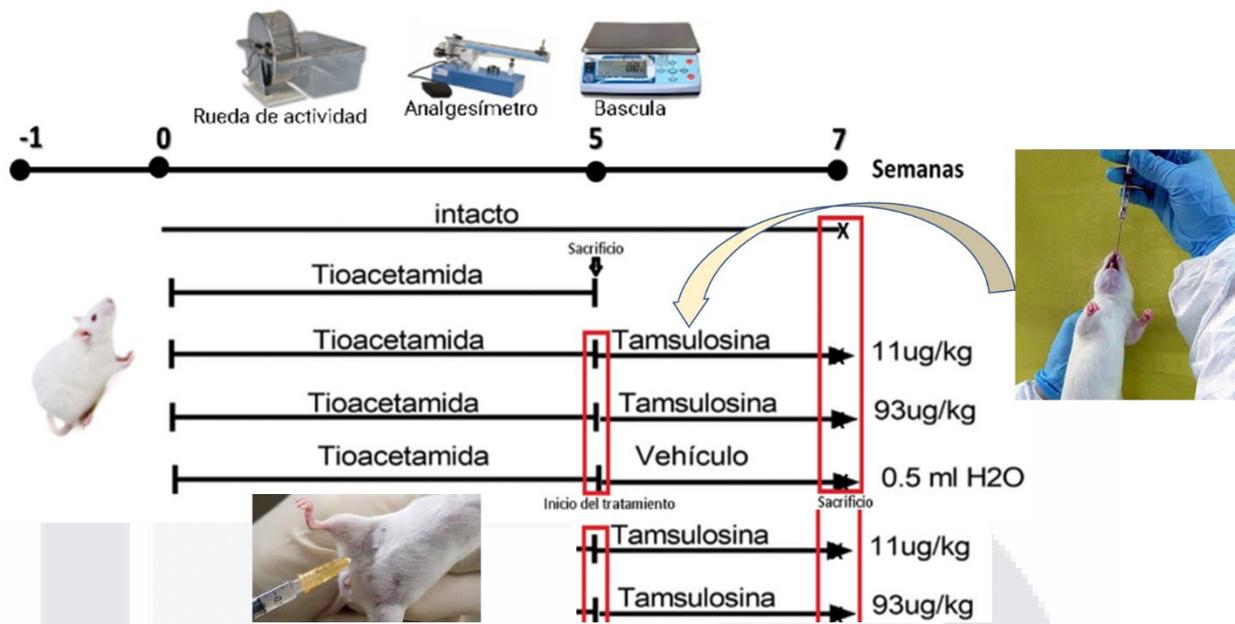


Figura 6: Distribución de los 7 grupos experimentales que fueron inducidos y tratados.

Sacrificio de los animales

Al terminal el periodo de cada tratamiento como se observa en la ilustración anterior, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital 0.66ml/kg de concentración 0.63mg/ml y sacrificadas extrayendo tejido hepático y suero sanguíneo. Mediante suero sanguíneo se evalúa diferentes marcadores de daño hepático como albúmina, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina, fosfatasa alcalina, amonio, y glucosa. Por otro lado, los tejidos hepáticos fueron divididos en dos partes. Una parte fue fijada en formalina a 10% y guardado a temperatura ambiente para el análisis histológico usando la tinción hematoxilina & eosina y Rojo Sirio; y la inmunohistoquímica usando el marcador NF- κ B. La otra parte fue fijada en RNA later para la evaluación de marcador moleculares proinflamatoria (NF- κ B, IL-1 y IL-17), Antiinflamatoria (IL-10 y TGF- β), profibrogénico (TGF- β), tumorales (AFP y EGF) y el Factor de Crecimiento epidérmico (EGF).

Análisis de marcadores de daño hepático

Las muestras de sangre recolectada fueron centrifugadas a 6000 rp/min durante 5 minutos. Se separó el suero de los glóbulos rojos, posterior a eso se analizó los marcadores bioquímicos albumina, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina, fosfatasa alcalina, amonio, y glucosa; mediante química húmeda.

Análisis histológicos

Una vez extraído las muestras de tejido hepático, se llevó cada muestra a formalina neutro a 10% para la fijación. Tras la fijación, los tejidos fueron procesadas en parafina en cual consiste en la deshidratación y la inclusión del tejido utilizando el equipo de Histoquinet Thermo Scientific Microm modelo STP durante 12 hora. Posteriormente se incluyeron en bloque de parafina (Thermo Scientific Microm EC150-1 y EC150-2). Después se realizó cortes de 5 μm de espesor en microtomo (Leica RM 2125RT). finalmente las tinciones de rojo siro, hematoxilina-eosina (HE) y la inmunohistoquímica (NF- κB).

Tinción Hematoxilina-Eosina (HE)

Para la tinción de HE, se realizó una metodología modificada de la cual los cortes de tejidos fueron hidratados con xilol, alcohol a 100, 96 y 70 % y con agua destilada. Posteriormente se tiñeron con hematoxilina, se dejaron en PBS para después teñir con la solución eosina. Una vez teñidos se deshidrataron los cortes con alcohol de menor a mayor y con xilol al 100%. Finalmente se realizaron el montaje en entellan para la observación en microscopio.

Tinción rojo sirio

Para identificar la presencia de fibras de colágenos tipo I y III, una serie de cortes de tejidos fueron hidratados (con xilol al 100%, alcohol de mayor a menor grado y agua destilada) y teñidos hematoxilina de Weigert, durante 8 minutos, posteriormente se incubó en la tinción de rojo sirio pícrico por una hora. Finalmente, los cortes fueron deshidratados y montados en entellan para la observación con luz polarizada.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica fue realizada de acuerdo con la metodología de Ventura-Juarez y cols, (2002), con el fin de identificar presencia de inflamación. el anticuerpo primario fue el anti-NF- κ B de 1:100 de dilución. Se dejó incubar durante 24 horas a 4 °C en cámara humedad para después agregar se anticuerpo secundario Anti-Ratón (HRP) diluido en 1:4 PBS más 0.5 % de suero bobino fetal. Se revelo con 3,3'diminobencidina diluida en 1:10 en buffer de sustrato de peroxidasa 1x. los cortes fueron hidratados, teñidos en hematoxilina, deshidratado y montados en entellan para la posterior observación en microscopios.

Análisis de marcadores moleculares

Extracción y cuantificación de ARN

Las muestras de tejidos hepáticos fueron guardadas a -80°C en RNA later. Se extrajo el ARN usando el kit Direct-zol Miniprep del fabricante Zymo Research. Siguiendo el protocolo del fabricante. Los tejidos fueron homogenizados con trizol y mezclado con etanol absoluto. El ARN fue separado de los otros componentes de la células y lavado hasta que se obtuvo. Posterior a la extracción, se cuantificó el contenido de ARN

presente usando el equipo Nanodrop-200 (Thermo Scientific) y almacena a -80°C en ultracongelador (Thermo-Scientific forma 88000 SERIS).

Retotranscripción de ARN

El ARN extraído fue retrotranscrito en cDNA usando el kit GoScript Reverse de Promega siguiendo la metodología del fabricante. Se preparo una mezcla de ARN, Oligo dt y agua libre de nucleasas. La mezcla fue colocada en el termociclador (Swift™ Minipro) a 65°C durante 5 minutos. Posteriormente la disolución fue mezclada nuevamente agregando 5X Reaction Buffer, RiboLock Rnase inhibitor (20U/ul), 10 mM dNTP Mix y RevertAid H Minus M-MuLV Transcriptase. Se llevó al termociclador (Swift™ Minipro) a 65°C durante una hora aproximadamente.

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

El cDNA de las muestras fue sometido a qPCR que consiste en la medición de la expresión relativa de los factores de transcripción IL-1, 10 y 17, NF- κ B, TGF- β , EGF y AFP. Utilizando el termociclador Applied Biosystems StepOne Real-time PCR System y siguiendo el protocolo, se realizó en placa de qPCR (Applied Biosystems Microamp -N8010560), qPCR SybGreen (PCR Master Thermo-Scientific) y los diferentes oligonucleótidos, las muestras fueron diluidas 1:20 en agua libre de nucleasas y se tomó un 1ul para para mezclarlo con master Mix, oligonucleótido Forward y Reverse 50ng/ul de cada gen utilizado y el agua libre de nucleasas. Se cuantifico la expresión relativa con el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ utilizando la actina como gen constitutivo para la normalización.

Medición de la actividad locomotora

La actividad locomotora de las ratas fue evaluada con el equipo Rueda de actividad para experimentación con animales 1800/50 de marca Ugo Basile. Se evaluó el porcentaje de recambio de la distancia recorrida diario con respecto a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

basal. Este experimento tuvo la finalidad de evaluar la actividad física afectada por el aumento de la concentración de amonio causada por la encefalopatía.

Medición de la hipersensibilidad (test respuesta al dolor)

Se midió la hipersensibilidad por la inducción de TAA y los tratamientos usando el algésímetro electrónico Randall-Selitto (IITC 2500 Digital Paw Pressure Meter, IITC Life Science, Woodland Hills, CA). En cada animal, se aplicó una fuerza mecánica creciente en g de presión en la que la punta del dispositivo se aplicaba sobre la porción medial de la superficie plantar/dorsal de la pata derecha hasta que se producía una respuesta de retirar la pata. La fuerza máxima aplicada se limitó a 250 g para evitar daños en la piel. El experimento se realizó en dos repeticiones durante 4 periodos al inicio de la inducción, a 2.5 semanas, a 5 semanas y a 7 semanas.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante t student, ANOVA de una vía y ANOVA de dos vías y la prueba de Tukey de acuerdo con el análisis y se tomó referencia de una n=6 animales por grupos usando el programa de *Prism GraphPad* versión 7. La prueba de normalidad fue D'agostin-pearson y los datos fueron expresados en términos de media y se tomó una $p \leq 0.005$ como grado de significancia.



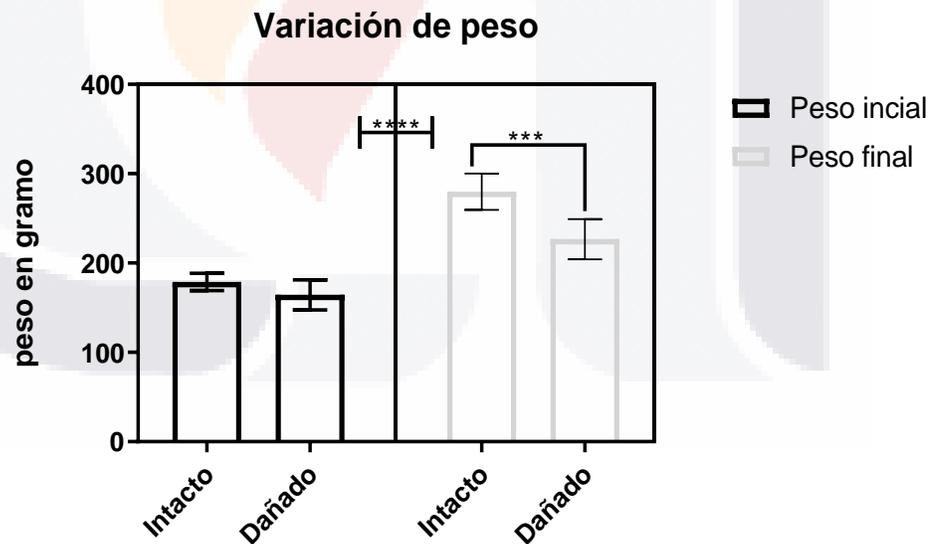
Capítulo 6
RESULTADOS

EVALUACIÓN DEL DAÑO CAUSA POR LA TAA

Tras la inducción con la TAA durante las 5 semanas, Se evaluó diferentes parámetros desde la observación, el suero y el tejido extraído. Se comparó los parámetros con el animal intacto, es decir el grupo de animal que no fue sometido a ningún tratamiento

Evaluación del peso

Se realizó el registro de peso al inicio, es decir ante de inicial la inducción y al final de las 5 semanas de la inducción. Se comparó para ver si hubo alguna variación de peso. En la gráfica 1, se observó que no hubo ninguna variación comparando el peso del grupo intacto con el grupo que se metió al daño con la TAA. Sin embargo, tras las 5 semanas se observó el peso del grupo inducida con TAA tiende a decrementar. La significancia estadística fue realizada media t student y la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov (*P<0,05, **P=0,01, ***P=0,001, ****P<0,0001) y (n≥6 para cada grupo).



Gráfica 6.1.1 Observación de la variación del peso en el grupos intacto y dañado por inducción con TAA al inicio y al final de las 5 semana. Las barras oscuras representan los pesos iniciales, los cuadritos grises presentan los pesos finales de los dos grupos.

Descripción macroscópica y la variación de peso del hígado del grupo dañado contra el grupo intacto.

Se observó cambio muy marcado en el hígado dañado comparando con el intacto. Se pudo observar un ligero aumento de tamaño, presencia de nódulo regenerativo y cambio de coloración a rojo fuerte comparando con el intacto con una arquitectura lisa, sin presencia de nódulo y una coloración marrón color propia del hígado (*Figure 6.1.2*).

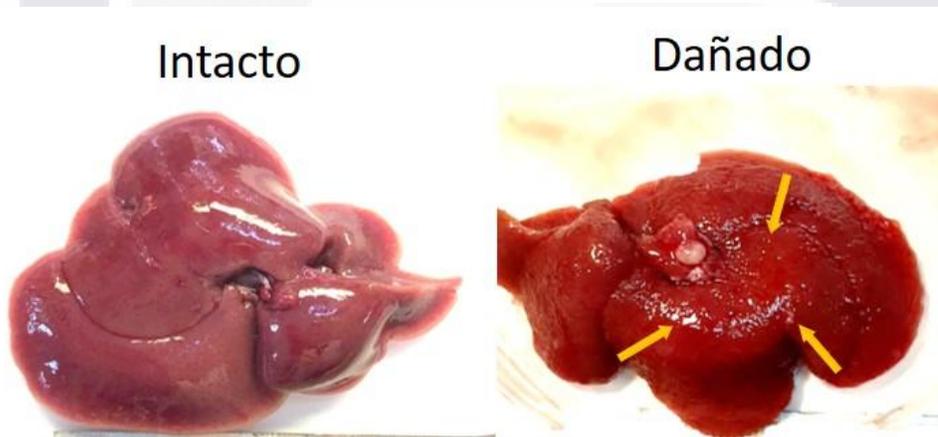
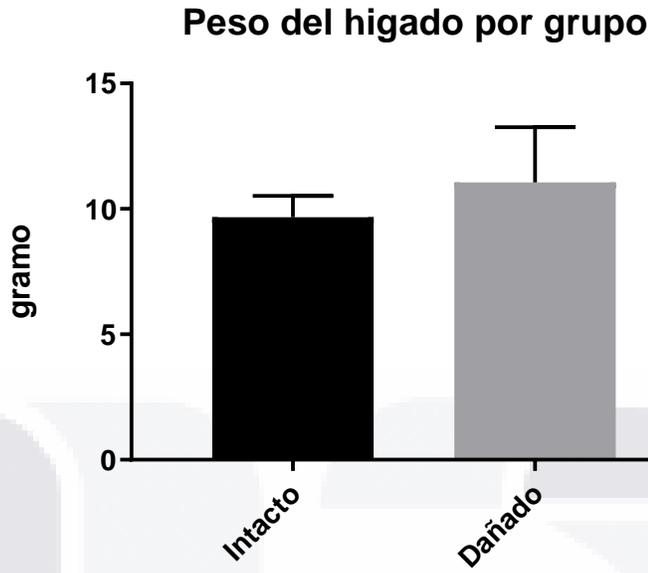


Figure 6.1.2: La vista macroscópica del hígado dañado y el hígado intacto. Se observó presencia de nódulo de regeneración, cambio de coloración y un aumento de peso en los hígados dañado por la TAA.

Evaluación del peso de los hígados

Se evaluó los pesos de los grupos. Comparando el grupo intacto con el daño, se observó una tendencia al aumento en los hígados al ser inducidos con la TAA. sin embargo, no hubo cambios significativos estadísticamente al realizar la prueba de t student (*Grafica 6.1.3*)



Grafica 6.1.3: El promedio de los pesos de hígado dañado e intacto grupos. se observó que el hígado de los grupos dañados tiende a incrementar. Sin embargo, no hubo cambio significativo mediante la t student y la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov ($n \geq 6$ para cada grupo).

Descripción microscópica de la arquitectura hepática en el grupo dañado e intacto.

Se evaluó el daño hepático en diferentes tinciones. En la primera fila, la tinción de hematoxilina-Eosina permite determinar la presencia de las fibras de colágeno en el parénquima hepática. La ilustración de primera fila y columna indica el grupo intacto el cual se refiere a un animal experimental sano. La ilustración de la primera fila y segunda columna hace referencia al grupo dañado al fue inducida con tioacetamida durante 5 semanas (figura 6.1.3).

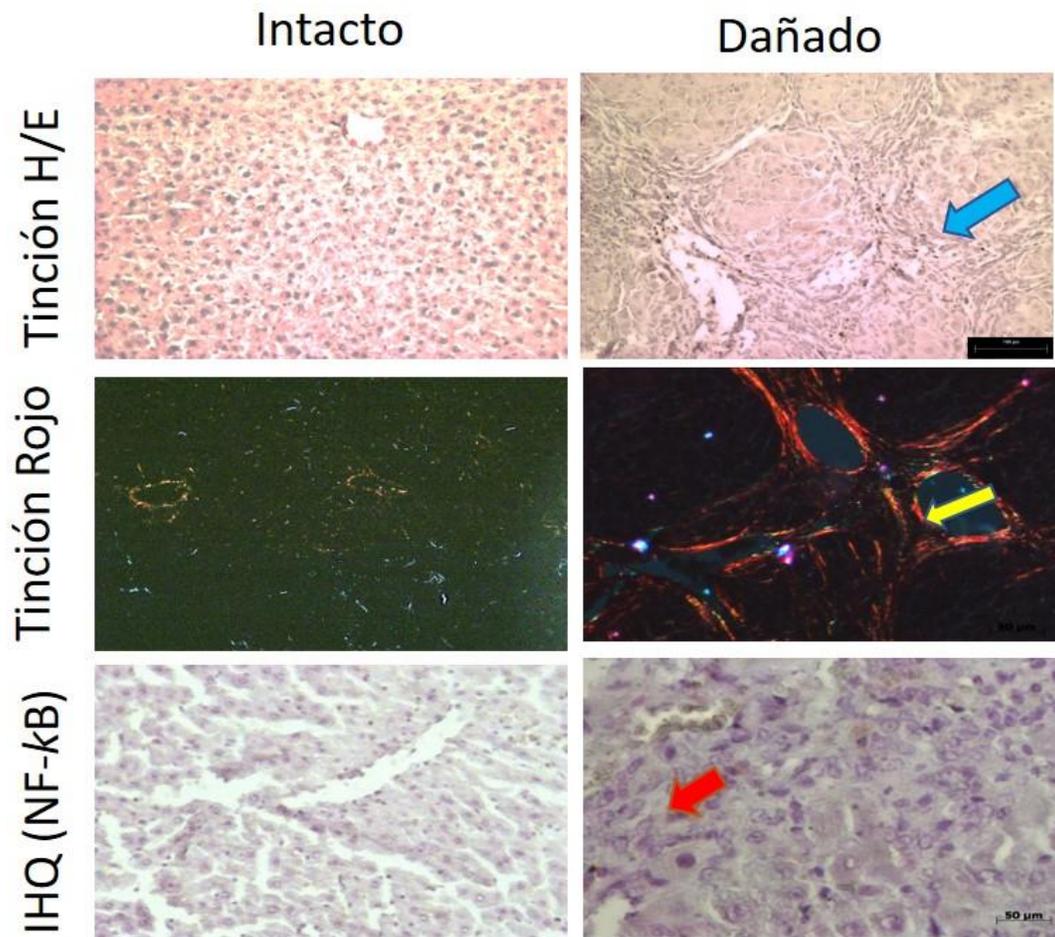
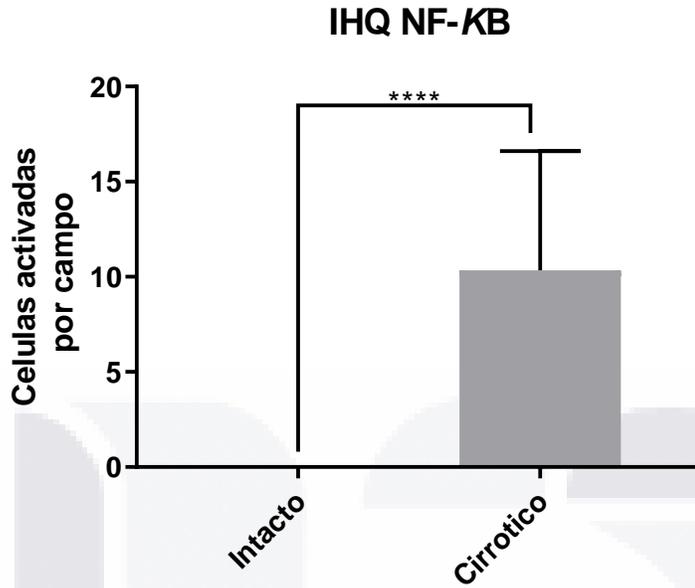


Figura 6.1.3: Evaluación del daño hepática mediante análisis microscópico usando la tinción H/E la primera fila. La tinción Rojo Sirio la segunda fila y en la ultima la inmunohistoquímica con el anticuerpo NF-κB. Se comparó la segunda columna representado por el grupo dañado con la primera columna el intacto.

Quantificación de las células activadas.

Se cuantificó las células activadas por campo. Se observó que hubo mayor activación por la inducción del daño hepáticos con la TAA comparando con el grupo intacto. La significancia estadística fue realizada media t student mediante la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov a una ****P<0,0001) (grafica 6.1.5).



Gráfica 6.1.5.: se observó la inducción de la TAA en los grupos genera activación de la citocina NF-kB con una significancia estadística con una **** $P < 0,0001$) mediante el realizada media t student con la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov a una (grafica 6.1.5).

Evaluación de las fibras de colágenos por Densitometría

Se midieron las bandas de la presencia de fibras tipo I y II mediante una fotografía panorámica. Se observó mayormente la presencia de los dos tipos de fibras colágena al grupo inducido al daño hepático comparando con grupo intacto. La significancia estadística fue realizada media t student mediante la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov a una *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) (Figura 6.1.6.a y grafica 6.1.6.b).

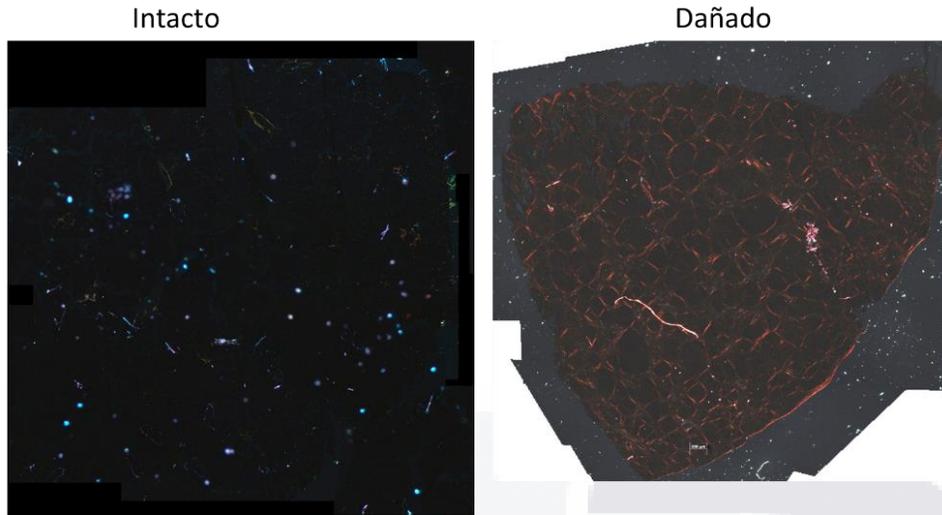
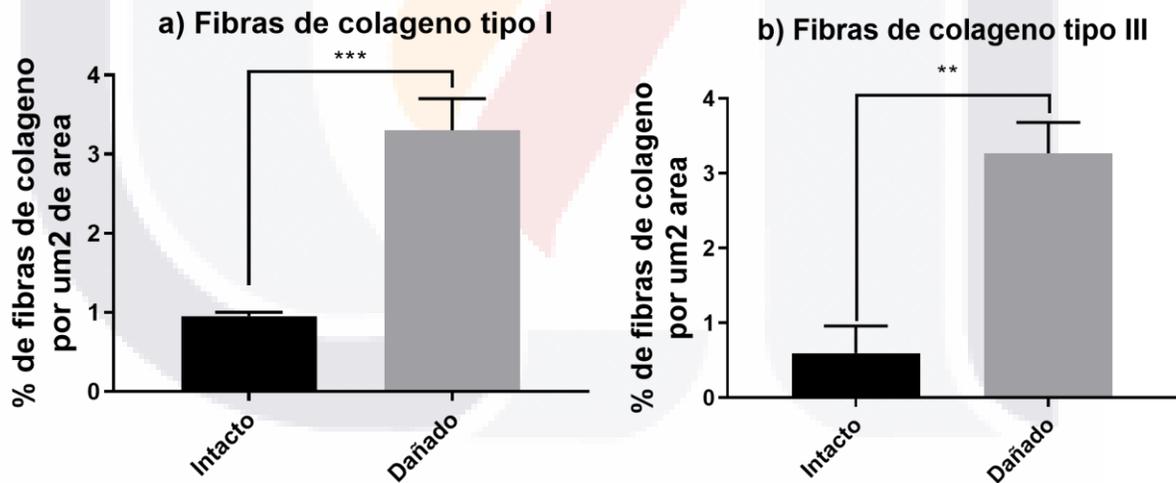


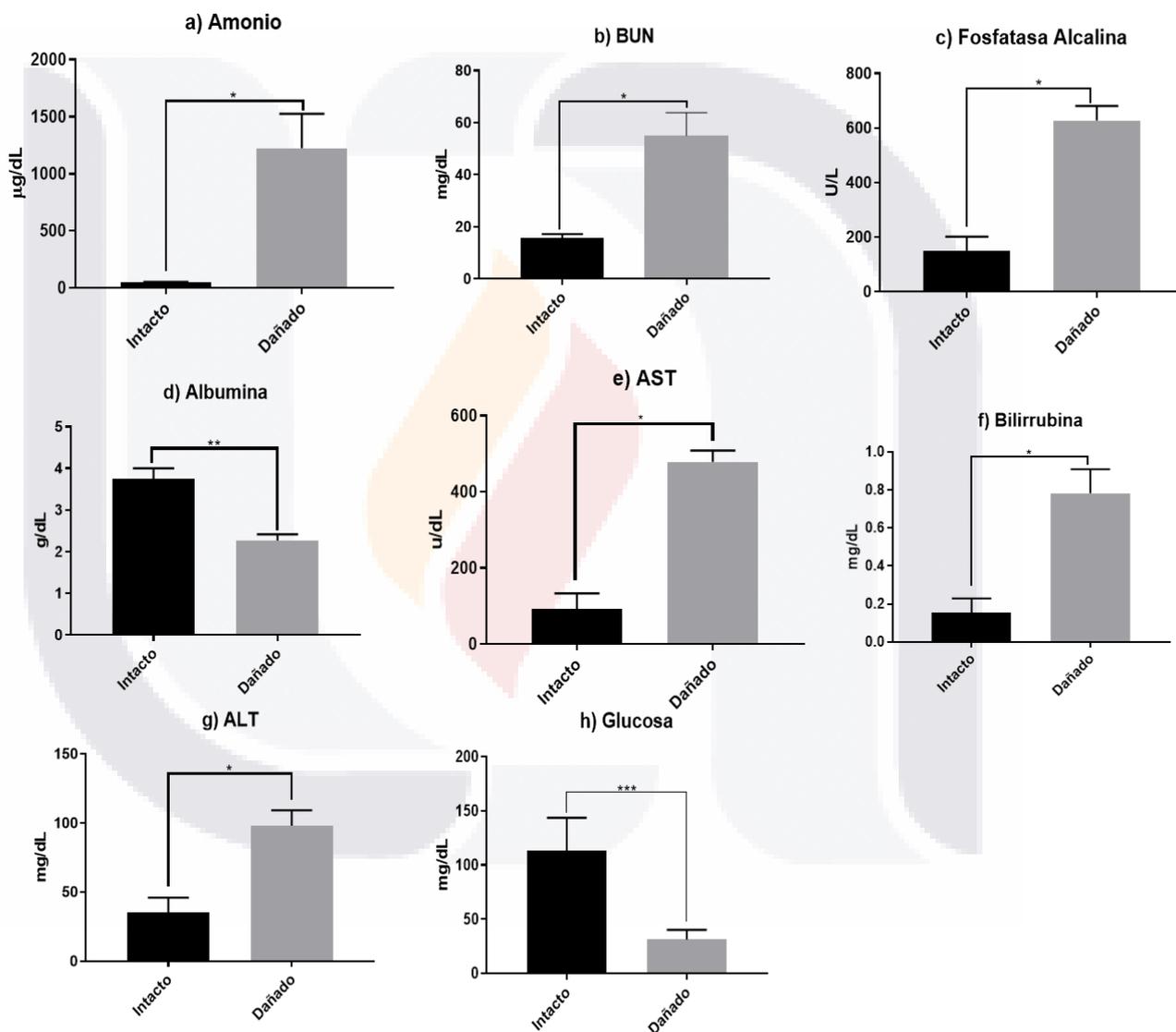
Figura 6.1. 6.a. Observación de la fotografía panorámica de diferentes campos. en el dañado se pudo apreciar presencia de fibras de colágeno tipo 1 en la arquitectura del hígado comparando con el grupo intacto.



Gráfica 6.1.6b. Se observó que hubo diferencias significativas en el porcentaje de las fibras tanto tipo I como tipo III en el grupo inducido con la TAA. El análisis estadístico fue realizado mediante el prueba de t student la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov con una $n \geq 6$ y una $**P=0,01$, $***P<0,001$.

Evaluación de daño hepática mediante el perfil hepática y la medición de glucosa.

Se realizó el análisis del daño hepático mediante el perfil hepática en el cual se midió el amonio, el nitrógeno ureico en la sangre, la fosfatasa Alcalina, la albumina, aspartato aminotransferasa, la bilirrubina y la alanina aminotransferasa y la glucosa en sueros extraído de los animales.



Gráfica 6.1.7. Evaluación de diferentes parámetros de daños en la gráfica a se observó un incremento significativo de amonio en el grupo inducido de daño hepático. En las gráficas a, b, c, e, f, g, en las cuales se analizaron el amonio, el nitrógeno ureico en la

sangre, la fosfatasa Alcalina, la albumina, aspartato aminotransferasa, la bilirrubina y la alanina aminotransferasa así sucesivamente. Se observó que incrementos significativos por los daños causados por la TAA. Por otro lado, en las gráficas d y h, en las cuales se evaluó la albúmina y la glucosa. Se observó un descenso por el daño hepático. La significancia estadística fue realizada media t student y la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov (* $P < 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) y ($n \geq 6$ para cada grupo).

Evaluación de marcadores moleculares

Se evaluó diferentes marcadores moleculares para corroborar el daño por la tamsulosina. Los marcadores evaluados fueron los proinflamatorios (IL-1, IL-17 y NF- κ B), antiinflamatorios (IL-10, TGF- β), profibrogénico (TGF- β , colágeno tipo I), de proliferación (EGF) y marcadores tumorales (AFP). Se observó alteraciones en todos los marcadores en el grupo dañado por la inducción con la TAA.

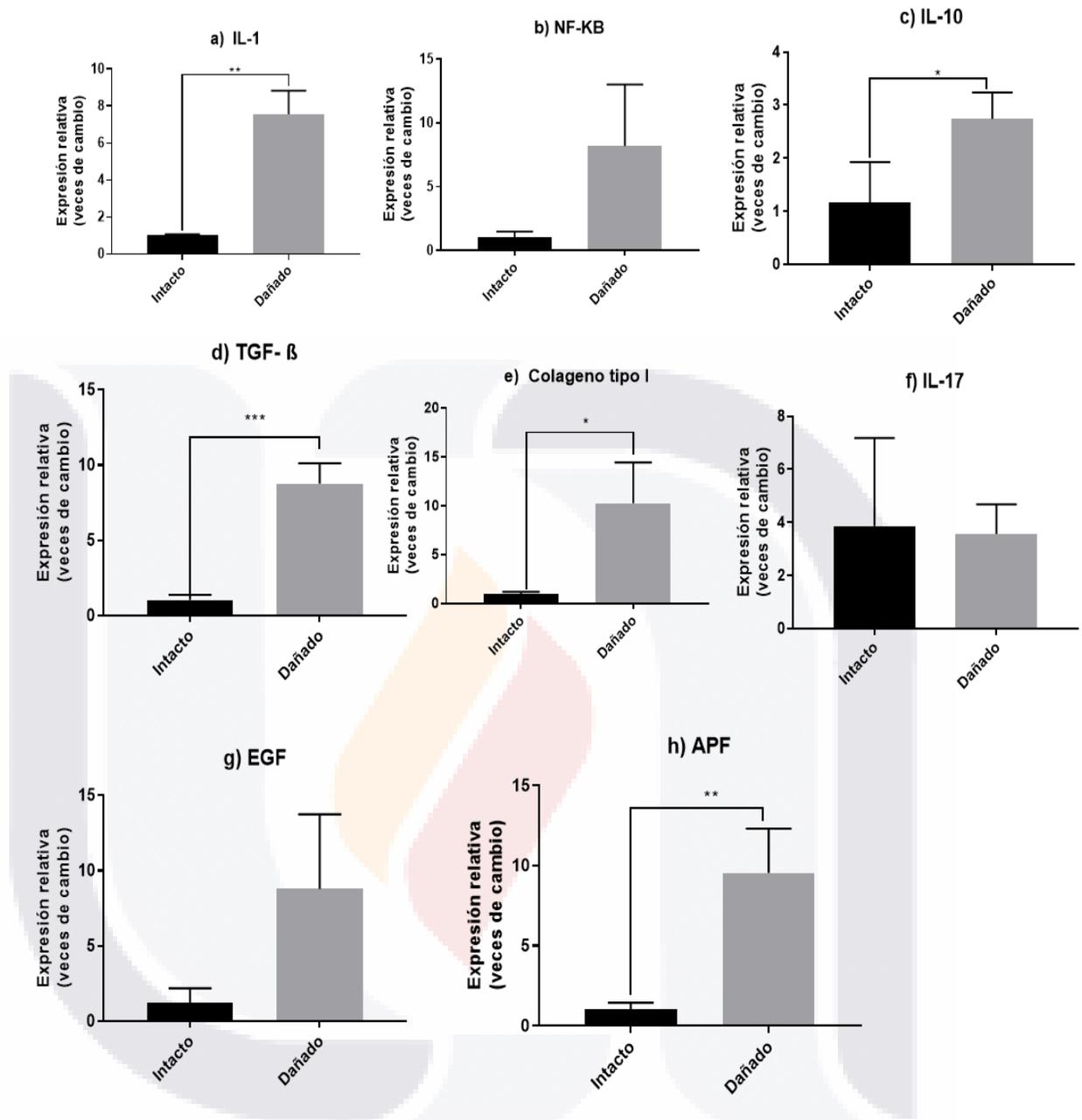
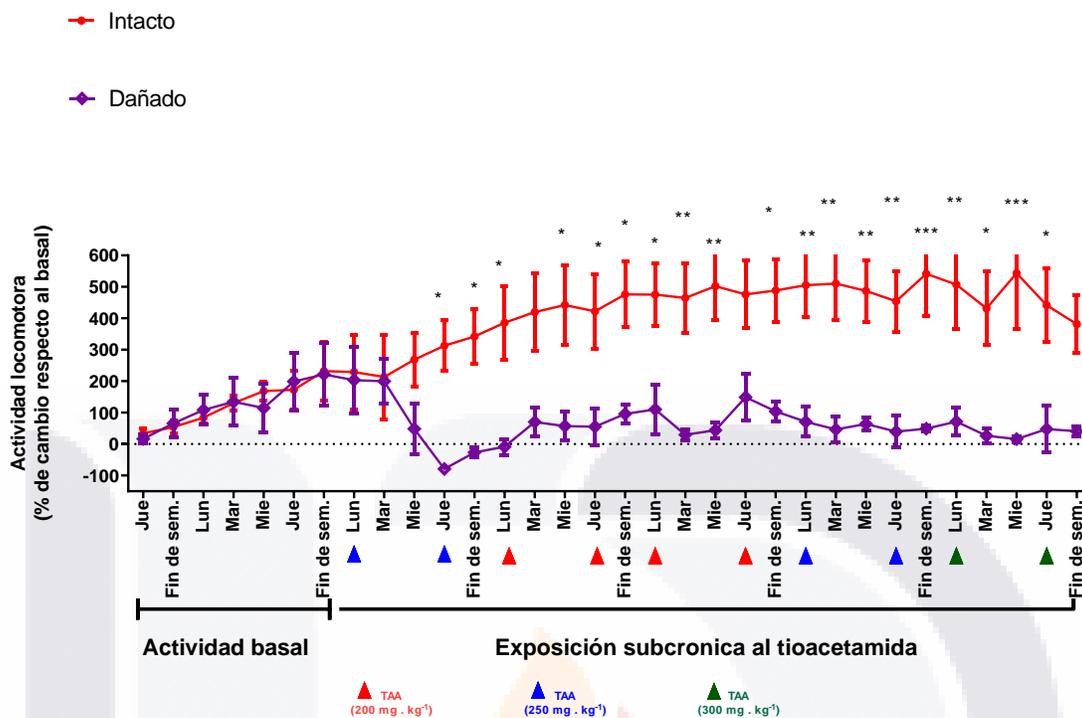


Figura 6.1.8. observación de las expresiones de marcadores moleculares. Se pudo ver que las citocinas proinflamatorias representadas por las gráficas a y b mostró una tendencia de incremento comparando con el control. A diferencia del NF-kB, la IL-1 presentó diferencias significativas es decir una mayor expresión. Por otro lado, la IL-17 representado por la gráfica f, citocina proinflamatoria que expresa mayormente en eventos crónicos, mostró una tendencia de reducción en el grupo inducido de daño por la TAA. Las citocinas antiinflamatorias IL-10 el más potente y el TGF-β menos potente, es conocido como citocina profibrogénica. Las dos mostraron incremento significativo en

el grupo dañado comparando con el grupo intacto. La proteína fibrilar colágena tipo I representa por la gráfica e incrementó significativo por la inducción con la TAA. El factor de crecimiento epidérmico, la gráfica g, mostro tendencia de incremento, pero no hubo significancia estadística. Por último, la alfafetoproteína representada por la gráfica f, es el marcador tumoral que se expresa en el proceso de proliferación tumoral de daño hepático, mostró elevación significativa en el grupo de daño comparando con el intacto. Cabe mencionar que hubo alteraciones en mayoría de los marcadores moleculares analizados.

Evaluación del daño sobre la actividad locomotora por la TAA

Se evaluó la actividad física por grupo de animales mediante la distancia recorrida y la medición del porcentaje de cambio respectando a la actividad basal. La línea roja representa el grupo de animal sano, es decir, el grupo que no fue sometido a ninguna daño ni tratamiento. La línea morada, es grupo de rata que fue sometido al daño hepática con la TAA durante las 5 semanas a una dosis creciente bisemanal. Se pudo apreciar que el porcentaje de cambio de la actividad respecto la basal se descende significativamente desde el segundo día del periodo de la inducción de daño con la TAA (gráfica 6.1.9.).

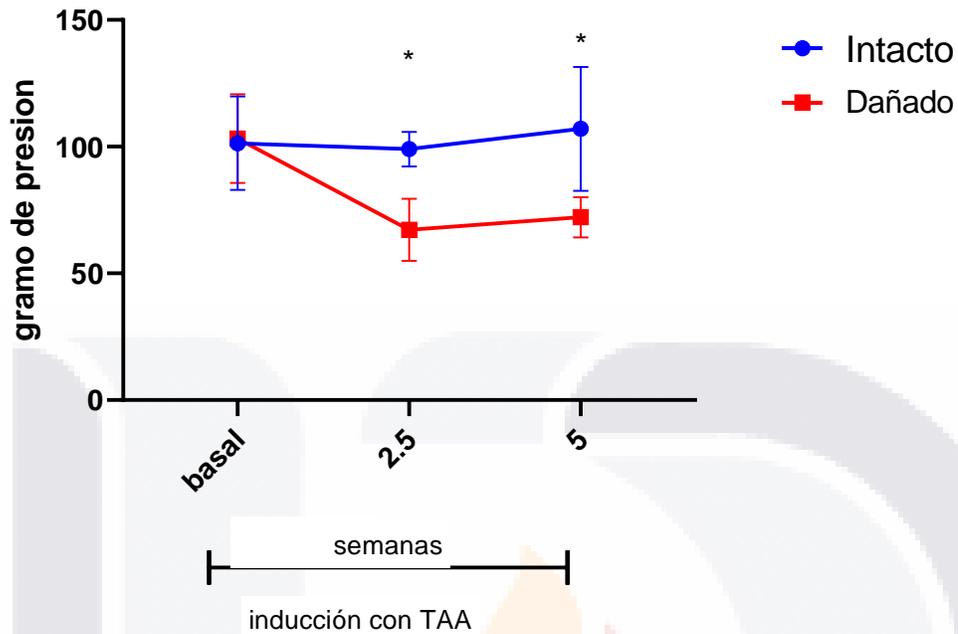


Gráfica 6.1.9. Evaluación de la actividad locomotora por el daño hepático. Se pudo observar que, durante el periodo basal, la actividad de los dos grupos tiende a incrementar. Sin embargo, día después de la aplicación de la primera dosis de TAA hasta el final de la inducción, la actividad decremó con significancia estadística.

Evaluación de la hipersensibilidad por la inducción el daño hepático.

La evaluación de la hipersensibilidad consiste en la medición del umbral al dolor del grupo inducido de daño hepático respecto al grupo intacto. Se pudo apreciar que los animales que fueron sometidos a la inducción de daños (la línea roja) mostro a las 2.5 y 5 semanas, menor umbral al dolor es decir mayor sensibilidad comparando con el grupo intacto (línea azul) (grafica 6.1.10).

Evaluación del Umbral al dolor



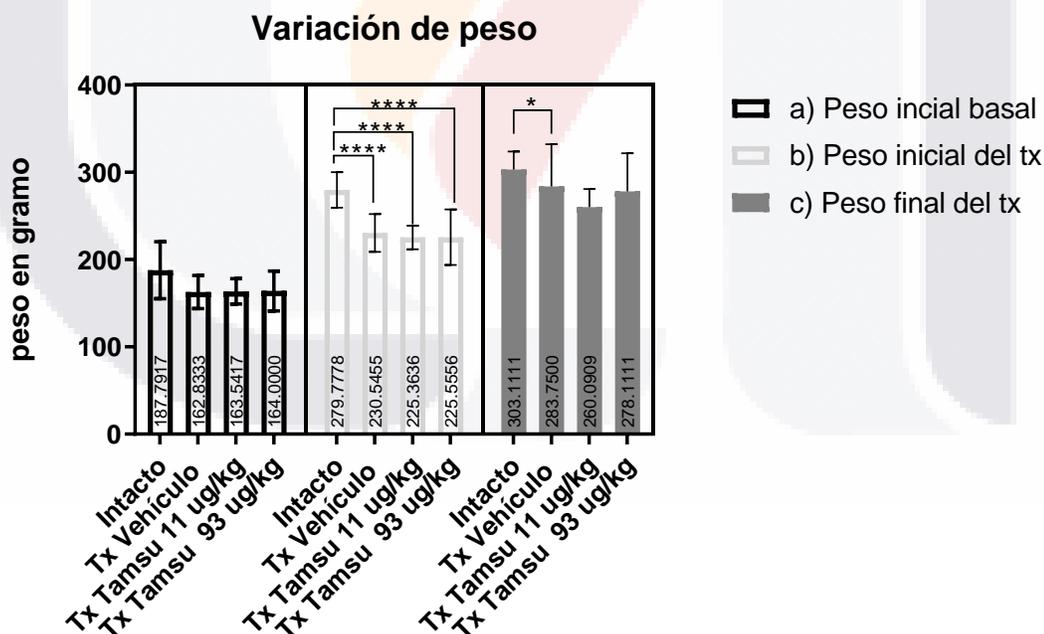
Gráfica 6.1.10. Evaluación del umbral al dolor. Se observó que la inducción del daño hepático (línea roja) produce una disminución significativa del umbral comparando con el grupo intacto (línea azul). la medición fue realizada antes de la inducción, a la semana 2.5 y 5.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TAMSULOSINA SOBRE LA REGRESIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO.

Se evaluó el efecto de la tamsulosina sobre la regresión del daño hepático tras la inducción con la TAA. Se compararon diferentes parámetros con la regresión endógena es decir los animales que fueron administrados el agua durante las dos semanas de tratamiento con la tamsulosina. La evaluación arrojó los siguientes resultados:

Evaluación del peso

Se evaluó el efecto del tratamiento sobre la recuperación de peso en el grupo tratado con la tamsulosina y compararlo con el grupo intacto y el vehículo. Para la evaluación los pesos fueron registrados en tres periodos: antes de la inducción con la TAA (barra blanca y negra), después de la inducción con la TAA o antes del inicio de los tratamientos (barras grises y blancas) y al final de los tratamientos (barras grises). La gráfica gris no mostro ningún cambio significativo comparando con los diferentes grupos tratado. Por otro lado, después de las 5 semanas de inducción con la TAA, se apreció alteración significativa en los tres grupos inducidos. Tras la administración diaria durante 2 semanas de los tratamientos tamsulosina 11 y 93 µg/kg y el vehículo. Se observó una recuperación de peso en los 3 grupos tratados comparando con el grupo intacto, siendo el grupo vehículos con mayor aumento significativo. La significancia estadística fue realizada media mediante ANOVA de dos vías y la prueba de Kolmogorov-Smirnov (*P<0,05, **P=0,01, ***P=0,001, ****P<0,0001) y (n≥6 para cada grupo).



Gráfica 6.2.1. Variación de los grupos de animales experimentales durante 3 periodo del experimento: a) al inicio de la inducción con TAA; b) al finalizar las 5 semanas de la inducción con la TAA o antes de iniciar los tratamientos con las dos dosis de Tamsulosina

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y el vehículo; c) al terminar las 2 semanas de tratamiento. Se pudo observar que en la gráfica a no hubo ningún cambio. Los pesos se mantienen en el mismo rango. Por otro lado, en la gráfica b, los animales que fueron inducidos con la TAA mostraron un decremento de peso significativo. Tras la suspensión de la exposición de la TAA y la aplicación de los tratamientos Tamsulosina 11 µg/kg, Tamsulosina 93 µg/kg y el vehículo de 0.5 ml de agua muestran una tendencia creciente comparando con el grupo intacto después de las dos semanas. El grupo de la tamsulosina de 0.011mg/kg presentó menor repuesta. La significancia estadística fue realizada mediante ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (* $P < 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) y ($n = 6$ para cada grupo).

Observación macroscópica y el peso del hígado tras las 2 semanas de tratamiento.

Los hígados de cada grupo fueron extraídos, observados, pesados. La figura a representa el hígado intacto con una coloración marrón color propia del hígado y una arquitectura lisa. Los grupos que fueron tratados se pudo apreciar que en la figura b tratado con el agua el decir el vehículo presencia de nódulo regenerativo y cambio de coloración a más oscuro comparando con el grupo intacto. Por otro lado, los grupos tratados tanto a dosis de 11 y 93 µg/kg de peso mostraron cierta recuperación caracterizada por la coloración y la reducción de nódulo regenerativo en la arquitectura del hígado en comparación con el intacto y el vehículo. Siendo la dosis de 93 µg/kg de pesos que mostraron una mejor arquitectura comparando con el grupo intacto (Figure 6.2.1). En la evaluación de peso se observó una tendencia al aumento comparando con el grupo intacto y los dos grupos tratados con la tamsulosina. Sin embargo, no hubo cambios significativos estadísticos al realizar la ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (Gráfica 6.2.2).

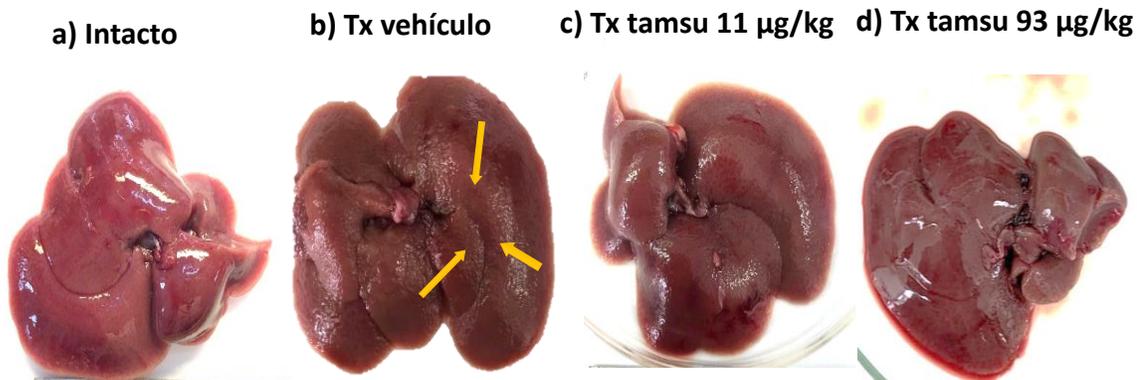
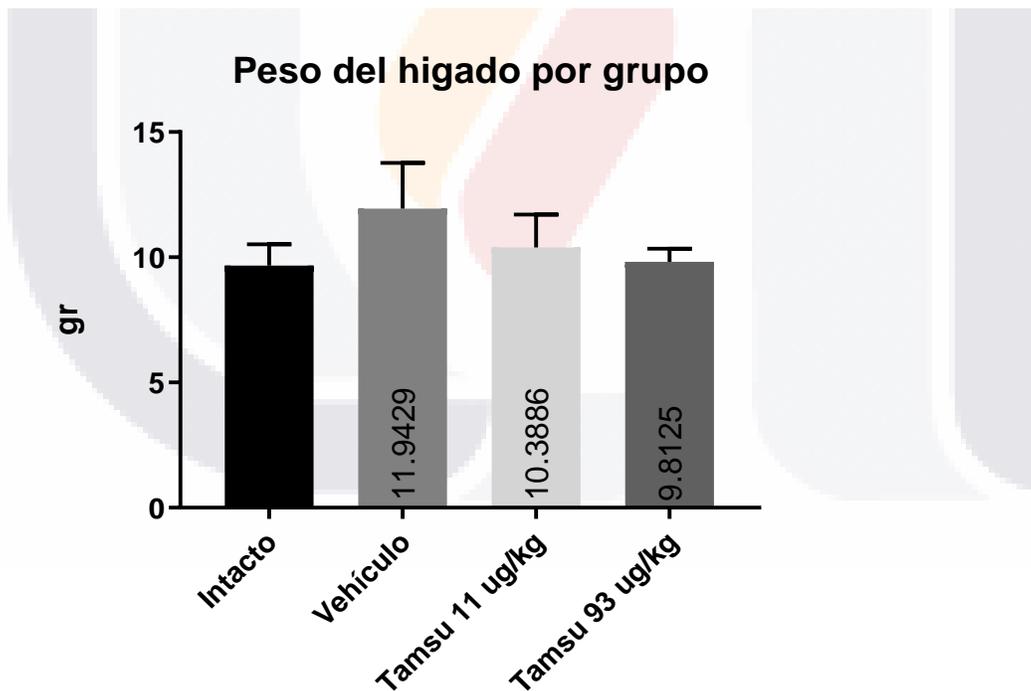


Figura 6.2.1. Observación macroscópica de los hígados extraídos por grupos. En la figura b, son los animales que fueron tratados con agua durante las mismas semanas que los dos grupos tratados con la Tamsu. Se pudo observar en la figura b, la presencia de nódulo de regeneración, cambio de coloración comparando con la figura del intacto. En las figuras c y d, que fueron tratados con Tamsu 11 y 93, mostró reducción de los nódulos regenerativo en la arquitectura y una tendencia en la recuperación de la coloración del hígado. Siendo los tratados con la tamsulosina a la dosis de 93 µg/kg el grupo que mostró mejor recuperación.



Gráfica 6.2.2. Evaluación del peso por grupo. Se observo una tendencia al incrementar al grupo que tratado con la dosis de 0.5 ml de agua durante las mismas semanas que los grupos tratados con la tamsulosina. Los tratados con la tamsulosina tuvieron un

promedio de peso similar al grupo intacto. En ninguno de los grupos hubo cambios estadísticos significativos al realizar la ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple.

Evaluación microscópica de la arquitectura hepática de las ratas tratadas.

Se evaluó la recuperación del daño hepático mediante la tinción H/E (fila 1), la tinción Rojo Sirio (fila 2) y la inmunohistoquímica (NF-kB) (fila 3) tras las 2 semanas de tratamiento con las dos dosis de la tamsulosina y el vehículo. La tinción H/E permitió determinar la presencia de las fibras de colágeno en el parénquima hepática. La figura 1a indica la arquitectura hepática del grupo intacto refiriendo a un animal experimental sano, no se observó presencia de fibras de colágeno. Por otro lado, en la figura 1b, es el vehículo, el grupo que fue tratado el agua durante las 2 semanas el mismo tiempo que la aplicación de las dos dosis de la tamsulosina, se observó una gran cantidad de fibras de colágeno en la arquitectura del hígado. Comparando los tratamientos (figura 1c y 1d) de tamsulosina con la aplicación del vehículo y vehículo, se observó una reducción de fibras de colágeno en la arquitectura hepática. La arquitectura de los hígados tratado con la tamsulosina tiende a parecer con el grupo intacto. Las figuras 2a, 2b, 2c y 2d hacen referencia a la tinción de Rojo Siro en la cual se evaluó los tipos de fibras de colágeno (rojo tipo I y verde tipo III) presente en la arquitectura hepática. En figura 2a, representada por el grupo intacto no se observó presencia de fibras de colágeno. En la figura 2 b, el vehículo, se observó un incremento de fibras tanto tipo I como tipo III. En figura 2c y 2d, correspondiente al tratamiento con las 2 dosis de la tamsulosina (11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$), los dos tipos de fibras de colágenos fueron reducidos. Las figuras 3a, 3b, 3c y 3d corresponden la IHQ (NF-kB) el cual consiste en evaluar la inflamación por diferentes procesos como el estrés oxidativo, daño celular entre otros. En este análisis el intacto no presentó activación. Sin embargo, tanto los tratados con la tamsulosina (3c y 3d) como con el 0.5 ml de agua (3b) mostró activaciones. Se cuantificó las células activadas por diferentes campos a los 4 grupos experimentales se observó una mayor activación el grupo que fue tratado con el agua y una reducción en los grupos

tratados con la tamsulosina a 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (gráfica 6.2.4). en la figura 0. todo lo explicado anteriormente y las imágenes fueron tomado a un aumento de 10x.



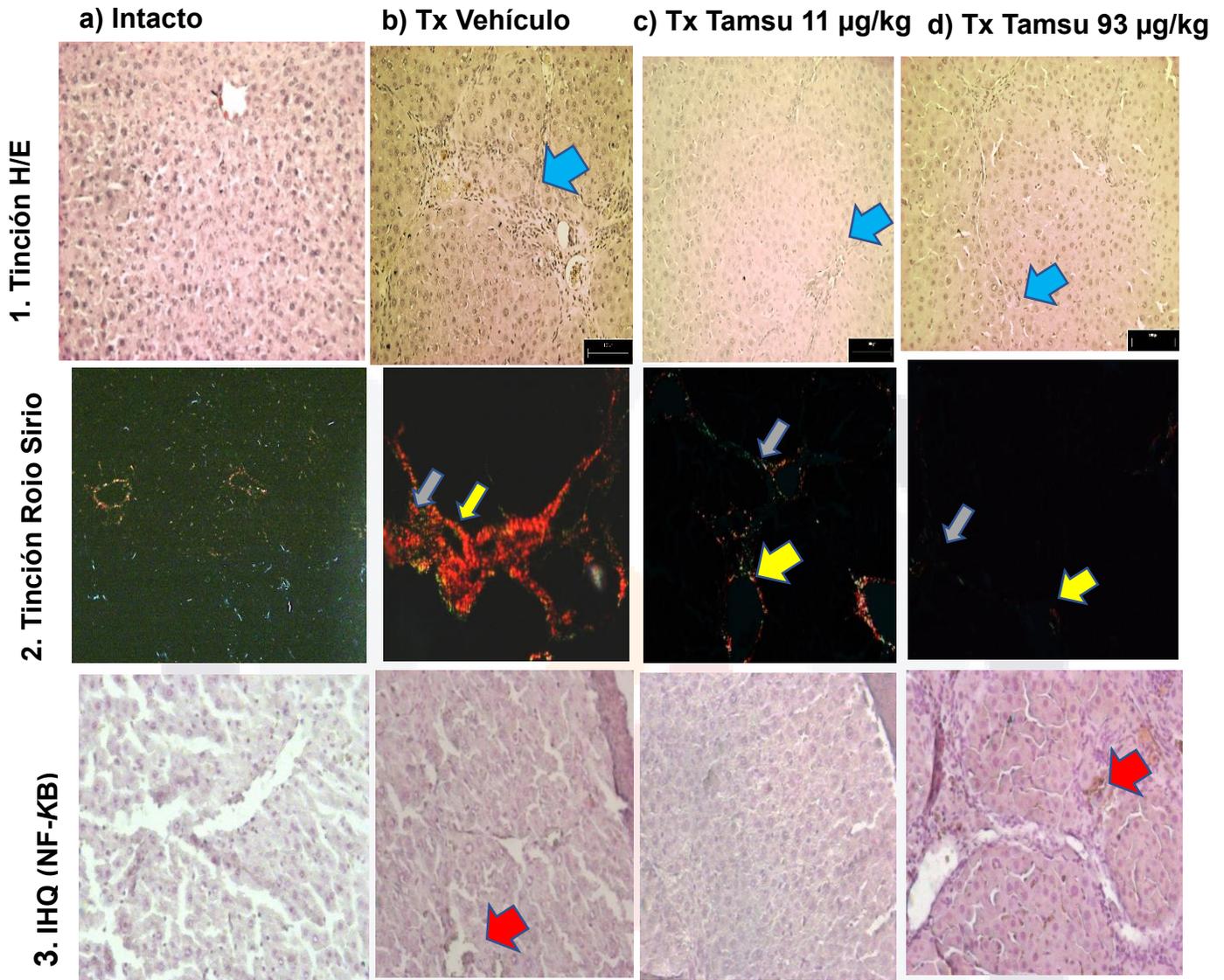
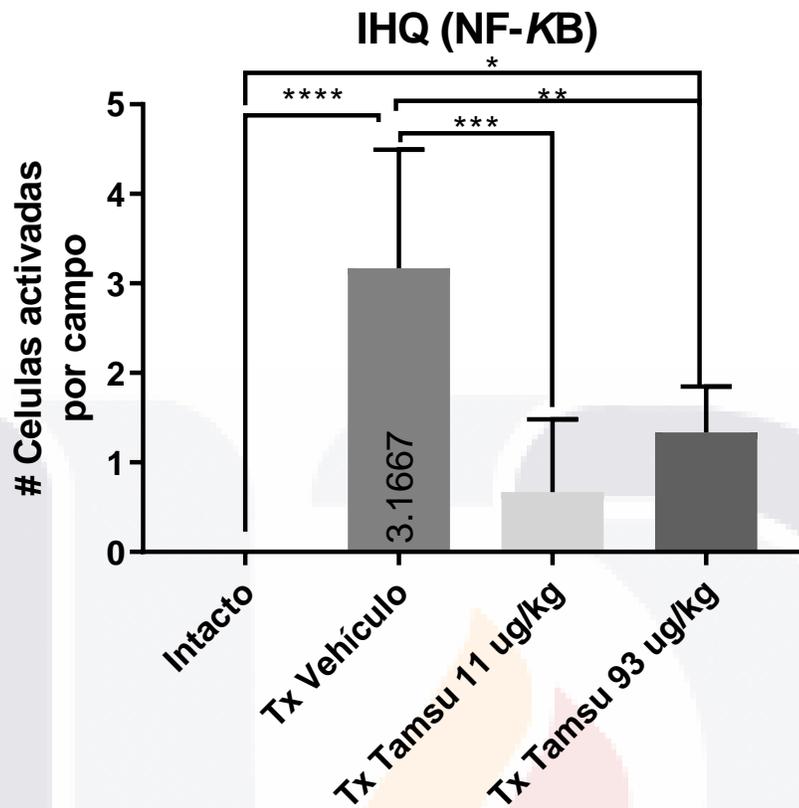


Figura 6.2.2. evaluación microscópica de la arquitectura hepática mediante diferentes tinciones. En las figuras 1^a, 1b, 1c y 1d se evaluó la disminución de las fibras de colágenos tras las dos semanas de tratamiento. Se pudo observar que la tamsulosina tanto a 11 como 93 µg/kg figura 1c y 1d sucesivamente, es capaz de reducir las fibras de colágeno en los animales dañados. La administración de agua durante las dos semanas mostró presencia de fibras. En la fila 2 en la cual se evaluó la presencia del tipo de fibras. La figura 2b mostró el mismo comportamiento, incremento de fibras tipo I y tipo III. Por otro lado, en los tratados con la tamsulosina (2c y 2d) las fibras se redujeron (grafica 6.2.5). Las figuras 3^a, 3b, 3c y 3d representan la inmunohistoquímica usando el marcador NF-KB para evaluar la posible recuperación del proceso inflamatoria por la tamsulosina. Las flechas rojas indican la presencia de la activación del marcador. Se observó que la administración de la tamsulosina redujo significativamente el proceso inflamatorio. También se observó que la dosis de 11 µg/kg mostro una menor activación es decir mejor resultado comparado con el grupo intacto y el grupo tratado con el vehículo. Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 10x y se realizó la cuantificación de las células activadas por campo observados de cada grupo (grafica 6.2.5). La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación multiple (*P<0,05, **P=0,01, ***P=0,001, ****P<0,0001) y (n=6 para cada grupo).



Gráfica 6.2.3. cuantificación de las células activadas por campo. Se pudo observar que hubo mayor activación de las células en el grupo tratado con el vehículo. Los grupos que fueron tratados con la tamsulosina redujeron significativamente comparando con el grupo vehículo. En el caso del grupo tratado con la tamsulosina a 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no hubo cambio significativo comparando con el intacto. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (* $P < 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) y ($n = 6$ para cada grupo).

Cuantificación de las fibras de colágenos por densitometría en los grupos tratados

Las imágenes fueron tomada a un aumento de 10x usando la luz polarizada. Los campos de cada animal fueron procesados en el programa de fija para obtener una fotografía panorámica. las estructuras rojas y verdes indican la presencia de las fibras de colágeno presente en la arquitectura hepática. Se pudo observar que hubo mayor presencia de fibras en el grupo vehículo tratado con agua. En los grupos tratados con la tamsulosina hubo una reducción significativa comparando con el grupo intacto y el vehículo.

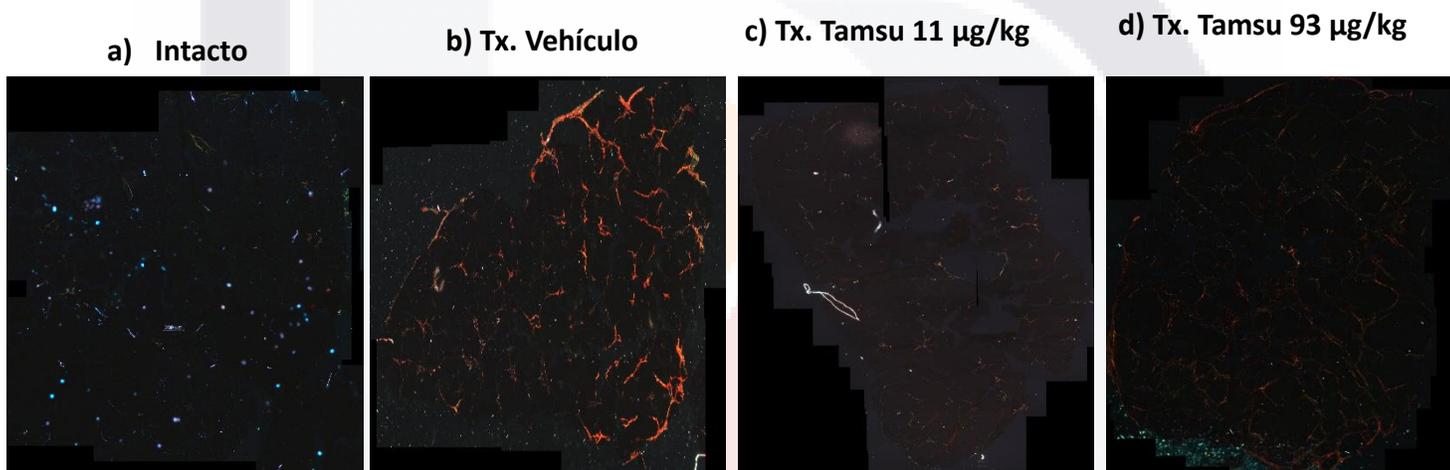
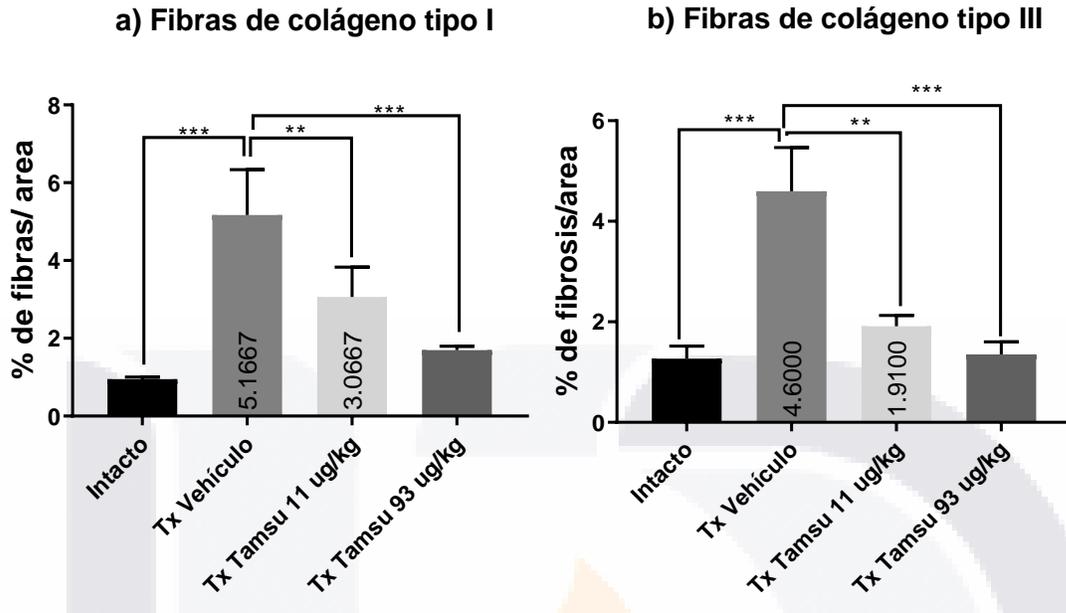


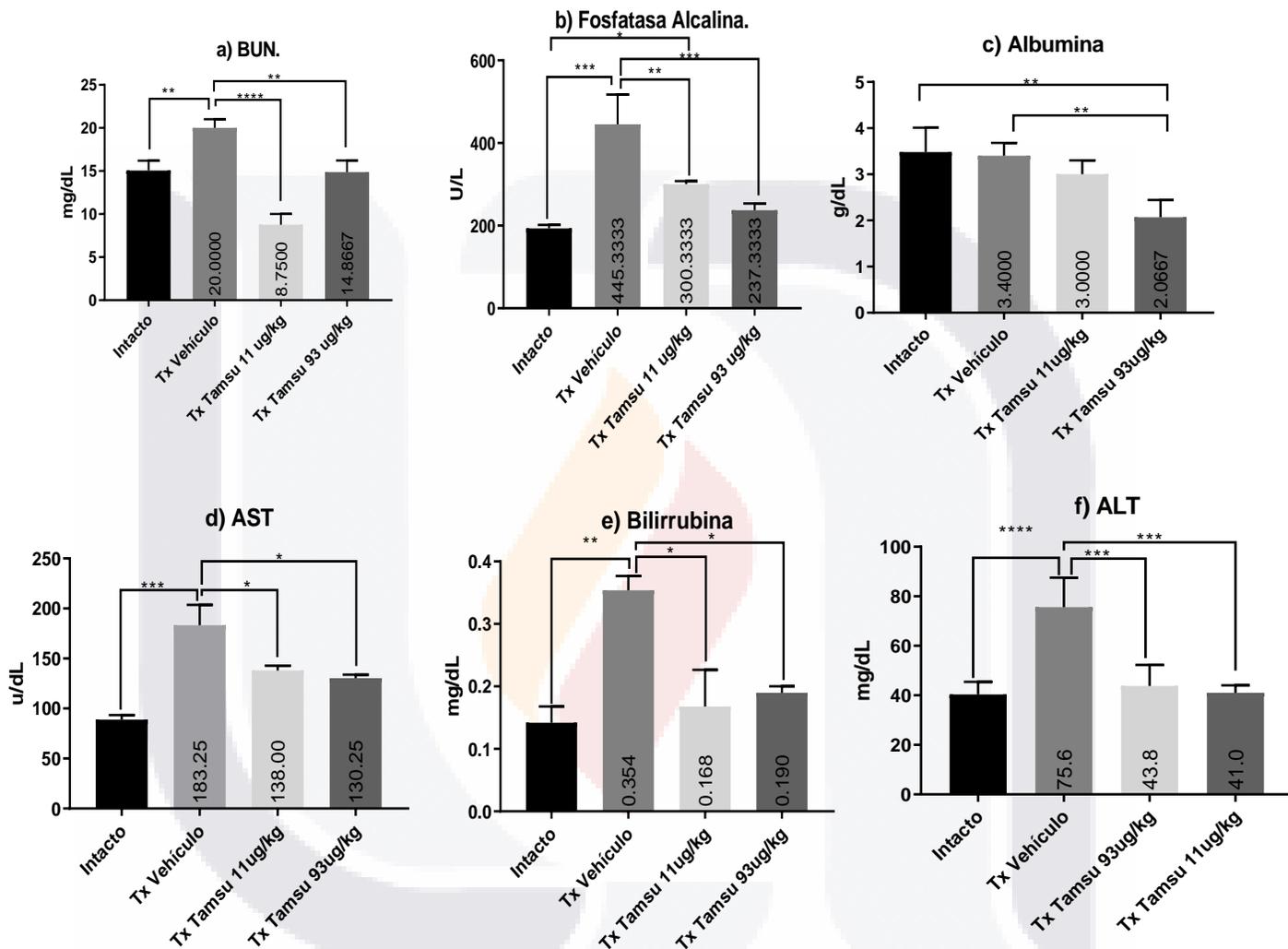
Figura 6.2.3. Fotografía panorámica de las muestras procesadas con tinción rojo Sirio y tomada en microscopio con luz polarizada y analizada en Fiji. Tal como se mencionó anteriormente, las estructuras rojas indican las fibras de colágeno tipo I y las verdes las fibras tipo III presente en la arquitectura del hígado. Se observó que el grupo de tratamiento con el vehículo presentó mayor cantidad de fibras. En los tratamientos con la tamsulosina hubo una reducción de fibras.

Cuantificación de las fibras por densitometría



Gráfica 6.2.4. cuantificación de las fibras por densitometría. La grafica a representa la presencia de las fibras de colágeno tipo I y la gráfica b, la presencia de fibras de colágeno tipo III. Las dos graficas tuvieron el mismo comportamiento. El grupo vehículo mostró aumento de las fibras tipo I y tipo III mientras que los tratados con la tamsulosina redujeron la cantidad de las fibras tanto tipo I como tipo III. La dosis de 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tuvo mayor reducción en el grupo tratado con la tamsulosina de 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (* $P < 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) y ($n = 6$ para cada grupo).

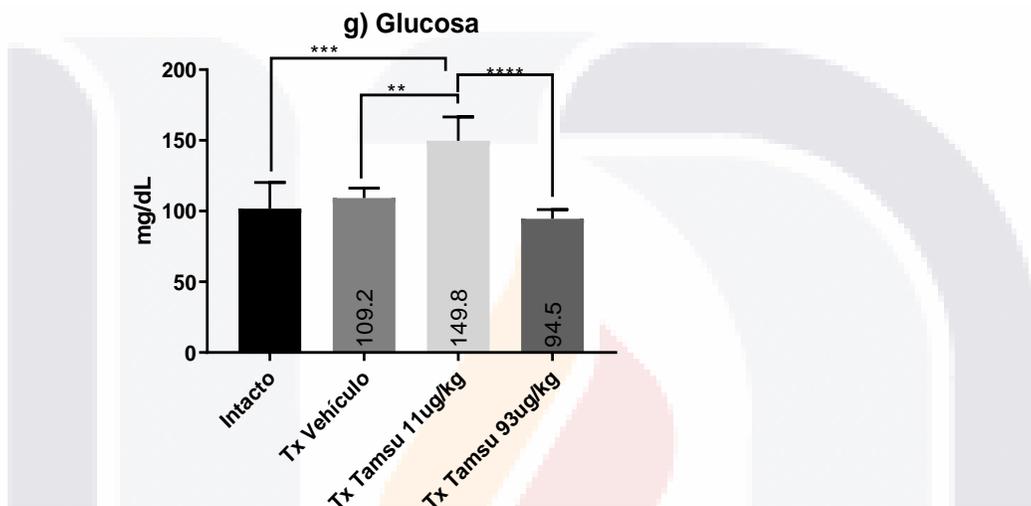
Se evaluó la recuperación de daño hepática tras las dos semanas de tratamiento mediante el perfil hepática en el cual se midió el nitrógeno ureico en la sangre, la fosfatasa Alcalina, la albumina, aspartato aminotransferasa, la bilirrubina y la alanina aminotransferasa en sueros extraído de los animales experimentales.



Gráfica 6.2.5. evaluación de los marcadores de daño hepático mediante el perfil hepático en suero. En la gráfica a se evaluó el nitrógeno ureico. Se observó incremento significativo en el grupo tratado el vehículo y los grupos tratados con las dos dosis de la tamsulosina mostró reducción significativa lo que indica que la tamsulosina es capaz de reducir la hiperamonemia. La grafica b indica la evaluación de la fosfatasa alcalina, se observó un incremento significativo comparando con la dos dosis de la tamsulosina. En la gráfica c, se observó que la administración de la tamsulosina produce hipoalbuminemia. El vehículo mostró mejor repuesta comparando con el grupo intacto. En la gráfica d, se evaluó el aspartato aminotransferasa, se observó un incremento significativo en el grupo tratado con la tamsulosina. Y los dos grupos tratados con la tamsulosina mostraron tendencia al decremento significativo comparado con el grupo intacto. En la gráfica e, se observó que la bilirrubina se aumentó en el grupo tratado con el vehículo y los tratamientos con la tamsulosina mostro reducción significativa comparando con el grupo intacto. Finalmente, en la gráfica f, se evaluó la alanina aminotransferasa. Se observó incremento en el grupo tratado con el vehículo y una reducción significativa en los tratados con la tamsulosina. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación multiple (*P<0,05, **P=0,01, ***P=0,001, ****P<0,0001) y (n=6 para cada grupo).

Evaluación de la glucosa

Se evaluó la glucosa en sueros extraído de los animales al final de cada tratamiento. Se observó que la tamsulosina a 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y la aplicación del vehículo normalizó la glucosa en la sangre. Es decir estos dos tratamiento son capaz de recuperar el daño de los hepatocitos tras el daño hepatico (gráfica 6.2.7).

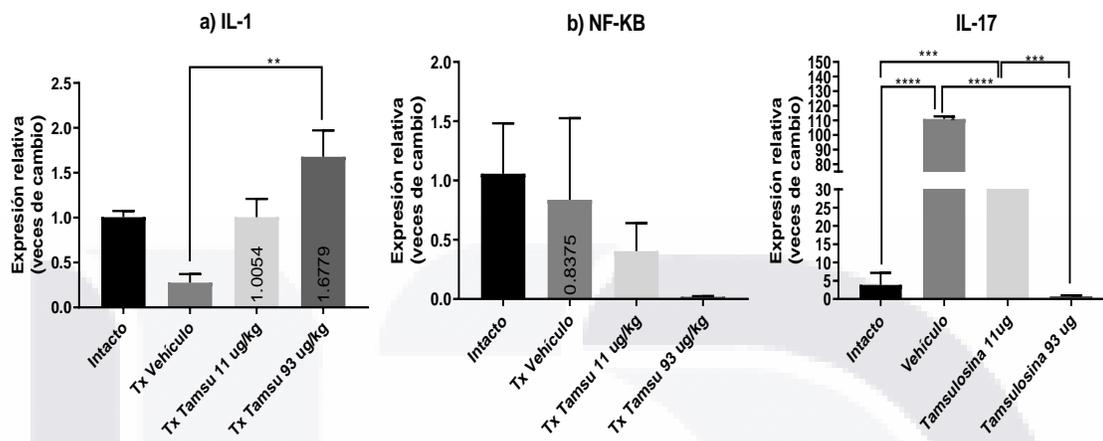


Gráfica 6.2.6. Evaluación de la recuperación de la glucosa en sangre tras las dos semanas de tratamiento. Se observó que la tamsulosina a 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y la aplicación del vehículo normalizaron la glucosa en la sangre. Es decir, estos dos tratamientos son capaz de recuperar el daño de los hepatocitos tras el daño hepático. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (* $P < 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) y ($n = 6$ para cada grupo).

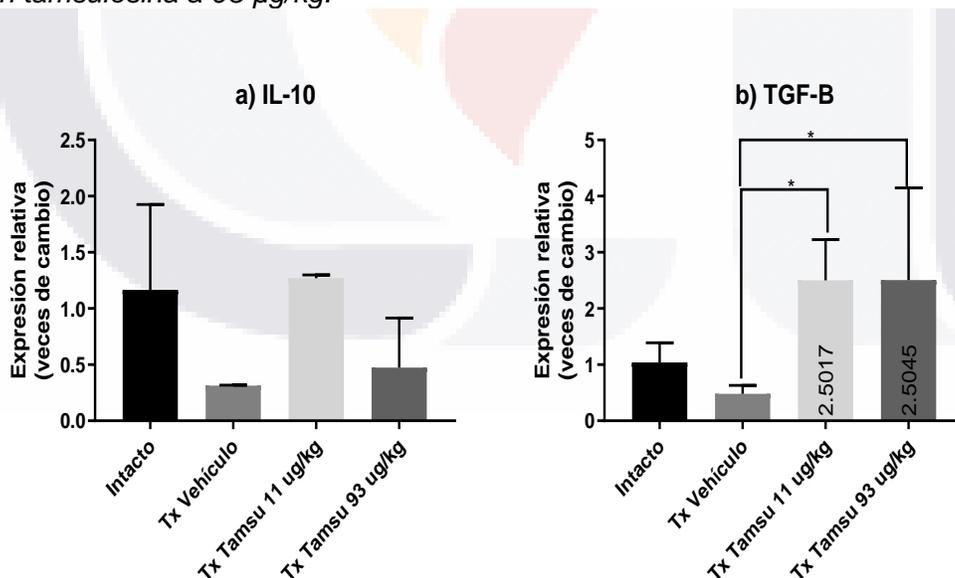
Evaluación de los marcadores moleculares

Se evaluó diferentes marcadores moleculares para comprobar la recuperación del daño por la tamsulosina. Los marcadores evaluados fueron los proinflamatorios (IL-1, IL-17 y NF- κB), antiinflamatorios (IL-10, TGF- β), profibrogénico (TGF- β , colágeno tipo I), de proliferación (EGF) y marcadores tumorales (AFP). La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (* $P < 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) y ($n = 6$ para cada grupo) (gráfica 6.2.7).

Marcadores Proinflamatoria

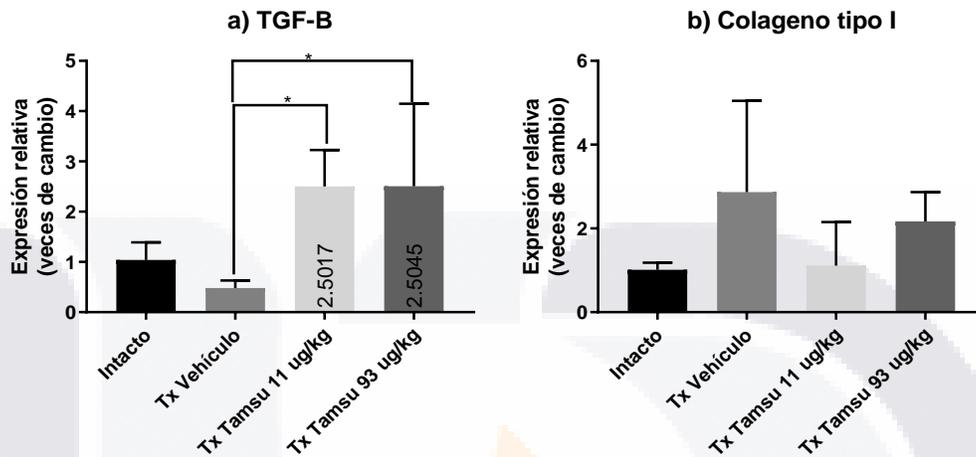


Gráfica 6.2.7.1 Evaluación de los marcadores proinflamatorios. En la gráfica a hubo mayor expresión relativa en el grupo tratado con la tamsulosina. El grupo tratado con la tamsulosina a 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mostró el mismo comportamiento que el grupo intacto y el grupo tratado con el vehículo mostró menor expresión. En la gráfica b, se evaluó el NF-kB. No hubo cambio significativo sin embargo el grupo tratado con el vehículo tuvo el mismo comportamiento que el grupo intacto y los grupos tratados con las dos dosis de la tamsulosina mostró tendencia a reducir. La grafica la cual se evaluó la IL-17, interleucina de inflamación crónica. Se observo que hubo mayor expresión en el grupo tratado con el vehículo mientras que el grupo tratado con la tamsulosina a 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mostro una reducción significativa y un comportamiento similar al grupo intacto. El grupo tratado con la tamsulosina 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ incrementó comparado con el intacto y el tratado con tamsulosina a 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

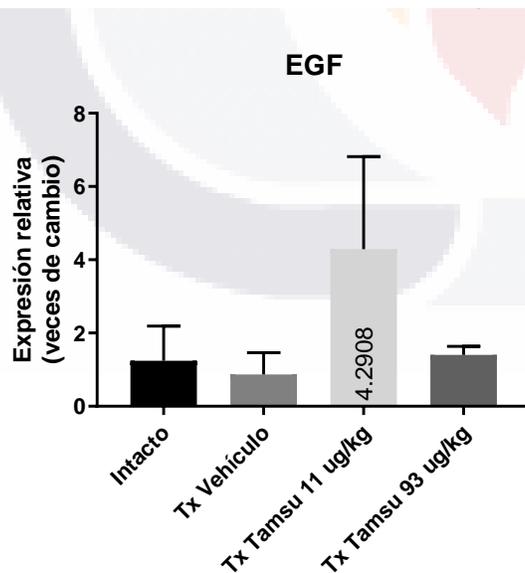


Gráfica 6.2.7.2. Evaluación de los marcadores antiinflamatoria. En la gráfica a se evaluó el marcador antiinflamatorio más potente. No hubo cambio significativo en el análisis, sin embargo, el tratado con el vehículo y la tamsulosina a 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mostró una tendencia a reducir comparado con el intacto y la dosis de 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Por otro lado, el TGF-B, marcador antiinflamatorio menos potente, mostró una tendencia significativa al incremento en los dos grupos tratados con la tamsulosina mientras el vehículo tubo el mismo comportamiento respecto al intacto. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (* $P < 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) y ($n = 6$ para cada grupo)

Marcadores profibrogénico



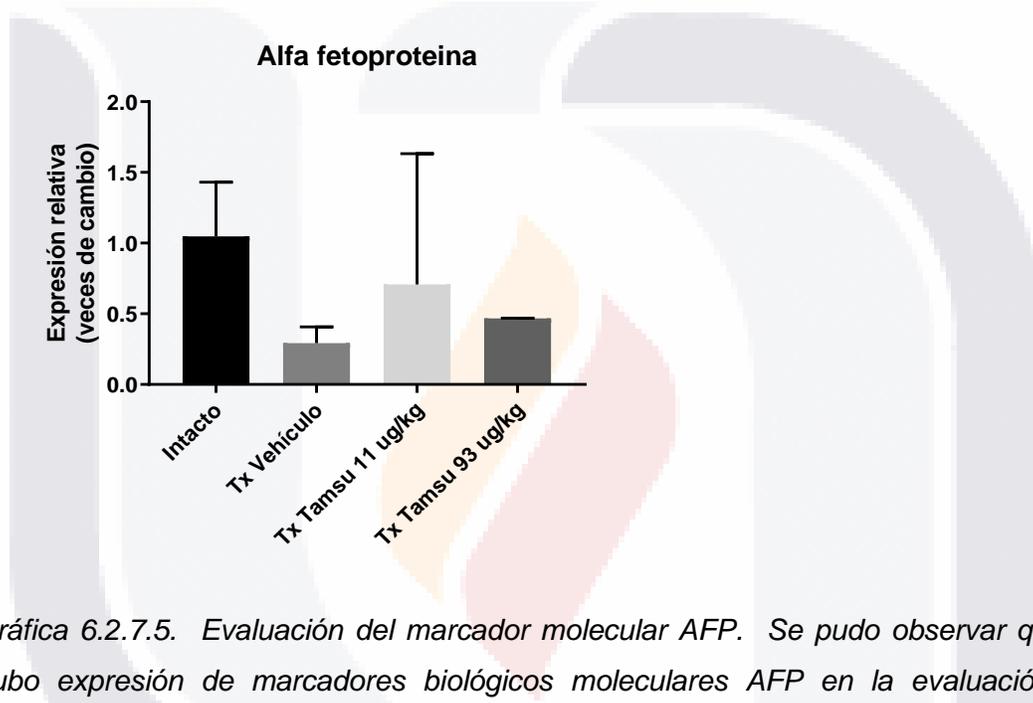
Gráfica 6.2.7.3. Evaluación de los marcadores fibrogénicos. En la gráfica a, corresponde al marcador profibrogénico. Se pudo observar que hubo mayor expresión significativa en los dos tratados con la tamsulosina. El grupo tratado con el vehículo mostró disminución en la expresión relativa sin cambio significativo en comparación con el grupo intacto. En la gráfica b se observó disminución de la expresión de colágeno tipo I comparada con el grupo tratado con el vehículo. Sin embargo, no hubo cambio significativo. La significancia estadística fue realizada mediante ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (* $P < 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) y ($n = 6$ para cada grupo).



Gráfica 6.2.7.4. Evaluación del EGF marcador de proliferación de células epiteliales. Se observó que hubo mayor expresión en el grupo tratado con la tamsulosina a $11 \mu\text{g/kg}$.

comparado con los otros grupos. El grupo tratado con el vehículo y el tratado con la tamsulosina a 93 µg/kg tuvieron el mismo comportamiento respecto al grupo intacto. Pero, no hubo cambios significativos. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (*P<0,05, **P=0,01, ***P=0,001, ****P<0,0001) y (n=6 para cada grupo)

Marcadores tumorales



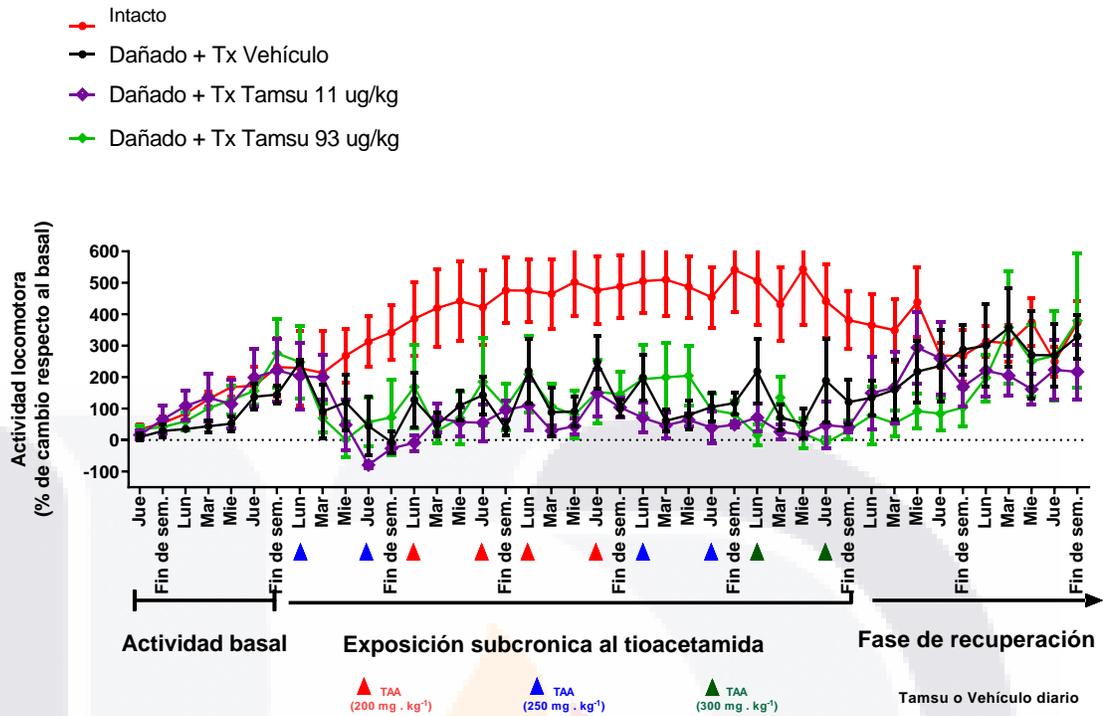
Gráfica 6.2.7.5. Evaluación del marcador molecular AFP. Se pudo observar que no hubo expresión de marcadores biológicos moleculares AFP en la evaluación. La aplicación del vehículo y los dos tratamientos de la tamsulosina mostraron reducción de riesgos a cáncer hepático. No hubo cambio significativo. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (*P<0,05, **P=0,01, ***P=0,001, ****P<0,0001) y (n=6 para cada grupo)

Evaluación de la recuperación de la actividad locomotora por los tratamientos con la tamsulosina y el vehículo tras el daño hepático causado por la TAA

Se evaluó la actividad física por grupo de animales mediante la distancia recorrida y la medición del porcentaje de cambio respectando a la actividad basal. La línea roja representa el grupo de animal sano, es decir, el grupo que no fue sometido

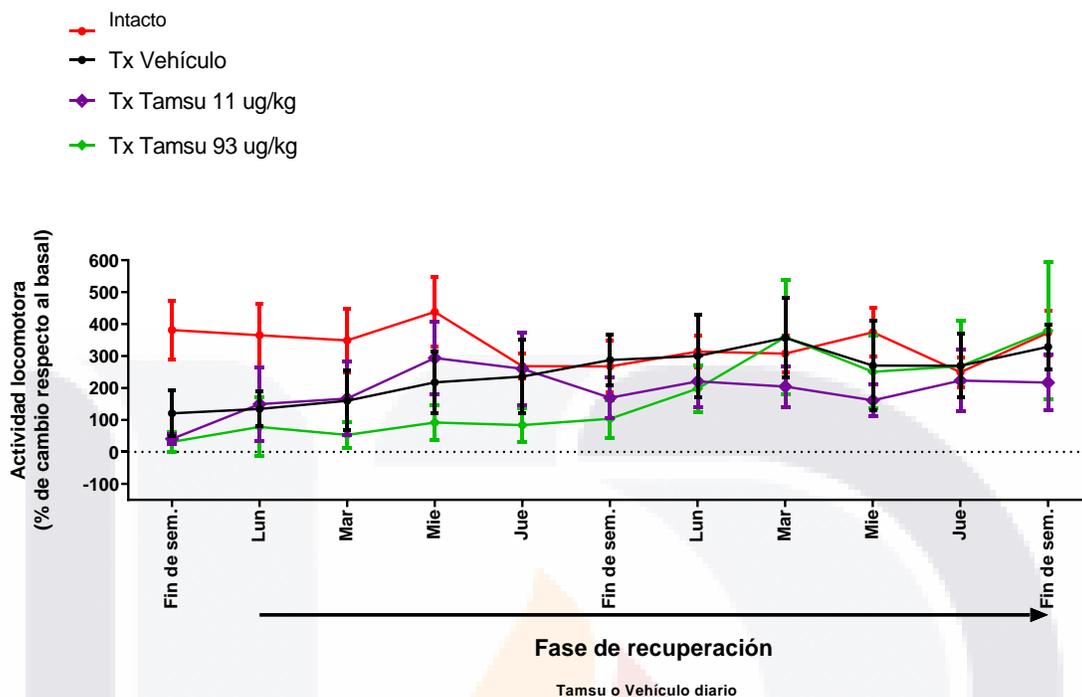
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a ninguna daño ni tratamiento. La línea **morada**, es grupo de rata que fue sometido al daño hepática con la TAA durante las 5 semanas a una dosis creciente bisemanal y tratado con la tamsulosina a 11 µg/kg. La línea **verde**, es grupo de rata que fue sometido al daño hepática con la TAA durante las 5 semanas a una dosis creciente bisemanal y tratado con la tamsulosina a 93 µg/kg. La línea negra, es grupo de rata que fue sometido al daño hepática con la TAA durante las 5 semanas a una dosis creciente bisemanal y tratado con el vehículo (0.5 ml de agua). Los tratamientos fueron aplicados diariamente durante dos semanas. Se pudo observar que el porcentaje de cambio de la actividad respecto la basal se descende significativamente por la inducción de daño con la TAA. Las dos semanas de tratamiento la actividad de recupera en todos los tratamientos sin cambio significativo con relación al grupo intacto (gráfica 6.2.8.). para apreciar mejor los cambios, se separó las dos semanas de tratamiento del resto y se realizó la estadística. Se observó que no hubo cambio significativo entre los tratamientos y el intacto 6.2.8.). La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (*P<0,05, **P=0,01, ***P=0,001, ****P<0,0001) y (n=6 para cada grupo)



Gráfica 6.2.8. Evaluación de los tres periodos durante el experimento. El periodo basal todos los grupos tuvieron el mismo comportamiento, la tendencia en subir. En el periodo de la exposición a la TAA, se observó un descenso en los grupos que fueron inducido a la TAA. Finalmente, en la fase de recuperación todos los tratados mostraron tendencia de recuperación. El grupo tratado con la tamsulosina a 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tardó en recuperar, pero a la segunda semana fue similar al intacto y el vehículo. El grupo tratado con la tamsulosina mostró una recuperación creciente de la actividad. Sin embargo, la tendencia fue decreciendo en la segunda semana. No hubo cambio significativo en la fase de recuperación. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (* $P < 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) y ($n = 6$ para cada grupo)

Actividad locomotora durante la fase de recuperación.



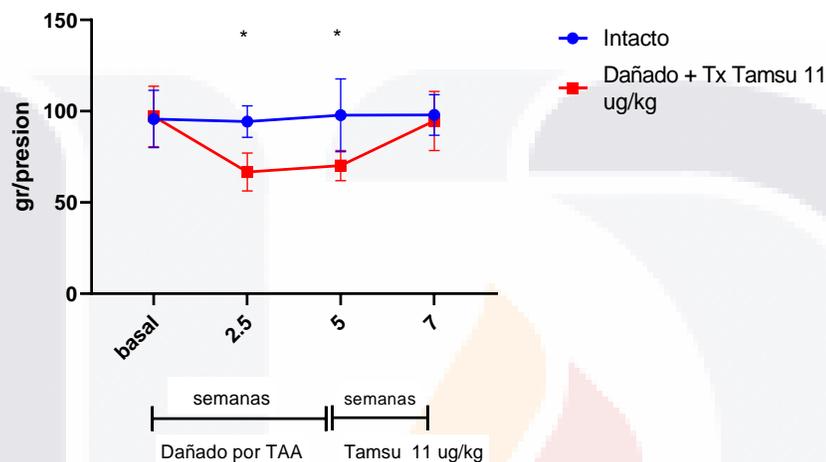
Gráfica 6.2.8.1. Separación de las dos semanas de recuperación de la fase de exposición a la TAA. recuperación todos los tratados mostraron tendencia de recuperación. El grupo tratado con la tamsulosina a 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tardó en recuperar, pero a la segunda semana fue similar al intacto y el vehículo. El grupo tratado con la tamsulosina mostró una recuperación creciente de la actividad. Sin embargo, la tendencia fue decreciendo en la segunda semana. No hubo cambio significativo en la fase de recuperación. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (* $P < 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) y ($n = 6$ para cada grupo)

Evaluación de recuperación de la hipersensibilidad tras las dos semanas de tratamiento

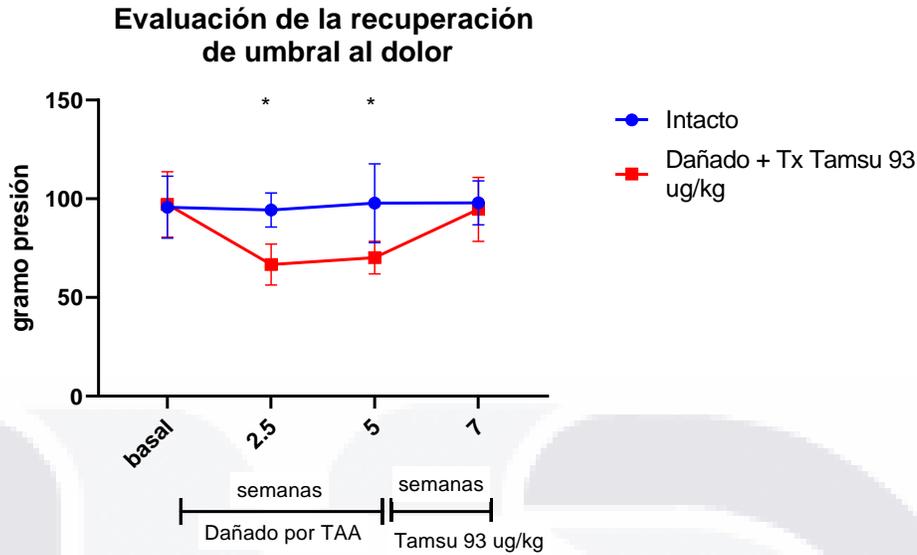
La evaluación de la hipersensibilidad consistió en la medición del umbral al dolor del grupo inducido de daño hepático respecto al grupo intacto. Se pudo apreciar que los animales que fueron sometidos a la inducción de daños (la línea roja) mostró a las 2.5 Y 5 semanas, menor umbral al dolor es decir mayor sensibilidad comparando con el grupo intacto (línea azul). Tras las dos semanas de

tratamientos, tanto el grupo tratado con la tamsulosina 11 µg/kg como la aplicación de la 93 µg/kg mostraron recuperación comparando con el intacto (gráfica 6.2.9.1 y 6.2.9.2).

Evaluación de la recuperación de umbral al dolor



Gráfica 6.2.9.1. Evaluación de la recuperación del umbral tras las 2 semanas de la aplicación de la tamsulosina a 11 µg/kg. Se observó que el tratamiento con la tamsulosina a 11 µg/kg aumenta el umbral al dolor y disminuyó la hipersensibilidad. No hubo cambio significativo en comparación al grupo intacto después de las dos semanas. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (*P<0,05, **P=0,01, ***P=0,001, ****P<0,0001) y (n=6 para cada grupo).



Gráfica 6.2.9.2. Evaluación de la recuperación del umbral tras las 2 semanas de la aplicación de la tamsulosina a 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Se observó que el tratamiento con la tamsulosina a 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aumenta el umbral al dolor y disminuyó la hipersensibilidad. No hubo cambio significativo en comparación al grupo intacto después de las dos semanas. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (* $P < 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) y ($n = 6$ para cada grupo).

EVALUACIÓN DEL POSIBLE DAÑO CAUSADO POR LA TAMSULOSINA

Se evaluó diferentes parámetros para destacar posible daño causado por la administración de la tamsulosina. Se administró una dosis diaria de tamsulosina a 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ durante dos semanas en dos grupos de ratas sanas. Tras las dos semanas de aplicación de la tamsulosina, las ratas fueron sacrificadas y extraído tejido hepático y sangre. Se comparó los grupos con el intacto mediante los siguientes análisis:

Observación macroscópica del hígado

No se observó ningún daño causado por la las dos dosis de la tamsulosina. Tanto la figura b como la c, se pudo apreciar que los hígados mantuvieron su color marrón rojizo y su arquitectura lisa comparado con el grupo intacto.

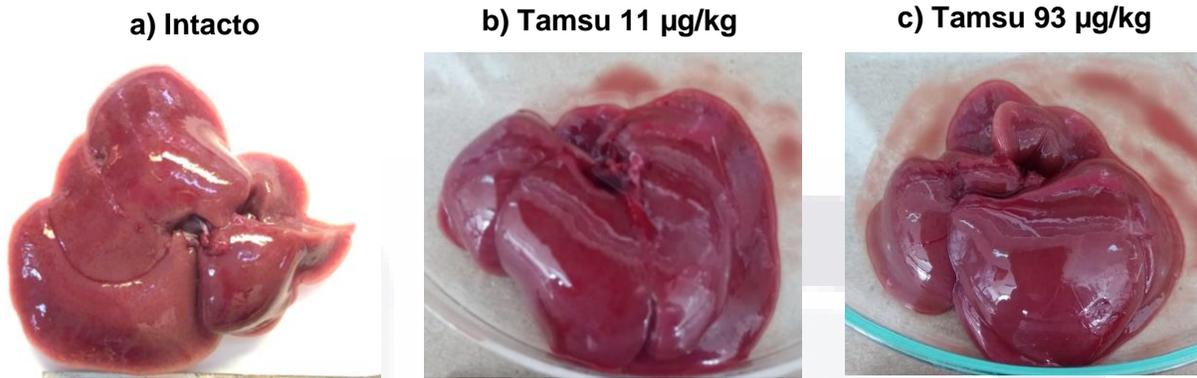


Figura 6.3.1. Vista macroscópica de los hígados sanos que fueron administrados las dos dosis de la tamsulosina. Se observó una coloración marrón rojizo propia del hígado y una arquitectura lisa sin ninguna alteración.

Evaluación microscópica de la arquitectura hepática mediante H/E

Mediante la tinción H/E se evaluó la presencia de fibras de colágeno del grupo sano que fueron administrado las dos dosis de la tamsulosina. Así como se observa en las figuras b y c una arquitectura lisa con lo hepatocitos bien definida y sin presencia de fibras de colágenos en comparación con el grupo intacto figura a. (figura 6.3.2)

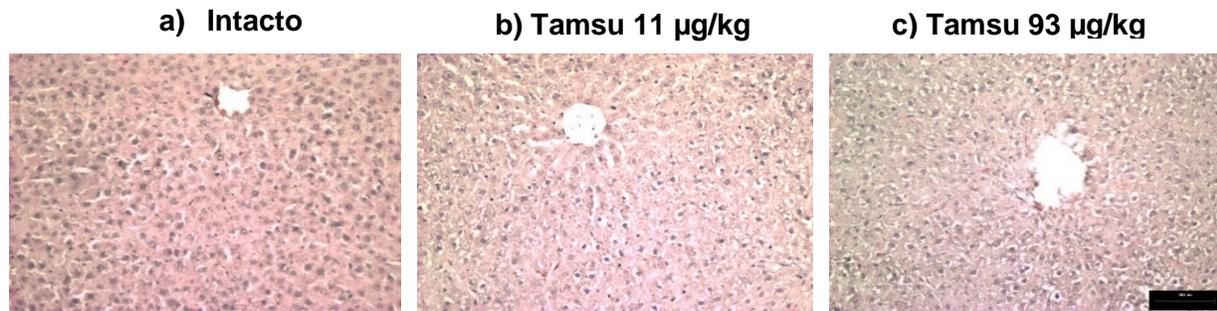
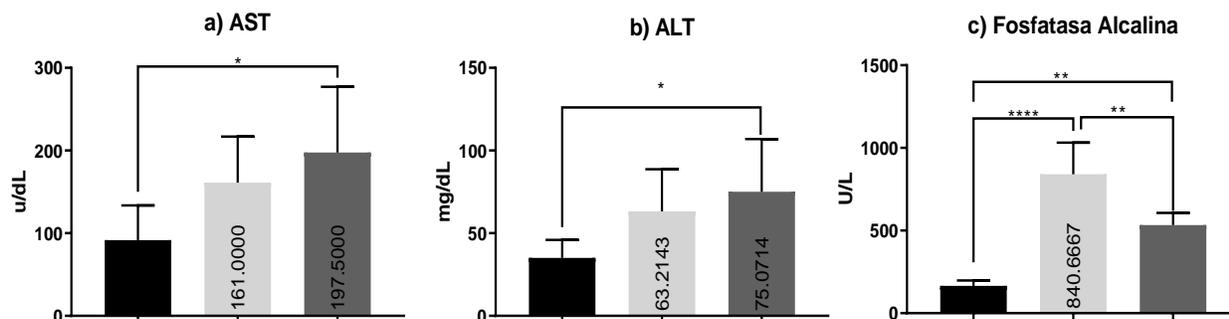


Figura 6.3.2. observación microscópica de la arquitectura hepática. No se observa ninguna alteración en la arquitectura hepática. No hubo presencia de fibras de colágeno. Los hepatocitos de los dos grupos representados por la figura b y c mostraron buena integridad comparado los dos grupos con el intacto.

Evaluación de marcadores de daño hepático

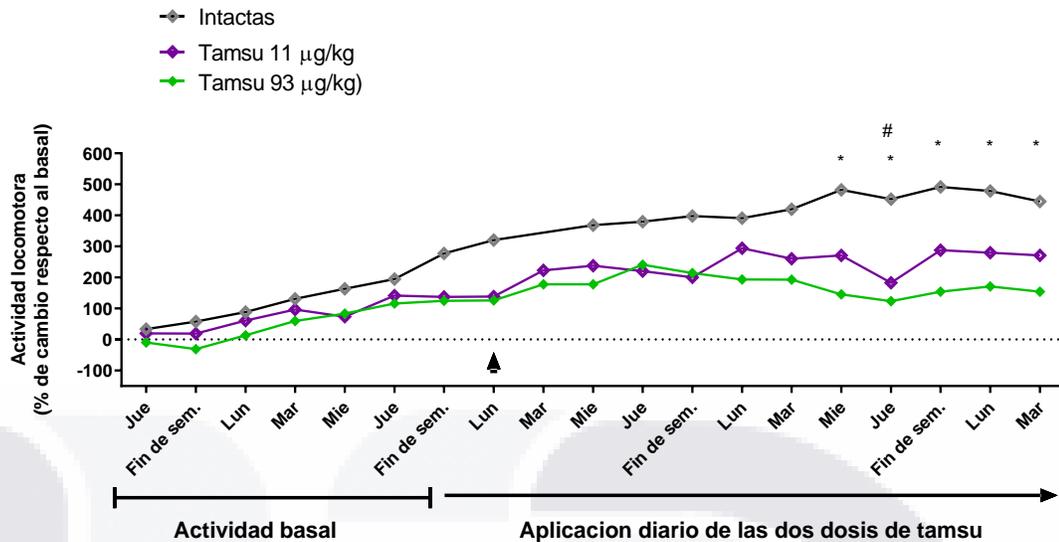
Se evaluó los marcadores AST, Alt y FA en dos grupos comparar la media con el grupo intacto. En las gráficas a, b y c en las cuales se analizó la ALT y AST, hubo un incremento en los tres marcadores al grupo que le administraron 93 µg/kg. En el grupo se administró la dosis 11 µg/kg, solo hubo un incremento en la fosfatasa alcalina. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (*P<0,05, **P=0,01, ***P=0,001, ****P<0,0001) y (n=6 para cada grupo).



Gráfica 6.3.1. Evaluación de marcadores de daño hepático. En los tres marcadores evaluados se observó un incremento significativo en el grupo de tamsulosina 93 µg/kg. Por otro lado, el grupo de 11 µg/kg solo mostro incremento en la fosfatasa alcalina. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (*P<0,05, **P=0,01, ***P=0,001, ****P<0,0001) y (n=6 para cada grupo).

Evaluación de la actividad locomotora

Se evaluó el posible daño en la actividad física por la administración de la tamsulosina. Se realizó el registro diario de la actividad física recorrida en los grupos animales. se midió del porcentaje de cambio respectando a la actividad basal. La línea gris representa el grupo de animal sano, es decir, el grupo que no fue sometido a ninguna daño ni tratamiento. La línea morada, es grupo se le administró la tamsulosina a 11 ug/kg dosis diario durante 2 semanas. La línea verde representa el grupo de la tamsulosina a 93 ug/kg . Se pudo observar que el porcentaje de cambio de la actividad de los grupos mostraron tendencia a incrementar. Sin embargo, en la segunda semana de administración hubo un decremento significativo (grafica 6.3.4). La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (# o *P<0,05,## o **P=0,01, ### o ***P=0,001, #### o ****P<0,0001) y (n=6 para cada grupo).

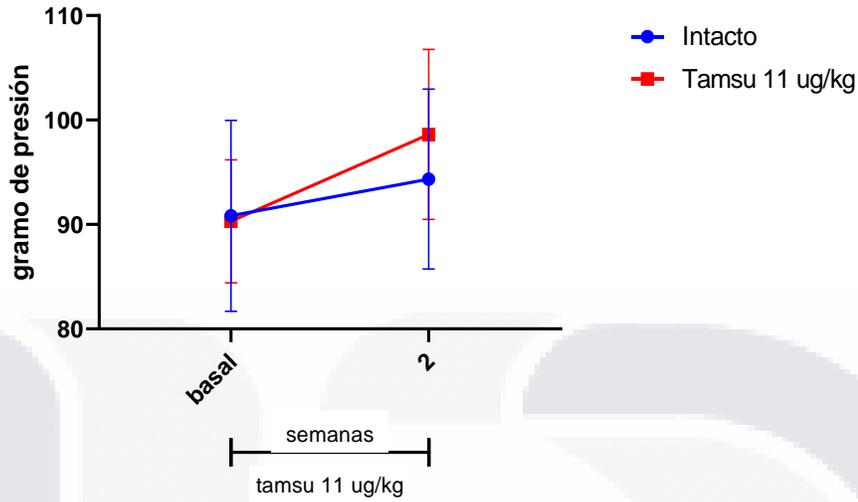


Gráfica 6.3.2. Evaluación del posible daño en la actividad locomotora por la tamsulosina. En la primera semana de administración los grupos tuvieron el mismo comportamiento en comparación con el grupo intacto. Sin embargo, en la segunda semana hubo un decremento significativo en los dos, siendo el grupo de 93 µg/kg con mayor decremento. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (# o * $P < 0,05$, ## o ** $P = 0,01$, ### o *** $P = 0,001$, #### o **** $P < 0,0001$) y ($n = 6$ para cada grupo).

Evaluación de la hipersensibilidad por la tamsulosina

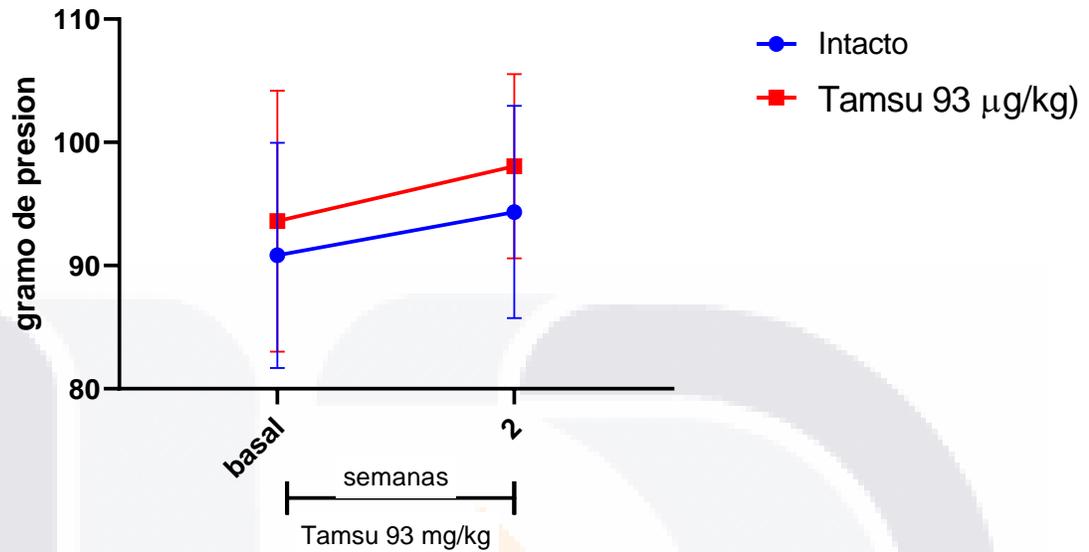
Se evaluó la hipersensibilidad en los animales sanos tratado con la tamsulosina. La medición durante dos etapas, al inicio y al final de la administración de cada dosis. La línea roja indica los grupos que fueron administrado la tamsulosina y la azul el grupo intacto. Se observó que tanto la aplicación de la tamsulosina a 11 µg/kg como la aplicación de la 93 µg/kg aumentaron el umbral y disminuye la sensibilidad al dolor comparado con el grupo intacto sin embargo no hubo cambio significativo (gráfica 6.3.3.1 y 6.3.3.2). La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (* $P < 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) y ($n = 6$ para cada grupo).

Evaluación de la tamsulosina sobre umbral al dolor



Gráfica 6.3.3.1. Evaluación de la tamsulosina a dosis 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sobre el umbral al dolor. Se observó que el umbral al dolor tiende a aumentar al aplicar la tamsulosina durante 2 semanas en las ratas. Sin embargo, no hubo cambio significativo. La significancia estadística fue realizada mediante ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (* $P < 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) y ($n = 6$ para cada grupo).

Evaluación de la tamsulosina sobre umbral al dolor



Gráfica 6.3.3.2 Evaluación de la tamsulosina a dosis 93 µg/kg sobre el umbral al dolor. Se observó que el umbral al dolor tiende a aumentar al aplicar la tamsulosina durante 2 semanas en las ratas. Sin embargo, no hubo cambio significativo. La significancia estadística fue realizada media ANOVA de dos vías y la prueba de Tuckey en comparación múltiple (* $P < 0,05$, ** $P = 0,01$, *** $P = 0,001$, **** $P < 0,0001$) y ($n = 6$ para cada grupo)



Capítulo 7

Discusión

Discusión

Los problemas hepáticos han incrementado en los últimos años debido a diferentes factores socioculturales como el sedentarismo y la mala alimentación que causa la obesidad y otras enfermedades, el consumo de alcoholes y medicamentos otras drogas que afecta al organismo y su vez promueven enfermedades de transmisiones como el virus de hepatitis B y C, y el desbalance a nivel del organismo por enfermedades como diabetes, hipertensión entre otros. A nivel mundial, muchos pacientes afectados por daño hepático han perdido la vida, sea por alguna complicación, por escasez de tratamiento o falta de recurso o por la exposición continua al agente causar. La presente investigación tuvo la finalidad de evaluar el efecto de la tamsulosina, un alfa adrenérgico selectivo accesible en el mercado, sobre la posible recuperación de daño hepático. Se indujo el daño hepático aplicando la TAA y se evaluaron diferentes parámetros de daños como se observa en el apartado 6.1. durante el periodo de la inducción con la TAA, las fueron perdiendo peso y la masa muscular. Cabe mencionar que los pacientes con problemas hepáticas pueden experimente pérdida de peso y de masa corporal por la expresión de las citocinas proinflamatorio que lleva a la alteración metabólica en el desarrollo del daño (Rezende-Anastácio & Al, 2012). Es importante llevar un control de peso durante el proceso de daño hepática. En estudios anteriores, han demostrado que el decremento de peso y de masa corporal es dada por la degradación de proteínas musculares como la glutamina lo que lleva el incremento de la concentración de amonio en la sangre como se observa en la gráfica 6.1.7a. (Gutiérrez, Lares, Sandoval, & Hernández, 2020).

En presencia de un daño hepática, diferentes células del hígado mandan señales liberando citocina que produce fibras de colágeno para contrarrestar y regularizar el daño. Sin embargo, la activación prolongada de esta citocina resulta un incremento excesivo de fibras de colágeno que distorsiona la matriz extracelular llevando a fibrosis hepática (Guan & Al, 2021). Se puede observar las alteraciones de la arquitectura hepática causada por la TAA en las figuras 6.1.4 y 6.1.6 y las gráficas 6.1.5 y 6.1.7. La presencia de estas fibras de colágenas limita el intercambio de nutriente y otros componentes necesario el

funcionamiento del hígado lo que conlleva a una alteración multifunción a nivel sistémico.

A demás de la evaluación de las fibras de colágeno en daños hepáticos, muchos investigadores sugieren evaluar algunos biomarcadores de perfil hepática. Los resultados de esos pueden aportar más información sobre grado daño. En este estudio se observó un incremento en amonio, el nitrógeno ureico en la sangre, la fosfatasa Alcalina, aspartato aminotransferasa, la bilirrubina y la alanina aminotransferasa. La elevación de estos biomarcadores sobre todo la AST y la ALT en suero son comúnmente utilizada para detectar la hepatotoxicidad (Aljobaily & Al, 2021; Limdi & Hyde, 2003; Khan & Jamal, 2018). Por otro lado, se vio una disminución en la glucosa y la albumina por el daño causado por la TAA (figura 6.1.7d y 6.1.7h). Los pacientes con fibrosis subcronica o crónica tienden a presentar hipoalbuminemia e hipoglicemia debido a la disminución del aclaramiento por la capilarización de los sinusoides hepáticos y al amplio flujo sanguíneo colateral (Braet, Hussein-Agha, Taleb, Buess, & Millard, 2020; Bahr & Al, 2006). En un estudio realizado a pacientes con esteatosis y fibrosis lobular y portal encontraron una disminución tanto en la concentración glucosa como la albumina (Aliefendioğlu & Al, 20107).

La elevación de las citocinas proinflamatorio es común en los daños hepáticos (Bahr & Al, 2006). Por esta razón se evaluó el IL-1, IL-17 y NF-κB para comprobar el daño por la TAA. En el análisis que se hizo, se observó que la IL-1 y NF-κB presentaron aumento significativo (figura 6.5.5, 6.1.8a y 6.1.8b). En un estudio realizado en enfermedad hepática alcohólica se demostraron un aumento de la IL-1β y este aumento es dependiente de Casp-1 y la señalización mediada por IL-1R1 (Petrasek & Al, 2012). También la modulación de la expresión del ARNm de la IL-1β es dependiente de NF-κB (Song & Al, 2016; Dinarello, 1998). Por lo que el incremento de IL-1 y NF-κB indica un proceso de inflamación a nivel hepática. El IL-17 mostró una tendencia a reducir en grupo dañado comparando con el intacto (figura 6.1.8f). La IL-17A es fundamental en la inflamación, pero es mayormente expresado en procesos crónico. En un análisis en pacientes con

carcinoma hepatocelular en fase inicial por diferentes causas, han encontrado mayor expresión de IL-17. En este mismo estudio se observaron una reducción en la expresión de IL-17 en un grupo de rata inducidos de daño hepático con Tetracloruro de carbono. La IL-17 es producida por los neutrófilos y los linfocitos T y la expresión de colágeno es inducida por la IL-17 (Tan & Al, 2013). Así como se observa en la figura 6.1.8e un incremento en la expresión de colágena y una tendencia a disminuir en la IL-17. Se puede decir que disminución de la IL-17 puede haber sido por el daño subcrónico. En estudios anteriores, se han encontrado que la IL-17 es significativamente elevada en una variedad de enfermedades hepáticas crónicas, incluyendo la enfermedad hepática alcohólica, la hepatitis viral y el carcinoma hepatocelular (Lafdil, Miller, Hwan Ki, & Gao, 2010). El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es otro que se analizó en este trabajo ya que desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la fibrosis hepática. Su expresión es sistemáticamente elevada en los órganos afectados, lo que se correlaciona con el aumento de la deposición de matriz extracelular (Xu, Liu, Zhou, & Zhang, 2016). En la figura 6.1.8g, se observó un incremento en la expresión del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El EGF es un factor de crecimiento encargado de estimular la proliferación celular, su expresión aumenta durante la fibrogénesis hepática por el daño de las células epiteliales (hepatocitos y colangiocitos) (Xu H. , 2020). Se evaluó la alfafetoproteína (AFP) para detectar posible hepatocarcinoma por la inducción de TAA. Si bien hubo un aumento en los resultados obtenidos. Sin embargo, en estudio realizado se han encontrados falso positivos a demás esta prueba es más comunes para la vigilancia del CHC en la práctica clínica. A pesar se considera la TAA como hepatocancerígenos. La inducción puede causar mucho daño, pero por el tiempo de inducción puede que no llegue a desarrollar hepatocarcinoma (Chang, Wu, Tung, & al., 2015; Bala Paul & al., 2007). El incremento de la IL-10 en el grupo dañado permite combatir con el daño presente mediante la activación concomitante de macrófagos M1 proinflamatorios y macrófagos M2 profibróticos (Lescoat & al., 2020).

Los pacientes con daños hepáticos avanzado tienden a desarrollar encefalopatía por el aumento y la circulación de amonio a nivel cerebral. Como se observó en la gráfica 6.1.7a, este amonio puede haber sido por la degradación de proteínas musculares o/y por la falta de los desechos proveniente de los intestinos. El amonio viaja en la sangre a diferente parte del organismo, cruza la barrera hematoencefálica causando encefalopatía. La encefalopatía es puedes alterar diferentes funciones como la actividad motoneurona, locomotora y sensitiva. Como se observa en las gráficas 6.1.9 y 6.1.10, la actividad locomotora de los animales se redujo significativamente por la inducción con la TAA. Además, se vio un aumento en la hipersensibilidad en los animales sometidos al daño hepático. En estudios realizados anteriormente, se han visto que los pacientes con enfermedad hepática alcohólica y encefalopatía muestra alguna afectación en el autocontrol y fuerza física al momento de interactuar (Mikkelsen & al., 2016). Los pacientes con cirrosis suelen experimentar dolor. Sin embargo, el dolor sigue siendo uno de los síntomas menos tratados en esta población de pacientes (Rakoski & al., 2018). De acuerdo con los análisis que hizo, se pudo evidencia el daño hepático causado por la TAA.

Se evaluó la capacidad de recuperación de daño hepático para la inducción con la TAA. La evaluación fue mediante dos dosis de tamsulosina y se comparó con el grupo de animal sano y el grupo de animal dañado y no tratado es decir el grupo de la regresión endógena. Es importante mencionar que desde años el mejor tratamiento para la recuperación de daño hepático era quitar el agente causante. Sin embargo, muchas veces por el grado de la fibrosis o las complicaciones de la mismo, la regresión del daño suele producirse con demasiada lentitud (Roehlen, Crouchet, & Baumert, 2020).

Se pudo observar que tanto los dos grupos tratado con la tamsulosina como grupo el tratado con el vehículo recuperaron su peso tras las dos semanas de tratamiento. Como mencionado con anterioridad al retirar el agente causal, el hígado puede recuperar ciertas funciones. Por eso se pudo ver la recuperación de en las ratas no tratados con la tamsulosina. Sin embargo, en otros parámetros

como se observa en la gráfica 6.2.3 el peso de los hígados en el grupo no tratado con la tamsulosina tiende a aumentar y la figura 6.2.4 se vio aumentado significativamente las fibras de colágeno. Se puede decir que a las ratas que fueron sometidas a la administración de la tamsulosina tanto a 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ como a 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mostraron reducciones en las fibras de colágenos comparado con el grupo no tratado con la tamsulosina. En un estudio que se realizó con la doxazosina un antagonista alfaadrenérgico se vio que redujo las fibras de colágeno, pero provocó ligeros cambios morfológicos en los hepatocitos (Serna-Salas & al., 2018). Cabe mencionar que no hubo alteraciones en las transaminasas. La tamsulosina es capaz de reducir las fibras de colágeno sin afectar a los hepatocitos. En la evaluación de daño mediante el perfil hepático, se observó que la tamsulosina es capaz de recuperar el daño hepático en parámetros como ALT, AST, FA, BUN y bilirrubina, mientras la dosis de 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ causa hipoalbuminemia. La hipoalbuminemia se observa con frecuencia en pacientes hospitalizados y puede estar asociada a varias enfermedades diferentes, como la cirrosis, la desnutrición, el síndrome nefrótico y la sepsis (Gatta, Verardo, & Bolognesi, 2012). Los fármacos antihipertensivos suelen dañar el hígado causando alteración en las transaminasas (García-Corté & al, 2005). La hipoalbuminemia puede ser asociada a la inflamación por la dosis de la tamsulosina. Se han demostrado que, en un proceso inflamatorio, se aumenta la permeabilidad capilar y el escape de albúmina sérica, lo que conduce a la expansión del espacio intersticial y al aumento del volumen de distribución de la albúmina a su vez expresión de factores de crecimiento (Soeters, Wolfe, & Shenkin, 2019). Es evidente la inflamación causada por la dosis de 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Se puede observar un aumento significativo del mismo grupo en la IL-1 y el TGF- β . También se han asociado la anemia uno de los efectos adversos más común en los pacientes que consumen la tamsulosina (Nickel, Sander, & Moon, 2008; Chauhan, Gupta, & Nayar, 2013). En estudios realizados en paciente con anemia, se observaron que la hemoglobina está relacionada con la albúmina. Los pacientes que presentan anemia tienden a desarrollar hipoalbuminemia y a su vez hipoglicemia (Röhrig, Becker, Polidori, Schulz, & Noreik, 2015; Reck de

Jesus & al., 2018). El grupo de ratas que fueron tratados con la tamsulosina a 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tuvieron disminución en la concentración de la albumina y la glucosa, esas disminuciones puede ser relacionadas por la anemia causada por la dosis de la tamsulosina lo que llevo a un incremento en la expresión de la IL-1.

En la evaluación de las citocinas se observó que los animales tratados con el vehículo tuvieron la capacidad de recuperar se forma endógena. Sin embargo, se vio incremento en las citosinas IL-17 y colágena tipo I. En el grupo que se aplicó la tamsulosina a 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mostró recuperación en todas las citosinas evaluadas excepto en la IL-17, TGF- β y EGF que tuvieron una ligera tendencia al incremento. Por otro lado, la administración de 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ se vio la tendencia en IL-1 y TGF- β , como ya mencionado anteriormente esta tendencia pudo haber sido por algún proceso inflamatorio causado por el efecto adverso de la tamsulosina. La IL-17 es mediado por los neutrófilos y los mastocitos, su incremento está relacionado con la progresión de la fibrosis hepática (Fabre & al., Type 3 cytokines IL-17A and IL-22 drive TGF- β -dependent liver fibrosis, 2018). En un estudio realizado, se observó que la expresión de la IL-17 aumento significativamente mientras que las expresiones de la IL-10 y el TGF- β fueron disminuyo. La inflamación crónica puede inducir una anomalía en las citocinas reguladoras del sistema inmunitario local y alterar el patrón de las células T CD4+ (Wang & al., 2019). Durante el daño hepático, El proceso inflamatorio puede ser de tres tipos. El tipo 1 caracterizado por el incremento de citocinas antifibrogénicas y proinflamatorias IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ . El tipo 2, caracterizado por la expresión citocina antiinflamatorias que se asocian con la inflamación reducida que se correlaciona con la progresión de la fibrosis hepática. Y el tipo 3 es dado por el incremento de IL-17 e IL-22 producidas por los neutrófilos, mastocitos, células linfoides innatas del grupo 3 (ILC3) y células Th17 y Th22 (Fabre & al., 2018). El incremento de estas últimas puede ser patógenas ya que su desregulación está asociada con reparación anormal del tejido hepático de una forma crónica (Annunziato, Romagnani, & Romagnani, 2015; Gieseck 3rd, Wilson, & Wynn, 2018). La IL-17 tiene funciones profibrogénicas a través del reclutamiento de monocitos proinflamatorios, el aumento de la

producción de TGF- y activa las CEH (Fabre & al., 2014). La IL-22 es hepatoprotectora durante la lesión hepática aguda, pero su función durante lesión crónica es controvertida. Se han descrito efectos opuestos de la IL-22 en el hígado dependiendo de la duración de la lesión y de la etiología (Fabre & al., 2014). El incremento de la IL-17 en el grupo vehículo pudo haber sido por un proceso inflamatorio crónico. A pesar de que el factor de crecimiento beta mostro una tendencia normal comparando con el control a su vez pro la alteración de la IL-17 puede llevar la progresión de la de la fibrosis hepática alterando la arquitectura hepática. En el tratamiento con la tamsulosina se observó un incremento de IL-1 y TGF- β , puede ser un posible proceso inflamatorio de tipo 1 causado por el efecto adversos. Como se menciona anteriormente el incremento de TGF- β puede ser un efecto hepatoprotector tratando de contrarrestar el proceso de daño.

En la evaluación de la actividad locomotor tras las dos semanas de tratamiento con la tamsulosina, se observó una tendencia a incrementar. Sin embargo, tanto la dosis de 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ como la de 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no alcanzaron el grupo intacto. También el grupo tratado con el vehículo mejor desempeño en la recuperación teniendo una tendencia más parecida al grupo intacto. Han demostrado que la administración de la tamsulosina causa efectos adversos sobre las funciones cognitivas y la alteración de la conducta (Duan, 2018; Cruz Guerra & Perales Céspedes, 2005). La ligera tendencia a bajar de la actividad física es causada por la administración de la tamsulosina puede ser por su efecto hipotensor (secsefap, 2022).

Se demostró que la tamsulosina es capaz de aumentar el umbral al dolor después de haber inducido con la TAA. La percepción del dolor en estos animales fue por el daño causado por la tamsulosina. Al administrar la tamsulosina durante las dos semanas mostró la recuperación de esa percepción.

La tamsulosina actúa sobre los receptores alfa adrenérgico las células estelares bloqueando la interacción con noradrenalina evitando la activación de las células estelares y la producción de fibras de colágena en la matriz extracelular. Otra

posible alternativa, la tamsulosina puede actuar sobre la netrina-1, una proteína relacionada a los receptores adrenérgico que se sobreexpresa durante la inflamación hepática aguda como crónica favoreciendo la fibrosis, causando bloqueo que llevaría a una inducción del proceso inflamatorio (BIONITY, 2022; Barnault & Verzeroli, 2022).





Capítulo 8

Conclusión

Conclusión

La exposición de tioacetamida a una dosis creciente de 200 a 300 mg/kg bisemanal durante 5 semanas es capaz de general daño subcronico a nivel hepático en un modelo de ratas Wistar, dosis equivalente de 28.6 a 42.9 mg/kg en humano. La administración diaria de tamsulosina durante 2 semanas a una dosis de 11µg/kg equivalente a la dosis de 0.8mg en humanos y la de 93µg/kg equivalente a la dosis de 0.8mg en ratas han demostrado una recuperación del daño hepático en la función y la arquitectura del hígado, así como la disminución de la hiperalgesia y una tendencia a la recuperación de la actividad locomotora tras inducir el daño hepático con tioacetamida. Sin embargo, la dosis a 93 µg/kg causa una posible anemia. Se ha mostrado que la tamsulosina ha controlado el procesos de daño hepática mediante los marcadores tanto proinflamatoria,antiinflamatoria como profibrogenica. Se observó que la administración de tamsulosina durante 2 semanas no es capaz de generar daño hepático. Los resultados nos indica que la tamsulosina puede ser un posible fármaco que controlar el proceso la inflamación y participa en la recuperación de daños hepático, aun así, se requiere realizar otros estudios y análisis para asegurar su uso.



Capítulo 9
Bibliografía

Bibliografía

- Abdel-Misih, S. R. (s.f.). *Liver Anatomy*.
- Aldaba-Muruato, L. R., Moreno, M. G., & al. (2013). Allopurinol Reverses Liver Damage Induced by Chronic Carbon Tetrachloride Treatment by Decreasing Oxidative Stress, TGF- β Production and NF- κ B Nuclear Translocation. *Pharmacology*, 92:138–149, DOI: 10.1159/000339078.
- Aldaba-Muruato, L. R., Moreno, M. G., Shibayama, M., Tsutsumi, V., & Muriel, P. (2012). Allopurinol Reverses Liver Damage Induced by Chronic Carbon Tetrachloride Treatment by Decreasing Oxidative Stress, TGF- β Production and NF- κ B Nuclear Translocation. *Pharmacology 2013;92:138–149*, 92:138–149.
- Aliefendioğlu, D., & Al. (20107). A newborn with VLCAD deficiency. Clinical, biochemical, and histopathological findings. *Case Reports Eur J Pediatr*, 166(10):1077-80. doi: 10.1007/s00431-006-0350-6.
- Aljobaily, N., & Al. (2021). Creatine Alleviates Doxorubicin-Induced Liver Damage by Inhibiting Liver Fibrosis, Inflammation, Oxidative Stress, and Cellular Senescence. *Nutrients.*, 13(1): 41.doi: 10.3390/nu13010041.
- Altamirano Gomez, J. T., & al. (2012). Tratamiento actual de la fibrosis y opciones a futuro. En A. Torre Delgadillo, & D. Kershennoch, *Hepatología* (págs. 39-56). D.F., Mx: Zarpra.
- Álvaro-Naranjo, T., Noguera-Salvá, R., & Fariñas-Guerrero, F. (2009). Extracellular matrix: morphology, function and biotensegrity (part I). *REV ESP PATOL*, Vol 42, n.º 4: 249-261.
- Annunziato, F., Romagnani, C., & Romagnani, S. (2015). The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol*, 135(3):626-35. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.001.

- Bahr, M. J., & Al. (2006). Elevated resistin levels in cirrhosis are associated with the proinflammatory state and altered hepatic glucose metabolism but not with insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* Volume 291, Issue 2, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00291.2005>.
- Bahr, M. J., & Al. (2006). Elevated resistin levels in cirrhosis are associated with the proinflammatory state and altered hepatic glucose metabolism but not with insulin resistance. *Controlled Clinical Trial Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291(2):E199-206. doi: 10.1152/ajpendo.00291.2005.
- Bala Paul, S., & al. (2007). Evaluating patients with cirrhosis for hepatocellular carcinoma: value of clinical symptomatology, imaging and alpha-fetoprotein. *Oncology*, 72 Suppl 1:117-23. doi: 10.1159/000111717.
- Barnault, R., & Verzeroli, C. (2022). *Hepatology*.
- Barnault, R., Verzeroli, C., & al. (2022). Hepatic inflammation elicits production of proinflammatory netrin-1 through exclusive activation of translation. *Hepatology*, Pages 1345-1359. doi.org/10.1002/hep.32446.
- Bataller, R., & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest.*, 115(2):209-18. doi: 10.1172/JCI24282.
- BIONITY. (29 de 10 de 2022). *Netrin-1, un nuevo actor en la inflamación del hígado*. Obtenido de Netrin-1, un nuevo actor en la inflamación del hígado: <https://www.bionity.com/es/noticias/1176116>
- Braet, C., Hussein-Agha, Y., Taleb, A., Buess, C., & Millard, J. (2020). Sulfonylurea-Induced Hypoglycemia in a Patient With Cirrhosis. *Case Reports Cureus*, 8;12(6):e8513. doi: 10.7759/cureus.8513.
- Carretero-Colomer, M. (2006). Tamsulosina: En el tratamiento de los síntomas del tracto urinario inferior indicativos de HBP. *OFFARM: Medicamentos de vanguardia*, VOL 25 NÚM 1.
- Castro Narro G, B. R. (2016). *Fibrosis hepática: actualidades y tratamiento*. Nahum M, & Uribe M(Eds.), *Hepatología. Conceptos básicos y clínicos*. D. F.: McGraw .

- Castro Narro, G. E., & Bataller, R. (2016). Fibrosis hepática: actualidades y tratamiento. En N. Méndez-Sánchez, & M. Uribe, *Hepatología. Conceptos básicos y clínicos*. D.F., Mexico: McGraw Hil.
- Castro, L., & al. (2015). HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. *Revista Médica Clínica Las Condes*, doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.09.006.
- Cervantes-Garcia, D., & al. (2017). Adenoviral-bone morphogenetic protein-7 and/or doxazosin therapies promote the reversion of fibrosis/cirrhosis in a cirrhotic hamster model. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*, 7785.
- Chang, T., Wu, Y., Tung, S., & al. (2015). HEPATOCELLULAR CARCINOMA SURVEILLANCE: DOES ALPHA-FETOPROTEIN HAVE A ROLE? *Am J Gastroenterol*, 110:836–844.
- Chauhan, G., Gupta, K., & Nayar, P. (2013). Severe hypotension during general anesthesia in a patient on chronic high-dose Tamsulosin therapy. *Anesth Essays Res*, 7(2):285-6. doi: 10.4103/0259-1162.118985.
- Cinvestav. (2022). *Modelos de Daño Hepático más utilizados*. Obtenido de Modelo de Tetracloruro de Carbono (CCl4) y Tioacetamida (TAA): <https://farmacologia.cinvestav.mx/Investigadores/Dr-Pablo-Muriel/Metodolog%C3%ADa>
- Clària, J., & Titos, E. (2004). La célula de Kupffer. *Gastroenterol Hepatol*, 27(4):264-73.
- Clària, J., & Titos, E. (2004). La célula de Kupffer. *Gastroenterol Hepatol*, 27(4):264-73.
- Cruz Guerra, N. A., & Perales Céspedes, M. P. (2005). ALTERACIÓN COGNITIVA Y CONDUCTUAL COMO REACCION ADVERSA. *Arch. Esp. Urol. vol.58*, ISSN 0004-0614.
- Cubero, F. J., & Nieto, N. (2006). Kupffer cells and alcoholic liver disease Células de Kupffer y hepatopatía alcohólica. *Department of Medicine. Division of Liver Diseases. Mount Sinai School of Medicine. New York, USA*, 460-472 .
- D'Amico, G., Morabito, A., D'Amico, M., & al. (2018). New concepts on the clinical course and stratification of compensated and decompensated cirrhosis. *Hepatology International*, 12, pages34–43 <https://doi.org/10.1007/s12072-017-9808-z>.

- David, K., Kowdley, K., Unalp, A., Kanwa, F., Brunt, E., MD, . . . Group., t. N. (2009). Quality of Life in Adults with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Baseline Data from the NASH CRN. *Hepatology* , 49(6): 1904–1912.
- de Pablo Sánchez, R., & al. (2005). The balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in septic states. *Med Intensiva.*, 29(3):151-8, doi: 10.1016/S0210-5691(05)74222-4.
- Deldado-Coello, B. A., & Mas-Oliva, J. (2017). *Avances en el estudio experimental de la bioquímica hepática*. Ciudad de Mexico: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
- Dinarelli, C. A. (1998). Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci*, 29;856:1-11. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08307.x.
- DrugBank. (10 de 12 de 2022). *Tamsulosin*. Obtenido de <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00706>
- Duan, Y. (2018). Tamsulosin and the risk of dementia in older men with benign prostatic hyperplasia. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 27(3):340-348.doi: 10.1002/pds.4361. .
- Dunn, C. J., Matheson, A., & Faulds, D. M. (2002). Tamsulosin: A Review of its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Management of Lower Urinary Tract Symptoms. *Drugs Aging*, 19 (2): 135-1611170-229X/02/0002-0135/\$25.00/0.
- Emam, M. A., & al. (2018). The Ameliorative Potential of Probiotics and/or Silymarin on Thioacetamide Induced Hepatotoxicity in Rats: Histological and Immunohistochemical Study. *Int. J. Morphol. vol.36 no.2 Temuco*, 36(2):661-669, doi.org/10.4067/S0717-95022018000200661 .
- Fabre, T., & al. (2014). IL-17A enhances the expression of profibrotic genes through upregulation of the TGF- β receptor on hepatic stellate cells in a JNK-dependent manner. *J Immunol*, 15;193(8):3925-33. doi: 10.4049/jimmunol.1400861.
- Fabre, T., & al. (2018). Type 3 cytokines IL-17A and IL-22 drive TGF- β -dependent liver fibrosis. *Sci Immunol*, 26;3(28):eaar7754. doi: 10.1126/sciimmunol.aar7754.

- Fabre, T., & al. (2018). Type 3 cytokines IL-17A and IL-22 drive TGF- β dependent liver fibrosis. *SCIENCE IMMUNOLOGY*, 3, eaar7754.
- Fallowfield, J. A., Jimenez-Ramos, M., & Robertson, A. (2021). Emerging synthetic drugs for the treatment of liver cirrhosis. *Expert Opin Emerg Drugs*, 26(2):149-163. doi: 10.1080/14728214.2021.1918099. Epub 2021 Apr 26.
- Friedman, S. (2003). Liver fibrosis – from bench to bedside. *Journal of Hepatology*, S38–S53.
- Friedman, S. L. (2008). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol Rev*, 88: 125–172, 2008;doi:10.1152.
- Gao, R., Peng, X., & al. (2021). Macrophage-derived netrin-1 drives adrenergic nerve-associated lung fibrosis. *J Clin Invest*, 131(1):e136542. doi: 10.1172/JCI136542.
- García-Corté, M., & al. (2005). Hepatotoxicidad secundaria a fármacos de uso común. *Gastroenterología y Hepatología*, Vol. 28. Núm. 8.páginas 461-472.
- Garrido, A., & Djouder, N. (2021). Cirrhosis: A Questioned Risk Factor for Hepatocellular Carcinoma. *Trends Cancer*, 7(1):29-36. doi: 10.1016/.
- Gatta, A., Verardo, A., & Bolognesi, M. (2012). Hypoalbuminemia . *Intern Emerg Med*, Oct;7 Suppl 3:S193-9. doi: 10.1007/s11739-012-0802-0.
- Geerts, A., Schellinck, P., Bouwens, L., & Wisse, E. (1988). Cell population kinetics of Kupffer cells during the onset of fibrosis in rat liver by chronic carbon tetrachloride administration . *J Hepatol*, 6:50-6.
- Gieseck 3rd, R. L., Wilson, M. S., & Wynn, T. A. (2018). Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nat Rev Immunol*, 18(1):62-76. doi: 10.1038/nri.2017.90.
- Granados, D. (2018). Encefalopatía hepática: síntomas y grados de una anomalía neuropsiquiátrica. *Elsevier Connect*.
- Grønbaek, H., Sandahl, T., & al. (2012). Soluble CD163, a marker of Kupffer cell activation, is related to portal hypertension in patients with liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*, 36(2):173-80. doi: 10.1111/j.1365-2036.2012.05134.x.

- Guan, Y., & Al. (2021). A human multi-lineage hepatic organoid model for liver fibrosis. *Nat Commun*, 22;12(1):6138. doi: 10.1038/s41467-021-26410-9.
- Gumicio, J. J., & Miller, D. L. (1981). Functional Implications of Liver Cell Heterogeneity. *GASTROENTEROLOGY*, 80:393-403.
- Gutiérrez, C., Lares, M., Sandoval, J., & Hernández, M. S. (2020). Aminoácidos de cadena ramificada: implicaciones en la salud. *Digital de Postgrado*, ISSN: 2244-761X.DOI: <https://doi.org/10.37910/RDP.2020.9.2.e224>.
- Heymann, F., & Tacke, F. (2016). Immunology in the liver — from homeostasis to disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology volume*, 13, pages88–110, doi.org/10.1038/nrgastro.2015.200.
- Higashi, T., Friedman, S. L., & Hoshida, Y. (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 121, 27–42. doi:10.1016/j.addr.2017.05.007 .
- Hoover, D. B., & Barron, S. E. (1982). Localization and Acetylcholinesterase Content of Vagal Efferent Neurons. *Brain Research* ,, 8(3), 279–284. doi:10.1016/0361-9230(82)90060-0 .
- Hynes, R. (2009). The extracelular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 326: 1216-1219.
- IMSS, I. M., & Kershenobich, D. (01 de 07 de 2015). *Cirrosis hepática*. Obtenido de Cirrosis hepática: <https://www.mexicosocial.org/cirrosis-hepatica/#:~:text=En%20M%C3%A9xico%20la%20cirrosis%20hep%C3%A1tica,es%20de%2050.3%20%2B12.0%20a%C3%B1os>.
- Injury, C. a.-I. (2012 Updated 2018). Tamsulosin. *LiverTox: Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>.
- Jensen, K. J., Alpini, G., & Glaser, S. (2013). Hepatic nervous system and neurobiology of the liver. *Compr Physiol.* , 3(2):655-65. doi: 10.1002/cphy.c120018.
- Kegg. (15 de 12 de 2022). *Tamsulosin*. Obtenido de <https://www.genome.jp/entry/D08560>
- Kendal, J. J., Alpini, G., & Glaser, S. (2013). Hepatic Nervous System and Neurobiology of the Live. *Compr Physiol.* , 3(2): 655–665. doi:10.1002/cphy.c120018.

- Khan, S., & Jamal, S. (2018). A study of serological markers and lipid profile in non-alcoholic liver cirrhosis patients. *Pak J Pharm Sci*, 31(1):89-93.
- Kisseleva, T., & Brenner, D. (2021). Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 18(3):151-166, DOI: 10.1038/s41575-020-00372-7.
- Krishna, M. (2014). Anatomía microscópica del hígado. *CLD Clinical Liver Disease (Hoboken)*, 109–112.10.1002/cld.287.
- Lafdil, F., Miller, A. M., Hwan Ki, S., & Gao, B. (2010). Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. *Review Cell Mol Immunol*, 7(4):250-4. doi: 10.1038/cmi.2010.5. Epub 2010 Mar 22.
- Le Vay, D. (2015). *Anatomía y fisiología humana*. Barcelona : Paidotribo.
- Lescoat, A., & al. (2020). Combined anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of JAK-inhibitors on macrophages in vitro and in vivo: Perspectives for scleroderma-associated interstitial lung disease. *Biochem Pharmacol*, 178:114103. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114103.
- Limdi, J., & Hyde, G. (2003). Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Med. J.*, 79:307–312.doi: 10.1136/pmj.79.932.307.
- Lira, m. l., & garcia-compean, D. (2016). ANATOMIA, FISILOGIA Y EXAMENES DE DIAGNOSTICO BIOQUIMICOS Y MORFOLOGICOS DEL HIGADO Y DE LAS VIAS BILIARES. *Researchgate*.
- Lira-Pedrin, M. A., & Garcia-Compean, D. (2016). ANATOMIA, FISILOGIA Y EXAMENES DE DIAGNOSTICO BIOQUIMICOS Y MORFOLOGICOS DEL HIGADO Y DE LAS VIAS BILIARES. *Gastroenterologia y Hepatologia*.
- Litin, S. (2018). *Mayo Clinic Family Health Book, Liver disease*. 5th Ed: Completely Revised and Updated, ISBN-13 978-1945564024.
- LLovet, J., & al. (2016). Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* , 2, 16018 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.18>.
- Manjunatha, R., Pundarikaksha, H. P., & al. (2016). A randomized, comparative, open-label study of efficacy and tolerability of alfuzosin, tamsulosin and silodosin in benign

prostatic hyperplasia. *Indian J Pharmacol.* , 48(2): 134–140. doi: 10.4103/0253-7613.178825.

Márquez-Aguirre, A. L., Galvez-Gastelum, F. J., Canales-Aguirre, A. A., & Gómez-Pinedo, F. J. (2010). Molecular aspects of hepatic encephalopathy Aspectos moleculares de la encefalopatía hepática. *Neurología (English Edition)*, [https://doi.org/10.1016/S2173-5808\(10\)70048-1](https://doi.org/10.1016/S2173-5808(10)70048-1).

Marrone, G., Shah, V. H., & Gracia-Sancho, J. (2016). Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. *Journal of Hepatology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.018>.

Martínez-Chantar, M. L. (2017). BIOLOGÍA DEL HEPATOCITO. 42° Congreso anual (pág. Group Leader Liver Disease Laboratory CICbioGUNE Technological Park of Bizkaia). Madrid: Asociación Española para el estudio de Hígado.

Mathurin, P., & al. (2011). Corticosteroids improve short-term survival in patients with severe alcoholic hepatitis: meta-analysis of individual patient data. *Gut*, 60:255-60.

Matsushima, H., Kamimura, H., Soeishi, Y., Watanabe, T., Higuchi, S., & Miyazaki, M. (1999). Plasma protein binding of tamsulosin hydrochloride in renal disease: role of α 1-acid glycoprotein and possibility of binding interactions. *Eur J Clin Pharmacol*, 55: 437-443.

McCuskey, R. S. (2004). Anatomy of efferent hepatic nerves. *THE ANATOMICAL RECORD, PART A* 280A:821-826 .

Meirelles-Júnior, R. F., & al. (2015). Liver transplantation: history, outcomes and perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*, 13(1):149-52. doi: 10.1590/S1679-45082015RW3164.

Melato, M., Sasso, F., & Zanconati, F. (1993). Liver cirrhosis and liver cancer. A study of their relationship in 2563 autopsies. *Zentralbl Pathol*, 139: 25–30.

Mikkelsen, M. R., & al. (2016). Alcoholic liver disease patients' perspective of a coping and physical activity-oriented rehabilitation intervention after hepatic encephalopathy. *J Clin Nurs*, 25(17-18):2457-67. doi: 10.1111/jocn.13265. .

Mizuno, K., & Ueno, Y. (2016). Autonomic Nervous System and the Liver. *Hepatology Research*, doi:10.1111/hepr.12760 .

- Montano-Loza, A. J., & Noble-Lugo, A. (17 de 11 de 2021). *La Revista de Gastroenterología de México* . Obtenido de La Revista de Gastroenterología de México : <http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es-consenso-mexicano-enfermedad-por-higado-articulo-S0375090618301794>
- MORENO, J. D. (2015). EVALUACIÓN DE LA FIBROSIS HEPÁTICA BASADA EN LA ELASTOGRAFÍA DE TRANSICIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA HABITUAL EN PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA POR VIRUS C. *Alcalá de Henares*.
- MORENO, J. D. (2015). EVALUACIÓN DE LA FIBROSIS HEPÁTICA BASADA EN LA ELASTOGRAFÍA DE TRANSICIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA HABITUAL EN PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA POR VIRUS C . *Alcalá de Henares*.
- Muñoz-Ortega, M. H., & al. (2016). Doxazosin Treatment Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Hamsters through a Decrease in Transforming Growth Factor β Secretion. *Gut and Liver*, 101-108.
- Murray, C., & Lopez, A. (1996). Evidence-based health policy – lessons from the Burden of Disease Study. *Science*, 274: 740-743.
- Neuhuber, W. L., & Tiegs, G. (2004). Innervation of Immune Cells: Evidence for Neuroimmunomodulation in the Liver. *THE ANATOMICAL RECORD PART A* , DOI 10.1002/ar.a.20093; 280A:884–892.
- Nickel, J. C., Sander, S., & Moon, T. D. (2008). A meta-analysis of the vascular-related safety profile and efficacy of α -adrenergic blockers for symptoms related to benign prostatic hyperplasia. *Int J Clin Pract.* , 62(10): 1547–1559. doi: 10.1111/j.1742-1241.2008.01880.x.
- Ochoa-Sanchez, R., & Rose, C. F. (2018). Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2018.08.001>.
- OMS, O. M. (09 de 12 de 2020). *Las 10 principales causas de defunción*. Obtenido de Las 10 principales causas de defunción: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

OPS/OMS. (12 de 04 de 2021). *Nuevo estudio de la OPS/OMS indica que 85 mil personas al año en las Américas pierden la vida exclusivamente por consumo de alcohol*. Obtenido de Nuevo estudio de la OPS/OMS indica que 85 mil personas al año en las Américas pierden la vida exclusivamente por consumo de alcohol:

<https://www.paho.org/es/noticias/12-4-2021-nuevo-estudio-opsoms-indica-que-85-mil-personas-al-ano-americas-pierden-vida>

Pellicoro, A., & al. (2014). Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature Reviews Immunology*, 14, pages181–194, doi.org/10.1038/nri3623.

Petrasek, J., & Al. (2012). IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(10):3476–3489. doi:10.1172/JCI60777.

Poo, J. L. (7 de junio de 2022). *Amigo del hígado* . Obtenido de EL PORTAL EDUCATIVO DE LA SALUD HEPÁTICA: <https://amhigo.com/mi-higado/anatomia>

Preton, R. R., Wilson, T. E., & Palacios Martinez, J. R. (2013). *Fisiología. L'Hospitalet de Llobregat*. Barcelona: Wolters Kluwer Health.

PubChem. (10 de 12 de 2022). *National Library of Medicine*. Obtenido de Tamsulosin: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/129211>

Rakoski, M., & al. (2018). Pain management in patients with cirrhosis. *Clin Liver Dis (Hoboken)*, 11(6): 135–140.doi: 10.1002/cld.711.

Ramírez Rico, G. (2013). FISIOLÓGÍA DEL HÍGADO II.

Reck de Jesus, S., & al. (2018). Association of anemia and malnutrition in hospitalized patients with exclusive enteral nutrition. *Nutr Hosp*, 35(4):753-760. doi: 10.20960/nh.1628.

Rezende-Anastácio, L., & Al. (2012). Weight loss during cirrhosis is related to the etiology of liver disease. *Arq Gastroenterol*, 49(3):195-8. doi: 10.1590/s0004-28032012000300005.

Rodríguez, A. (2006). Circulación hepática. En B. Derrickson, & G. Tortora, *Principios de Anatomía y Fisiología* (pág. 13ª Edición). México: Médica Panamericana.

Rodríguez, A. (14 de mayo de 2021). *Biblogteca*. Obtenido de Circulación portal hepática.: <https://biblogteca.com/circulacion-hepatica/>

- Roehlen, N., Crouchet, E., & Baumert, T. (2020). Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 9(4): 875. doi: 10.3390/cells9040875.
- Roesch-Dietlen, F., González-Santes, M., Sánchez-Maza, Y., Díaz-Roescha, F., Cano-Contreras, A., Amieva-Balmori, M., . . . Salgado-Vergara, L. (2021). Influence of socioeconomic and cultural factors in the etiology of cirrhosis of the liver. *Gastroenterología de México*, 28-35.
- Röhrig, G., Becker, I., Polidori, M. C., Schulz, R.-J., & Noreik, M. (2015). Association of anemia and hypoalbuminemia in German geriatric inpatients: Relationship to nutritional status and comprehensive geriatric assessment. *Z Gerontol Geriatr*, 48(7):619-24. doi: 10.1007/s00391-015-0872-5. Epub 2015 Apr 16.
- Rossi, M., & Roumeguère, T. (2010). Silodosin in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Drug Des Devel Ther*, 4: 291–297. doi: 10.2147/DDDT.S10428.
- Sanya, A., & al. (2010). Pioglitazoe, vitamina , or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.*, 3621675-85.
- Sarema, M., Znidaka, R., Macías, M., & Rey, R. (2006). Las células estrelladas del hígado: su importancia en condiciones normales y patológicas. *Gastroenterol Hepato*, 29(2):93-101.
- Sarin, S. K., & Maiwall, R. (1 de septiembre de 2021). *World Gastroenterology Organisation Global Guardian of Digestive Health. Serving the World*. Obtenido de World Gastroenterology Organisation Global Guardian of Digestive Health. Serving the World.: <https://www.worldgastroenterology.org/publications/e-wgn/e-wgn-expert-point-of-view-articles-collection/global-burden-of-liver-disease-a-true-burden-on-health-sciences-and-economies>
- secsefap. (22 de 10 de 2022). *Sociedad Española de Farmaceutico de Atencion Primaria*. Obtenido de Tamsulosina y riesgo de hipotensión grave: <https://www.sefap.org/2014/01/15/tamsulosina-y-riesgo-de-hipotension-grave/#:~:text=En%20conclusi%C3%B3n%2C%20el%20tratamiento%20con,iniciar%20%20retomar%20el%20tratamiento.>

Serna-Salas, S. A., & al. (2021). α -1 Adrenergic receptor antagonist doxazosin reverses hepatic stellate cells activation via induction of senescence. *Mech Ageing Dev.*, 201:111617. doi: 10.1016.

Serna-Salas, S. A., & al. (2018). Doxazosin and Carvedilol Treatment Improves Hepatic Regeneration in a Hamster Model of Cirrhosis. *Hindawi BioMed Research International*, Article ID 4706976, 11 pages <https://doi.org/10.1155/2018/4706976>.

Sibulesky, L. (2013). Anatomía normal del hígado. *Clinical Liver Disease, Vol 2, No S4*, doi: 10.1002/cld.124.

Sigala, B., & al. (2013). Sympathetic Nervous System Catecholamines and Neuropeptide Y Neurotransmitters Are Upregulated in Human NAFLD and Modulate the Fibrogenic Function of Hepatic Stellate Cells. *PLoS ONE*, 8(9): e72928.

Silvera-Arenas, L. A., & B. d. (2002). La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte. Barranquilla*, 16: 9-18, .

Soeters, P. B., Wolfe, R. R., & Shenkin, A. (2019). Hypoalbuminemia: Pathogenesis and Clinical Significance. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 43(2):181-193. doi: 10.1002/jpen.1451. .

Song, C., & Al. (2016). Fluorofenidone attenuates pulmonary inflammation and fibrosis via inhibiting the activation of NALP3 inflammasome and IL-1 β /IL-1R1/MyD88/NF- κ B pathway. *SaveEmailSend to*, 20(11):2064-2077. doi: 10.1111/jcmm.12898. .

Stanger, B. Z. (2015). Cellular Homeostasis and Repair in the Mammalian Liver. *Annual Review of Physiology*, 77(1), 179–200. doi:10.1146/annurev-physiol-021113-170255 .

Steib, C. J., & Gerbes, A. L. (2010). Signaling Pathways in Liver Diseases Kupffer Cells. En J. Dufour, & P. Clavien, *Signaling Pathways in Liver Diseases* (págs. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00150-5_4). Berlin, Heidelberg: Springer.

Sun, L., Sun, C., & al. (2021). Tamsulosin attenuates high glucose- induced injury in glomerular endothelial cells. *Bioengineered*, 12:1, 5184-5194, DOI: 10.1080/21655979.2021.1955527.

- Tan, Z., & Al. (2013). IL-17A plays a critical role in the pathogenesis of liver fibrosis through hepatic stellate cell activation. *J Immunol*, 15;191(4):1835-44. doi: 10.4049/jimmunol.1203013. Epub 2013 Jul 10.
- Torre-Delgadillo, A., & Kershenobich, D. (2012). *Hepatología*. D.F., México: Zarpra.
- Trefts, E., & al. (2017). The liver. *Curr Biol.*, 6;27(21):R1147-R1151. doi: 10.1016/j.cub.2017.09.019.
- Vernon, G., Baranova, A., & Younossi, Z. (2011). Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*, 34: 274–285.
- Wang, W.-J., & al. (2019). Endometrial TGF- β , IL-10, IL-17 and autophagy are dysregulated in women with recurrent implantation failure with chronic endometritis. *Reprod Biol Endocrinol.*, 3;17(1):2. doi: 10.1186/s12958-018-0444-9.
- Wang, Y., Tu, K., Liu, D., & al. (2019). p300 Acetyltransferase Is a Cytoplasm-to-Nucleus Shuttle for SMAD2/3 and TAZ Nuclear Transport in Transforming Growth Factor β -Stimulated Hepatic Stellate Cells. *Hepatology.* , 70(4): 1409–1423. doi: 10.1002/hep.30668.
- Whitney, J. (febrero de 2020). *Generalidades sobre los trastornos vasculares del hígado*.
Obtenido de MANUAL MSD VERSION PARA PROFESIONAL:
<https://www.msdmanuals.com/es/professional/trastornos-hep%C3%A1ticos-y-biliares/trastornos-vasculares-del-h%C3%ADgado/generalidades-sobre-los-trastornos-vasculares-del-h%C3%ADgado>
- Wojciech, P., & Ross, M. H. (2016). *Histología texto y atlas color Biología Celular y Molecular*. Panamericana.
- Xu, F., Liu, C., Zhou, D., & Zhang, L. (2016). TGF- β /SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. *J Histochem Cytochem*, 64(3):157-67. doi: 10.1369/0022155415627681.
- Xu, H. (2020). EGF neutralization antibodies attenuate liver fibrosis by inhibiting myofibroblast proliferation in bile duct ligation mice. *Histochem Cell Biol*, 154(1):107-116. doi: 10.1007/s00418-020-01867-9. .

- Yang, J.-J., Yang, Y., Zhang, C., & al. (2020). Epigenetic silencing of LncRNA ANRIL enhances liver fibrosis and HSC activation through activating AMPK pathway. *J Cell Mol Med.* , 24(4): 2677–2687. doi: 10.1111/jcmm.14987.
- Ye, F., & al. (2022). The burden of liver cirrhosis in mortality: Results from the global burden of disease study. *Frontiers in Public Health*, 909455doi.org/10.3389/fpubh.
- Yi, C.-X., la Fleur, S. E., Fliers, E., & Kalsbeek, A. (2010). The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism. *Biochim Biophys Acta.*, 1802(4):416-31. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.01.006. Epub 2010 Jan 11. PMID: 20060897.
- Yuan, X., Hai-Ping, H., Hong, W., Zhao-Xian, W., & Guang-Ji, W. (2013). Reversing effects of silybin on TAA-induced hepatic CYP3A dysfunction through PXR regulation. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11(6): 0645–0652.
- Zhang, X., & Yuan, S. (2021). ANGPTL4 regulates CD163 expression and Kupffer cell polarization induced cirrhosis via TLR4/NF- κ B pathway. *Experimental Cell Research*, 15;405(2):112706. doi: 10.1016/j.yexcr.2021.112706.





Capítulo 10
Apéndice

Apéndice

a. Inclusión de los tejidos en parafina

Los tejidos fueron colocados en casetes para tejidos. Posteriormente fueron montados en histuquinet que consiste en realizar un ciclo de 12 horas en 12 etapas con el fin de hidratar, deshidratar y la inclusión en parafina para cortarlos en microtomo. Observa las etapas en la siguiente tabla.

Tabla 2 El proceso de montaje en el equipo histuquinet para hidratar, deshidratar y incluir los tejidos para el corte.

Etapas	compuestos	Tiempo
1	Agua destilada	1 hora
2	Alcohol 70%	1 hora
3	Alcohol 80%	1 hora
4	Alcohol 96%	1 hora
5	Alcohol 96%	1 hora
6	Alcohol 100%	1 hora
7	Alcohol 100%	1 hora
8	Alcohol-xilol 1:1	1 hora
9	Xilol 100%	1 hora
10	Xilol 100%	1 hora
11	parafina	1 hora
12	parafina	1 hora

Tras terminar las 12 etapas los tejidos fueron sacado del casete colocando un bloque de parafina usando el equipo de inclusión para después realizar los cortes micrométricos en microtomo.

b. Silanización de las laminillas

Tabla 3: el proceso de silanización de las laminillas

Reactivo	Volumen	Tiempo
acetona	200 ml	5 minutos
Acetona-Silano al 3%	200 ml	5 minutos
Agua destilada	200 ml	Dos lavados/minutos

c. La técnica de la tinción Hematoxilina-Eosina

Las laminillas fueron colocadas en diferentes compuestos a diferentes tiempos.

Etapa	Compuesto	baño	Tiempo
1	xilol	2	10 minutos
2	Alcohol 100%	2	5 minutos
3	Alcohol 96%	2	5 minutos
4	Agua destilada	1	5 minutos
5	Hematoxilina	1	20 segundos
6	Agua corriente	3	1 minutos
7	PBS	1	5 minutos
8	Eosina	1	1 minutos y 20 s
9	Alcohol 96%	2	5 minutos
10	Alcohol 100%	2	5 minutos
11	xilol	2	10 minutos

Posteriormente las laminillas fueron montadas con entellan.

d. Técnica de la tinción de Rojo Sirio

Las laminillas fueron colocadas en diferentes compuestos a diferentes tiempos.

Etapa	Compuesto	Baño/incubación	Tiempo
1	xilol	2	7 minutos
2	Alcohol 100%	2	5 minutos
3	Alcohol 96%	2	5 minutos
4	Agua destilada	1	3 minutos
5	Hematoxilina de Weigert	1	8 minutos
6	Agua corriente	3	1 minutos
7	PBS	1	5 minutos
8	Rojo sirio picro	1	1 hora
9	Agua acidilada	2	segundos
10	Alcohol 96%	2	45 segundos
11	Alcohol 100%	2	2 minutos
12	xilol	2	7 minutos

Posteriormente las laminillas fueron montadas con entellan.

Nota:

La Hematoxilina de Weigert fue preparada con dos soluciones en una proporción de 1:1. una solución A que contiene 1 gr. de cristal de Hematoxilina en 100 m de alcohol al 96% y una solución B que contiene 4 ml de cloruro férrico, 1 ml de ácido clorhídrico concentrado un 95 ml de agua destilada.

El agua acidilada fue preparada con 5 ml de ácido glacial en 1 litro de agua destilada.

La solución de Rojo Sirio-Picro fue prepara con 0.5 gr de Rojo Sirio de la marca Sigma-Aldrich 365548 en 500 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico de la marca Sigma.

e. Inmunohistoquímica

I. Desparafinización.

Las laminillas fueron colocadas en diferentes compuestos a diferentes tiempos para quitar el exceso de parafina.

Etapa	Compuesto	Baño/incubación	Tiempo
1	xilol	2	7 minutos
2	Alcohol 100%	2	7 minutos
3	Alcohol 96%	2	7 minutos
4	Alcohol 70%	1	5 minutos
5	Agua corriente	1	5 minutos

II. Desenmascaramiento de epítomos.

1. Se colocó dentro de la olla 1.5 litros de buffer de citrato de sodio y se encendió la olla.
2. Se dejó que la presión de la olla suba a lo máximo, en seguida, se apagó la olla y se debió permitir que se enfrié, para poder abrir la tapa.
3. Se introdujo las laminillas en un porta-laminillas de metal dentro de la olla, procurando que queden completamente cubiertas por el buffer.
4. Se encendió de nuevo la olla hasta que gane presión, se contaron dos minutos a partir de que salga el vapor y se apagó la olla dejando las laminillas reposar 15 minutos.

III. Se lavó con PBS (3 veces/5 min).

IV. Inactivación de las peroxidasas endógenas.

Las laminillas fueron colocdas en una solución de metanol-H₂O₂ al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente

V. Se lavó con PBS (3 veces/5 min).

VI. Alrededor del tejido de interés marcar círculos con el pen PAP.

VII. Permeabilización de la membrana.

Se lavó con PBS-Tritón X-100 0.2% (1 vez/30 min).

VIII. Bloqueo de uniones inespecíficas.

Incubar las laminillas 1 hora a temperatura ambiente con Suero Fetal de Bovino 20% en PBS-Tritón X-100 0.2%

IX. Primer anticuerpo.

Se incubó el primer anticuerpo durante toda la noche en cámara húmeda 4 °C. El anticuerpo Anti-NF- κ B se diluye 1:100 en PBS-Tritón X-100 0.2%- Suero bobino Fetal o bobino al 0.5%

X. Se lavó con PBS-Tritón X-100 0.2% (3 veces/5 min).

XI. Segundo anticuerpo.

Se incubó con el anticuerpo secundario unido a HRP diluido en PBS + 0.5% Suero Fetal Bovino, durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.

XII. Se lavó con PBS (3 veces/5 min).

XIII. Se Incubó con DAB (diluido 1:10 con buffer).

Hasta que se desarrolle el color. Los restos de DAB inactivarlos en una solución clorada.

XIV. Se lavó con PBS (3 veces/5 min).

XV. Se contrastó con hematoxilina durante 1 minuto.

XVI. Se lavó con agua corriente (3 veces/5 min).

XVII. Deshidratación del tejido.

- Etanol 100% (1 vez/10 minutos)
- Xileno (2 veces/15 minutos)

XVIII. Cubrir el tejido con Entellan, procurando no dejar burbujas. (Ventura-Juárez et al., 2002).

f. Extracción de RNA

- En un tubo de 2 ml de fondo plano se colocó una muestra de tejido guardada en RNA later, se agregó 400 µL de trizol reagen y se tritulo durante 5 minutos.
- Se centrifugó a 10000 RPM/min minutos a 4°C durante 10.
- Se separó el sobre nadante del precipitado colocándolo en un tubo cónico de 2 ml.
- Se agregó 400 µL de etanol se vortexeó rigurosamente durante 30 segundos.
- Se pasó los 800 µL de la mezcla en un tubo con columna.
- Se centrifugar por 30 segundos (*con los rpm más altos de la centrifuga*) eliminar el liquido
- Se descartó el líquido de la columna
- Se agregó 400 µL de la solución pre-wash y se centrifugó por 30 segundos y se descartó liquido de la columna.
- Se agregó 700 µL de buffer wash, se centrifugó por 2 minutos. Se descartó el líquido de la columna
- se recentrifugó por 2 minutos y se descartó el tubo junto con el líquido.

- Se colocó la columna en un tubo nuevo y agregar 30 μL de agua libre de nucleasas
- Se centrifugó por 45 segundos
- Se recolectó el ARN y se le colocó en hielo
- Se Dividió el ARN en dos tubos con 15 μL c/u
- Se cuantificó las muestras en BioDrop mLITE:
- Se colocó 1 μL de agua libre de nucleasas como blanco
- Se colocó 1 μL de cada muestra y se anotó la concentración ($\text{ng}/\mu\text{L}$) y pureza del ARN (260/230) y (260/280).
- Finalmente se almacenó -80°C en ultra congelador.

g. Retrotranscripción de RNA a cDNA

- Se preparó una solución usando 1 μg de RNA, 1. μl de oligo DT. Se ajustó a volumen final 12 μl con agua libre de nucleasas.
- Se centrifugó por 10 segundos para obtener el volumen inicial
- Se colocó la solución en un tubo de eppendorf se llevó a termociclador a 65°C por 5 minutos, al sacarlo se colocó nuevamente en hielo.
- Se preparó la solución de transcripción inversa agregando
 - 4 μl de buffer reacción GoScript™ 5X
 - 1 μl inhibidor
 - 2 μl de solución mix de DNTP.
 - 1 μl de retrotranscriptasa

Obteniendo un volumen final de 20 μl

- Se llevó nuevamente el tubo para incubación al termociclador a 65°C por 1 hora y 10 minutos.
- Se sacó la muestra y se guardó -20°C

g. Extracción y cuantificación de RNA

Se extrajo y cuantifico el RNA para después realizar el PCR en tiempo real.



Grupo	lote	La concentración del RNA en ng/ul	Absorbancia 260/230	Absorbancia 260/280
Placebo	1	100	0.604	1.488
	2	132	0.912	1.755
	3	110-4	1.423	1.971
	4	124.8	1.545	1.902
	5	1363.2	1.799	1.893
Tamsulosina 11 µg/kg	1	888.8	0.551	1.601
	2	75	0.414	1.516
	3	348.8	0.736	1.758
	4	745.6	1.572	1.902
	5	671.2	1.232	1.873
Tamsulosina 93 µg/kg	1	1735.2	2.106	1.852
	2	1168.8	1.943	1.824
	3	1783.2	1.910	1.770
	4	2320.0	1.636	1.255
	5			
Cirrótico	1	355.2	1.175	1.707
	2	576	1.358	1.791
	3	1408.0	2.120	1.938

Tabla 1. Se observa la concentración de RNA que se obtuvo en la extracción.

