



Centro de Ciencias Básicas

Doctorado en Ciencias Biológicas

Tesis que presenta M. en C. **Yesenia Danyeli Navarro González**
para optar por el grado de doctor en ciencias:

**“PAPEL DE LA VASOPRESINA EN LA FIBROGÉNESIS
HEPÁTICA EN RATA CON ANASTOMOSIS PORTO-CAVA
CRÓNICA”**

Tutor:

Dr. Andrés Quintanar Stephano
Universidad Autónoma de Aguascalientes
aquinta@correo.uaa.mx

Cotutor

Dr. Javier Ventura Juárez
Universidad Autónoma de Aguascalientes
jventur@correo.uaa.mx

Asesor

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega
Universidad Autónoma de Aguascalientes
martinenol@correo.uaa.mx

Aguascalientes, Ags., 09 de junio de 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

JORGE MARTIN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
PRESENTE

Por medio de la presente como **Miembros del Comité Tutoral** designado de la estudiante **Yesenia Danyeli Navarro González** con ID 118336 quien realizó el trabajo de tesis que lleva como nombre: **PAPEL DE LA VASOPRESINA EN LA FIBROGÉNESIS HEPÁTICA EN RATA CON ANASTOMOSIS PORTO-CAVA CRÓNICA** un trabajo innovador, propio 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 pueda ser impresa así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 08 de junio de 2023

Dr. Andrés Quintanar Stephano
Tutor de tesis

Dr. Javier Ventura Juárez
Cotutor de tesis

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaria técnica del programa de posgr

Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 13-jun-23

NOMBRE: Yesenia Danyeli Navarro González **ID** 118336

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, MODALIDAD DIRECTA **LGAC (del posgrado):** A RESPUESTA INMUNE, EN LA PLASTICIDAD CELULAR Y LA SEC

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo práctico

TÍTULO: "PAPEL DE LA VASOPRESINA EN LA FIBROGÉNESIS HEPÁTICA EN RATA CON ANASTOMOSIS PORTO-CAVA CRÓNICA"

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

El trabajo incide sobre seguridad humana, agentes tóxicos y procesos contaminantes

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

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

<input type="checkbox"/> SI	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
<input type="checkbox"/> SI	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
<input type="checkbox"/> SI	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
<input type="checkbox"/> SI	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
<input type="checkbox"/> SI	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
<input type="checkbox"/> SI	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
<input type="checkbox"/> SI	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
<input type="checkbox"/> NO	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

<input type="checkbox"/> SI	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
<input type="checkbox"/> SI	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
<input type="checkbox"/> SI	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
<input type="checkbox"/> NO	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
<input type="checkbox"/> SI	Coincide con el título y objetivo registrado
<input type="checkbox"/> SI	Tiene congruencia con cuerpos académicos
<input type="checkbox"/> SI	Tiene el CVU del Conacyt actualizado
<input type="checkbox"/> SI	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

<input type="checkbox"/> SI	Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
<input type="checkbox"/> SI	El estudiante es el primer autor
<input type="checkbox"/> SI	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
<input type="checkbox"/> SI	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
<input type="checkbox"/> SI	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
<input type="checkbox"/> SI	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
 No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. DANIEL CERVANTES GARCÍA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN SUAREZ BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. JUAN JAUREGUI RINCÓN

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFEREZ 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.

Received 12 November 2021 | Revised 25 February 2022 | Accepted 6 March 2022

DOI: 10.1111/ijp.12576

ORIGINAL ARTICLE

INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY WILEY

Arginine vasopressin deficiency and conivaptan (a V1a-V2 receptor antagonist) treatment reverses liver damage and fibrosis in rats with chronic portocaval anastomosis

Yesenia Danyeli Navarro-Gonzalez¹ | Javier Ventura-Juarez² |
 Martin Humberto Muñoz-Ortega³ | Daniel González-Blas⁴ |
 Argelia Calvillo-Robedo¹ | Manuel Enrique Avila-Blanco² |
 Fernando Valdez-Urias¹ | Andrés Quintanar-Stephano¹

¹Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

²Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

³Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

⁴Departamento de Psicología, Hospital General ISSSTE, Aguascalientes, Mexico

Correspondence

Andrés Quintanar-Stephano, Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad, No. 840, Colonia: Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Ags. México, C.P. 20100, Mexico.
 Email: aqst@uaa.mx

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Number: 241312, A1-S-21375 (MMO) and 221262 (AQ); Universidad Autónoma de Aguascalientes, Mexico, Grant/Award Number: FIV19-2 (AQ) and FIB19-11N (MMO)

Abstract

Arginine vasopressin (AVP) is a naturally occurring hormone synthesized in the hypothalamus. AVP demonstrates pro-fibrotic effects as it stimulates hepatic stellate cells to secrete transforming growth factor- β (TGF- β) and collagen. Previous work in liver cirrhotic (CCl₄-induced) hamsters demonstrated that AVP deficiency induced by neurointermediate pituitary lobectomy (NIL) can restore liver function. Therefore, we hypothesized that liver fibrosis would decrease in portocaval anastomosis (PCA) rats, which model chronic liver diseases, when they are treated with the V1a-V2 AVP receptor antagonist conivaptan (CV). In this study, changes in liver histology and gene expression were analysed in five experimental groups: control, PCA, NIL, PCA+NIL and PCA+CV, with NIL surgery or CV treatment administered 8 weeks after PCA surgery. Body weight gain was assessed on a weekly basis, and serum liver function, liver weight and liver glycogen content were assessed following euthanasia. Most PCA-induced phenotypes were reverted to normal levels following AVP-modelled deficiency, though hypoglycemia and ammonium levels remained elevated in the PCA+CV group. Liver histopathological findings showed a significant reversal in collagen content, less fibrosis in the triad and liver septa and increased regenerative nodules. Molecular analyses showed that the expression of fibrogenic genes (TGF- β and collagen type I) decreased in the PCA+CV group. Our findings strongly suggest that chronic NIL or CV treatment can induce a favourable microenvironment to decrease liver fibrosis and support CV as an alternative treatment for liver fibrosis.

KEYWORDS

arginine vasopressin, conivaptan, cytokines, liver fibrosis, portocaval anastomosis



Physiology | Free Access

The protective effect of vasopressin deficiency in liver fibrosis in rats with chronic portocaval anastomosis

Yesenia Danyeli Navarro González, Andrés Quintanar Stephano, Javier Ventura-Juárez, Martín Humberto Muñoz Ortega, Daniel González-Blas, Manuel Tinajero-Ruelas

First published: 18 April 2020 | <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.05884>

TOOLS SHARE

Abstract

Liver fibrosis occur in liver diseases and its complications is cause of the increased rate of human mortality. The disease is characterized by the gradual accumulation of scar tissue in the liver parenchyma with decrease in metabolic capacity and liver failure. It is known that arginine vasopressin (AVP) participate in the regulation of the immune responses, including the scarring. However, the effect of how AVP regulates this process is not clear. Here we study the role of the AVP deficiency induced by the neurointermediate pituitary lobectomy (NIL) in rats with chronic anastomosis portocaval (APC) model (sixteen weeks). Groups of young male Wistar rats of 8–10 each were prepared: Sham operated (SHAM), APC, LNI and APC+NIL. Blood, plasma and serum biochemical variables were assessed: prothrombin time (TP), blood NH₃, transaminases (TGO and TGP), bilirubins and γ-Glutamyl Transpeptidase (GGT). Liver histological slides were stained with H-E, Masson, Sirius Red and PAS. Results showed that in the APC group: the TP, NH₃, TGO and TGP, bilirubins and GGT were significantly increased, whereas serum glucose levels, cholesterol, triglycerides, albumin, total proteins and the liver glycogen content where significantly augmented. Comparisons between SHAM and NIL groups did not shown significant differences in all these variables. As compared with the APC, the APC+NIL group developed a significant improvement in all these variables. The liver histopathology showed that the APC group developed a significant increase in fibrosis septa, inflammatory infiltrates and diminution of the glycogen content. The NIL group we do not have available data yet. In the NIL+APC group histology data showed a significant liver regeneration; less fibrosis, disappearance of inflammatory infiltrates and liver glycogen restoration.

Conclusions

Results indicate the AVP play a role in liver fibrosis (demonstrated by the AVP deficiency). Results also suggest that AVP antagonists may be used for liver fibrosis treatment.

Support or Funding Information

Universidad Autónoma de Aguascalientes PIFF14-1 andCONACYT 221262. México

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, al Doctorado en Ciencias Biológicas por la oportunidad de cursar este posgrado el cual pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Agradezco a mi tutor el Dr. Andrés Quintanar Stephano, quien me ofreció su apoyo y un lugar en el laboratorio que él dirige: “Laboratorio de Neuroinmunoendocrinología” con el proyecto de investigación UAA-PIFF 19-2 y CONACYT 221262.

A mis cotutores el Dr. Javier Ventura Juárez y el Dr. Martin Humberto Muñoz Ortega quienes me ofrecieron su apoyo con excelente calidad humana, excelentes profesores y excelentes personas.

También quiero agradecer a mis compañeros de Doctorado por su apoyo y su motivación, fuimos un excelente equipo de trabajo y construimos también una bonita amistad.

A mis padres y a toda mi familia por apoyarme en cada decisión y proyecto, porque son lo más sagrado que tengo en la vida, son siempre los principales motivadores y los formadores de lo que hasta hoy soy como persona; y cada día doy gracias a Dios por tenerlos conmigo, disfrutando de su compañía que es siempre tan cálida y reconfortante. Gracias papás, gracias hermanos, los amo infinito.

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a mis Padres a quienes admiro y amo profundamente, no me alcanzan las palabras para expresar todo mi agradecimiento por la vida y la familia tan maravillosa que hemos formado; siempre unidos, siempre juntos. En mi memoria solo hay recuerdos bellos del esfuerzo tan grande que hacían por darnos lo mejor a mí y a mis hermanos, ahora que soy mayor me doy cuenta de que no es fácil ser padre, y que tengo a los mejores del mundo.

Me enseñaron la responsabilidad, porque nunca faltaron a su trabajo; me mostraron que la vida a veces es dura, que pasas por cosas tristes, pero nunca me dejaron a un lado; me mostraron su fuerza para seguir adelante después de una pérdida tan grande, me enseñaron a amar al prójimo porque siempre fueron bondadosos, me mostraron cómo amar y respetar a mis hermanos porque amor y risas nos sigue sobrando. Gracias por su paciencia, por todo su esfuerzo y por permitirme no tener miedo y, a la vez, gracias por nunca soltarme, los amo.

A mis hermanos tan increíbles y únicos, les agradezco eternamente que siempre estemos unidos, tuve la suerte de compartir toda mi vida con personas que, aunque tenemos personalidades diferentes, nos entendemos, nos divertimos y nos amamos. Gracias por darme apoyo emocional durante este proceso de tesis, quiero que se sientan orgullosos de mí como yo me siento de ustedes. Una mención especial a mi hermano José que me ve y me cuida desde el cielo, tu cuerpo se ha ido hermano, pero en mi corazón y en el de toda nuestra familia jamás morirás, siempre permanecerás a nuestro lado.

A mi esposo Gilberto quiero agradecerle mucho porque su ayuda ha sido fundamental para este proyecto, y sé que lo seguirá siendo en el futuro, gracias por permitirme con paciencia y amor desarrollarme profesionalmente; has estado conmigo en todo momento motivándome y ayudándome a completar mis tareas, eres el mejor compañero que la vida me pudo regalar, eres mi felicidad, mi mejor amigo y la única persona con la que deseo estar siempre. Te amo.

INDICE GENERAL

Contenido	Pag.
Resumen	10
Abstract	11
Introducción	12
Características de la Hormona Arginina Vasopresina	12
Receptores de AVP.....	13
Funciones de los receptores de vasopresina en el organismo.....	15
Antagonista selectivo de los receptores de vasopresina (Conivaptán).....	15
Características funciones y morfológicas del hígado.....	16
Células implicadas en las funciones del hígado	16
Hepatocitos.....	16
Células estelares hepáticas (CEH).....	19
Células de Kupffer.....	22
Células endoteliales hepáticas.....	22

Proceso de inicio del daño en las diversas enfermedades hepáticas.....	23
Papel del TGF-β en la fibrogénesis hepática.....	24
Modelo de anastomosis porto cava.....	25
Modelo de lobectomía neurointermedia hipofisiaria (LNI) en la rata.....	27
Efectos de la LNI en la rata	27
Papel del sistema neuroinmunoendocrino en la enfermedad hepática.....	27
Marcadores bioquímicos y moleculares de daño hepático.....	28
Marcadores séricos.....	28
Marcadores moleculares.....	29
Antecedentes.....	31
Justificación.....	35
Hipótesis.....	36
Objetivos.....	37
Material y métodos.....	38
Resultados	48
Discusión.....	65
Conclusiones.....	69

Glosario.....	70
Referencias.....	74
Anexos.....	90



INDICE DE TABLAS

Contenido	Pág.
Tabla 1. Reactivos y métodos para la determinación de pruebas de función hepática.....	43
Tabla 2. Secuencias de los Oligonucleótidos.....	46
Tabla 3. Análisis morfométrico de los diferentes grupos experimentales al final del experimento.....	51
Tabla 4. Principales cambios histopatológicos estromales y celulares en hígados de los diferentes grupos experimentales.....	61

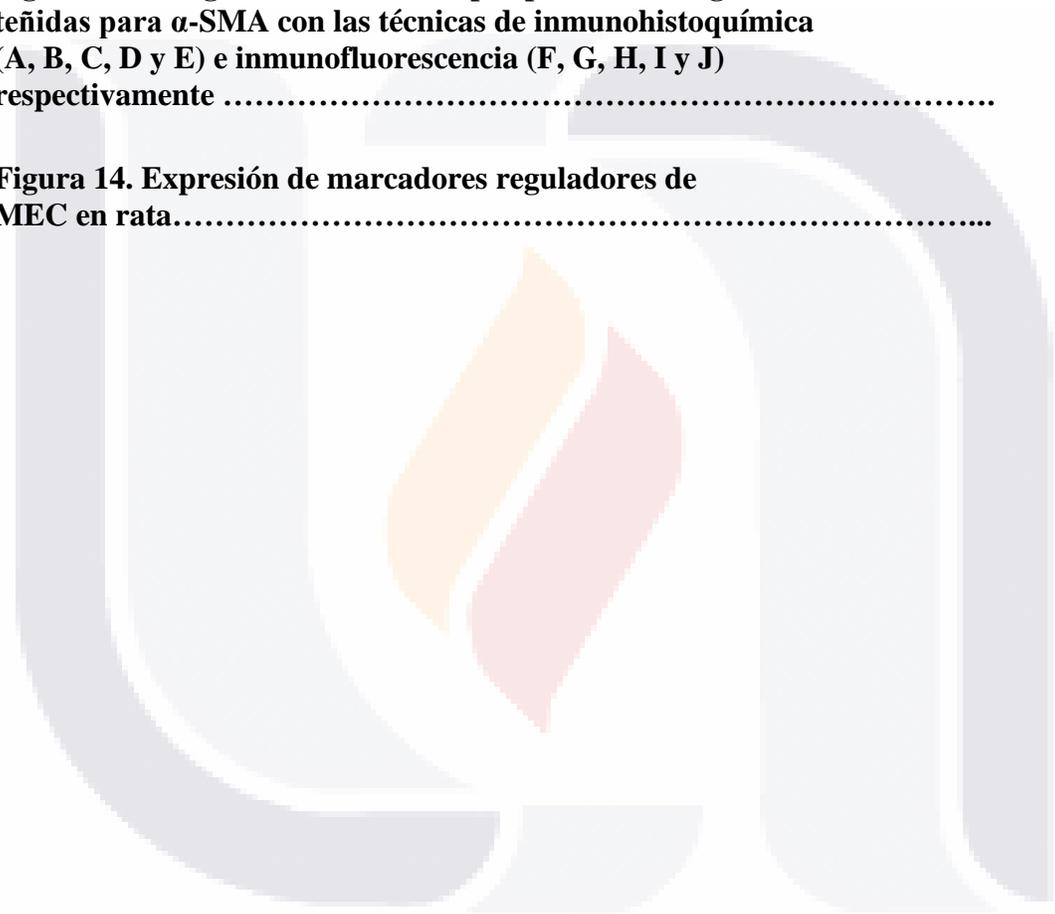
ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Pag.
Figura 1. Fisiología de la Arginina Vasopresina y sus receptores en el organismo.....	12
Figura 2. Vías de señalización de los receptores V1 y V2 de vasopresina.....	14
Figura 3. Representación esquemática de la zonación metabólica del hígado.....	19
Figura 4. Procesos implicados en la activación de las CEH.....	20
Figura 5. Mecanismos implicados en la activación de las células estelares hepáticas (CEH).....	21
Figura 6. Diseño experimental.....	38
Figura 7. Estandarización de la APC y la LNI en rata.....	49
Figura 8. Efectos del tratamiento con APC, LNI, PCA+LNI y APC+CV sobre el peso corporal semanal	50
Figura 9. Efectos comparativos entre los grupos control, APC, LNI, APC+LNI Y APC+CV sobre las pruebas bioquímicas séricas y sanguíneas del funcionamiento hepático.....	53
Figura 10. Comparación de los efectos de la APC, LNI, APC+LNI y APC+CV sobre la histología hepática.....	57
Figura 11. Comparación de los efectos de la APC, LNI, APC+LNI y APC+CV sobre la histología hepática periportal	59

Figura 12. Fotografías de laminillas de hígado teñidas con rojo sirio tomadas bajo luz polarizada de las áreas periportales de todos los grupos: Control (A), APC (B), LNI (C), APC+NIL (D) y APC+CV (E). 60

Figura 13. Fotografías de las áreas periportales de hígado teñidas para α -SMA con las técnicas de inmunohistoquímica (A, B, C, D y E) e inmunofluorescencia (F, G, H, I y J) respectivamente 62

Figura 14. Expresión de marcadores reguladores de MEC en rata..... 64



ACRÓNIMOS

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AH	Arteria hepática
ALT	Alanino aminotransferasa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANF	Péptido natriurético auricular
APC	Anastomosis porto cava
AST	Aspartato aminotransferasa
AT II	Angiotensina II
AVP	Arginia Vasopresina
Ca⁺²	Calcio
CB	Conducto biliar
CCl₄	Tetracloruro de carbono
CE	Células endoteliales
CEH	Células estelares hepáticas
Cit P450	Citocromo P450
Ckt	Citoqueratinas
CV	Conivaptán
DMSO	Dimetilsulfóxido
EH	Encefalopatía hepática

ET-1	Endotelina I
GTP	Guanosil trifosfato
H&E	Hematoxilina- eosina
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IP3	Inositol trifosfato
LH-RH	Hormona liberadora de gonadotropina
LNI	Lobectomia Neurointermedio Hipofisiaria
LPS	Lipopolisacáridos
LR	Receptor de complemento
MCP-1	Proteína quimio atrayente de monocitos 1
MEC	Matriz extracelular
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad II
MMP	Metaloproteasa
n-CAM	Molécula de adhesión de células neurales
NH4	Amonio plasmático
NK	Células asesinas naturales
NKT	Células T asesinas naturales
NO	Óxido Nítrico

PAMP's	Patrones de reconocimiento asociado a patógenos.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMN	Polimorfonucleares
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SR	Receptor scavenger
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TIMP	Inhibidor tisular de las metaloproteinasas
TLR	Receptor tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
V1	Receptor de vasopresina V1
V2	Receptor de vasopresina V2
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VP	Vena porta
α-SMA	Alfa actina de musculo liso

RESUMEN

Las enfermedades hepáticas se caracterizan por la aparición descontrolada de fibras de colágeno en el parénquima hepático, situación que conduce a insuficiencia hepática y cirrosis. Se ha demostrado que las células inmunes poseen receptores de arginina vasopresina (AVP) y que esta hormona posee efectos inmunestimulantes, y que su deficiencia induce reversión de la fibrosis. En esta tesis, se propone que el bloqueo específico de los receptores de AVP puede mejorar las funciones de los órganos y reducir la fibrosis en un modelo animal de enfermedad hepática crónica (anastomosis portocava). Para investigar esta hipótesis, ratas Wistar macho se dividieron en los siguientes grupos: 1) Control, 2) Anastomosis portocava (APC), 3) lobectomía hipofisiaria neurointermedia (LNI), 4) APC+LNI, 5) APC+conivaptán (APC+CV) (antagonista de los receptores V1a-V2 de AVP). Los grupos 2, 4 y 5 fueron sometidos a APC al inicio del experimento y sacrificados 16 semanas después. El grupo 3 fue sometido a LNI al inicio del experimento y sacrificado a la semana 8. A la semana 8, los grupos APC+LNI y APC+CV iniciaron el respectivo tratamiento. Al sacrificio, se realizaron los siguientes análisis: pruebas de funcionamiento hepático en suero, contenido de glucógeno hepático, histopatología hepática (incluyendo cantidad de colágeno y áreas de fibrosis), determinación de la expresión de alfa-actina de músculo liso (α -SMA) por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia y la expresión de marcadores de fibrosis hepática por qPCR. Los resultados mostraron que en los grupos APC+LNI y APC+CV disminuyeron los niveles séricos de AST y bilirrubina, se restablecieron los niveles de albúmina sérica y el contenido de glucógeno hepático, hubo reversión de las alteraciones histológicas con disminución en los tabiques fibrosos y contenido de colágeno. El análisis molecular e inmunohistológico demostró que, en comparación con el grupo APC, los tratamientos disminuyeron la expresión génica de TGF- β y α -SMA. En conclusión, los resultados sugieren que la deficiencia de vasopresina o el bloqueo de los receptores V1a-V2 de AVP por el conivaptán juegan un papel importante en la reversión del daño hepático en la APC. Estos resultados también abren la posibilidad real de que el conivaptán pueda ser utilizado para el tratamiento de pacientes con fibrosis/cirrosis hepática crónica.

ABSTRACT

Liver diseases are characterized by the uncontrolled appearance of collagen fibers in the hepatic parenchyma, a situation that leads to liver failure and cirrhosis. It has been demonstrated that immune cells possess arginine vasopressin (AVP) receptors, and this hormone has immunostimulating effects, with its deficiency inducing fibrosis reversal. In this thesis, it is proposed that specific blockade of AVP receptors can improve liver function and reduce fibrosis in an animal model of chronic liver disease (portocaval anastomosis). To investigate this hypothesis, male Wistar rats were divided into the following groups: 1) Control, 2) Portocaval anastomosis (PCA), 3) neurointermediate lobectomy (NIL), 4) PCA+NIL and 5) PCA+conivaptan (PCA+CV) (V1a-V2 AVP receptor antagonist). Groups 2, 4, and 5 were subjected to PCA at the beginning of the experiment and sacrificed 16 weeks later. Group 3 was subjected to NIL at the beginning of the experiment and sacrificed 8 weeks later. At week 8, the PCA+NIL and PCA+CV groups initiated their respective treatments. At sacrifice, the following analyses were performed: serum liver function tests, hepatic glycogen content, hepatic histopathology including collagen amount and fibrosis areas. Smooth muscle alpha-actin (α -SMA) expression was determined by immunohistochemistry and immunofluorescence, and hepatic fibrosis markers were determined by qPCR. The results showed that serum AST and bilirubin levels decreased in the PCA+NIL and PCA+CV groups, with serum albumin levels and hepatic glycogen content being restored. There was a reversal of histological alterations with decreased fibrous septa and collagen content. Molecular and immunohistological analyses demonstrated that, compared to the PCA group, the treatments decreased TGF- β and α -SMA gene expression. In conclusion, the results suggest that vasopressin deficiency or blockade of V1a-V2 AVP receptors by conivaptan play an important role in reversing hepatic damage in PCA. These results also open the real possibility that conivaptan can be used for the treatment of patients with chronic hepatic fibrosis/cirrhosis.

INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS DE LA HORMONA ARGININA VASOPRESINA

La arginina vasopresina (AVP), también conocida como hormona antidiurética (ADH), es un nonapéptido sintetizado en las neuronas magnocelulares y parvocelulares en los núcleos supraópticos y paraventriculares en el hipotálamo. A través del tracto hipotalámico-neurohipofisiario, la AVP es transportada axonalmente hacia la neurohipófisis donde se almacena y se libera a la circulación sistémica en respuesta a diversos estímulos, como la interleucina 6 (IL-6).

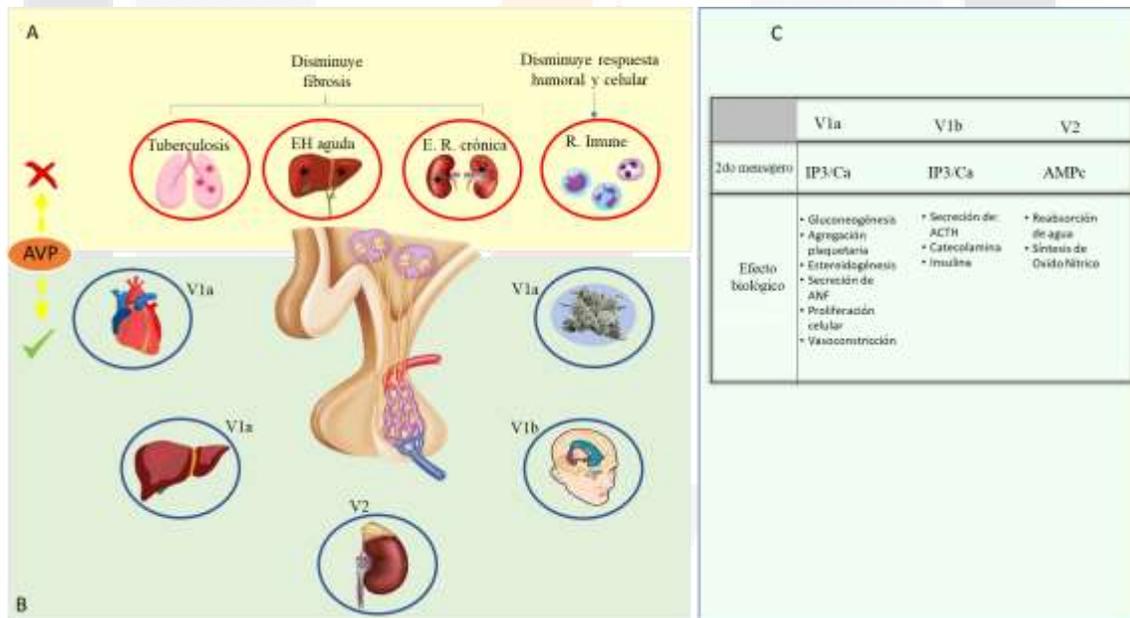


Figura 1. Fisiología de la Arginina Vasopresina y sus receptores en el organismo. **A.** Efectos del bloqueo de los receptores en enfermedades fibróticas y la regulación del sistema inmune. **B.** Efectos pleiotrópicos de la vasopresina en el organismo. **C.** Funciones de los receptores de vasopresina y sus segundos mensajeros. AVP. Arginina vasopresina; EH: enfermedad hepática; ER: Enfermedad renal; R: respuesta; IP3: Inositol trifosfato; Ca: calcio; AMPc: Adenosín monofosfato cíclico; ANF: péptido natriurético auricular; ACTH:

hormona adrenocorticotropa. (Quintanar-Stephano, et al. 2004, Zetter, M. et al. 2019, Viñuela-Berni, V. et al. 2020, Zeynalov, E., et al. 2015, Muñoz-Ortega, M., et al. 2021).

La AVP es una hormona pleiotrópica cuyas acciones en el organismo son mediadas por tres tipos de receptores: V1a, V1b y V2. Entre sus efectos fisiológicos mejor conocidos se encuentra su acción antidiurética al actuar sobre los receptores V2 localizados en los túbulos contorneados distales y colectores del riñón, siendo responsable de la regulación de la osmolaridad plasmática. Otro efecto bien conocido de la AVP es su acción vasopresora al actuar sobre los receptores V1a del músculo liso vascular, lo que aumenta la resistencia vascular periférica y la presión arterial sistémica (Pelletier et al., 2014; Laycock, 2010). Más recientemente se ha sugerido que la AVP podría formar parte de las respuestas inmunes ya que se ha observado un incremento de su secreción en respuesta a la IL-6.

Además, se ha observado que la AVP también aumenta sus niveles séricos en procesos en los que el sistema inmunológico es activado, siendo la interleucina 6 (IL-6) la principal citocina implicada en este proceso (Palin et al., 2009; Jankord et al., 2010).

Por otro lado, diversos estudios indican que la AVP desempeña un papel importante en los procesos regenerativos del hígado, al actuar como regulador in vivo del flujo biliar cuando se reduce la masa funcional de los hepatocitos (Nicou et al., 2003; Muñoz-Ortega et al., 2021). Además, se ha observado que esta hormona provoca señales de calcio elaboradas en el hígado, las cuales pueden propagarse en placas de hepatocitos (Valerie et al., 2001).

Receptores de AVP

Los receptores de AVP son proteínas transmembranales acopladas al sistema de proteínas G y a la fecha se han identificado tres subtipos que median las diferentes acciones de la hormona: V1a, V1b y V2 (Guillon et al., 1980; Rudnay et al., 2012). Tanto el receptor V1a como el V1b son proteínas compuestas por 428 y 424 aminoácidos, respectivamente (Bankir et al., 2017; Saad et al., 2017). Ambos están acoplados a la proteína Gq, que se une a la fosfolipasa C y a la vía de señalización del fosfoinositol, la cual tiene al calcio intracelular

(Ca²⁺) como segundo mensajero (Figura 2). Los receptores V1a se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo y se localizan en diferentes tipos celulares, como células musculares lisas de los vasos sanguíneos, miocardio, hepatocitos, plaquetas, cerebro, útero y células de la glándula suprarrenal. Estos receptores son responsables de diversas acciones fisiológicas, incluyendo la vasoconstricción, la mitogénesis, la glucogenólisis hepática y la agregación plaquetaria. En contraste, los receptores V1b están predominantemente presentes en la hipófisis anterior, donde median la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en conjunto con la corticoliberina (CRH). También se encuentran en la médula suprarrenal y en el páncreas, donde participan en la liberación de insulina.

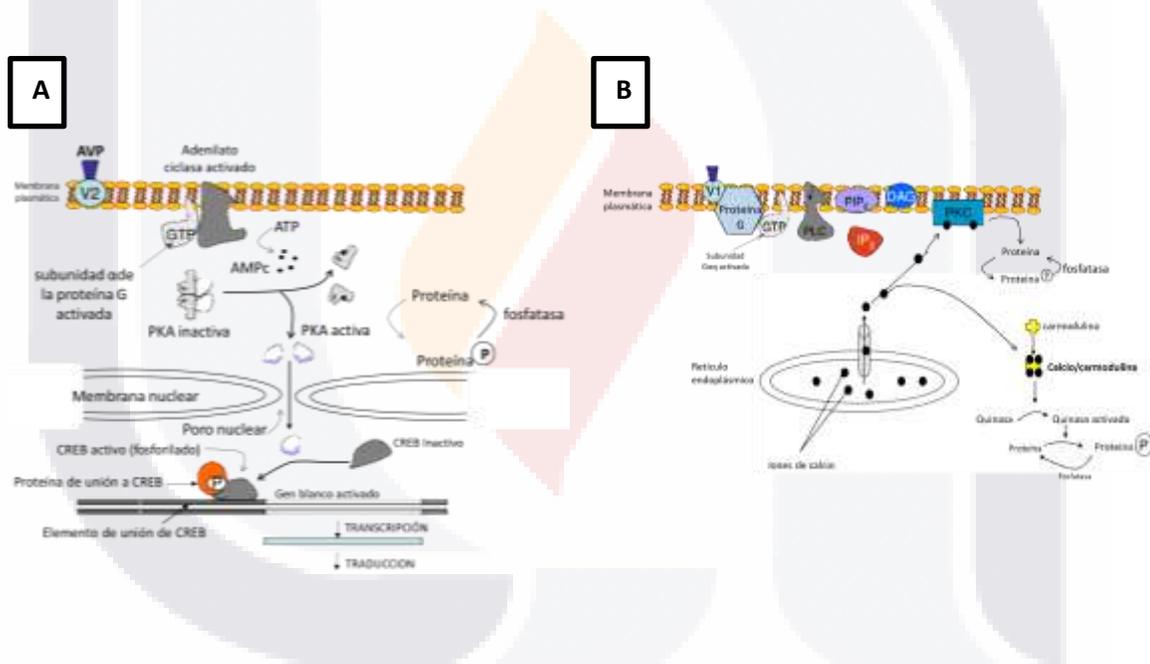


Figura 2. Vías de señalización de los receptores V1 y V2 de vasopresina. **A.** Vía de señalización del receptor V2 de vasopresina. **B.** vía de señalización del receptor V1 de vasopresina. DAG, diacilglicerol; GTP, guanosil trifosfato; PIP2, fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato; PKC, proteína quinasa C; PLC, fosfolipasa C β ; V1, receptor de vasopresina V1 (Francis-Laycock, 2010).

Funciones de los receptores de vasopresina en el organismo

Desde la década de 1920, las investigaciones han demostrado que la AVP tiene efectos cardiovasculares y renales (Laycock J. 2010). A medida que pasaron los años, se descubrieron otros efectos fisiológicos, como el control de la glucemia en la diabetes a través de los receptores V1b en el páncreas, la regulación del metabolismo de lípidos a través de la secreción de insulina y glucagón, y el aumento de los niveles de ACTH y cortisol en el síndrome metabólico, lo que se relaciona con la resistencia a la insulina y la diabetes (Tanoue A. 2009). Además, se ha sugerido que los niveles elevados de AVP pueden estar relacionados con la disminución de la función cognitiva y la tasa de filtración glomerular en la enfermedad renal crónica (Mavari, et al., 2015, Bankir, L., et al., 2017). En resumen, la AVP es una hormona pleiotrópica que regula una amplia variedad de funciones metabólicas en el organismo. Además, algunos estudios han demostrado que la deficiencia de AVP puede mejorar el cuadro clínico de ciertas enfermedades, como la fibrosis hepática, a través de la regulación de los receptores V1 presentes en las células hepáticas (Asfar, P. et al., 2010).

Antagonista selectivo de los receptores de vasopresina (CONIVAPTÁN)

El conivaptán es un fármaco que a la fecha se utilizado en el tratamiento de la hiponatremia y la insuficiencia cardíaca congestiva crónica, ya que es un inhibidor no peptídico de los receptores de vasopresina, especialmente los receptores V1a y V2. Su alta afinidad y capacidad competitiva y reversible para unirse a estos receptores permite mejorar el perfil hemodinámico al reducir la resistencia vascular y disminuir los efectos de la contracción inducida por la AVP del músculo liso vascular. Además, algunos estudios han demostrado que el conivaptán también puede bloquear la agregación plaquetaria, sin generar efectos adversos significativos (Verbalis JG., et al. 2005).

Es importante destacar que este fármaco se une en un 99% a proteínas plasmáticas y es metabolizado por el hígado, específicamente por la enzima CYP3A4 del citocromo P450. Por lo tanto, debe utilizarse con precaución en pacientes con disfunción hepática y en

combinación con otros medicamentos que puedan afectar su metabolismo (Sulemanjee, N. Z., 2006, Ali, F., 2004).

2. CARACTERÍSTICAS FUNCIONES Y MORFOLÓGICAS DEL HÍGADO

El hígado es un órgano vital para el mantenimiento de la homeostasis, caracterizado por su complejidad estructural y dinámica funcional. La "zonación metabólica" es una división espacial de diferentes vías metabólicas a lo largo de los sinusoides hepáticos que separa los miles de lobulillos hepáticos del tejido en zonas según sus necesidades nutricionales y funciones: la zona porta, la zona mediozonal y la zona centrilobulillar. Cada zona tiene una función y morfología únicas, y la distribución de enzimas y proteínas, así como los patrones de expresión génica, pueden cambiar en respuesta a factores como la dieta, las hormonas, los medicamentos y los factores liberados en el torrente sanguíneo. Esto hace que la zonación hepática sea dinámica. (Soto et al., 2017; Jungermann et al., 1987; Gebhardt et al., 2014; Kietzmann, 2017; Mak et al., 2020).

Células implicadas en las funciones del hígado

El hígado está conformado por diversos tipos de células que llevan a cabo todas esas funciones que catalogan como un órgano importante en la actividad metabólica del organismo.

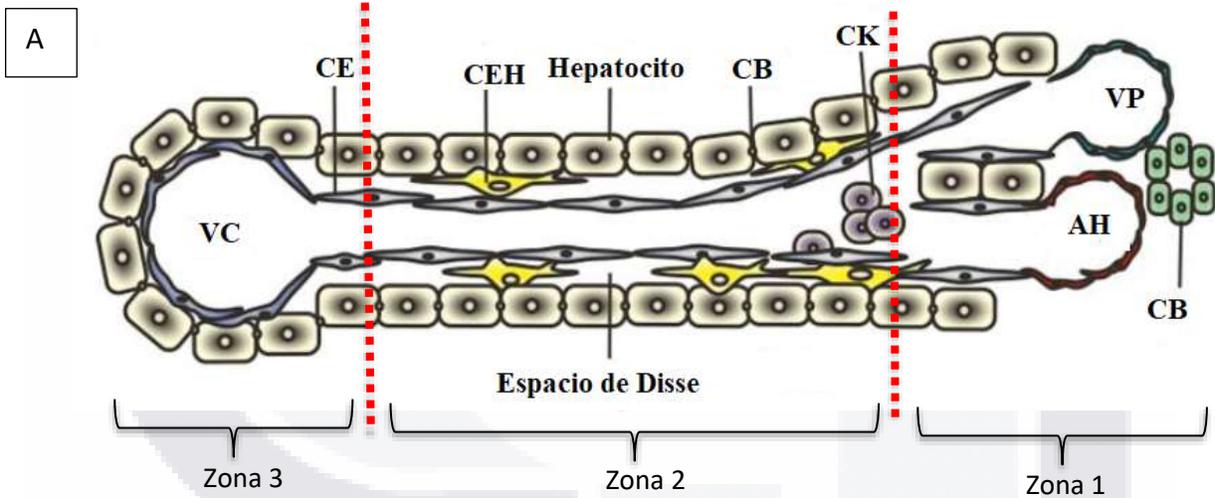
Hepatocitos

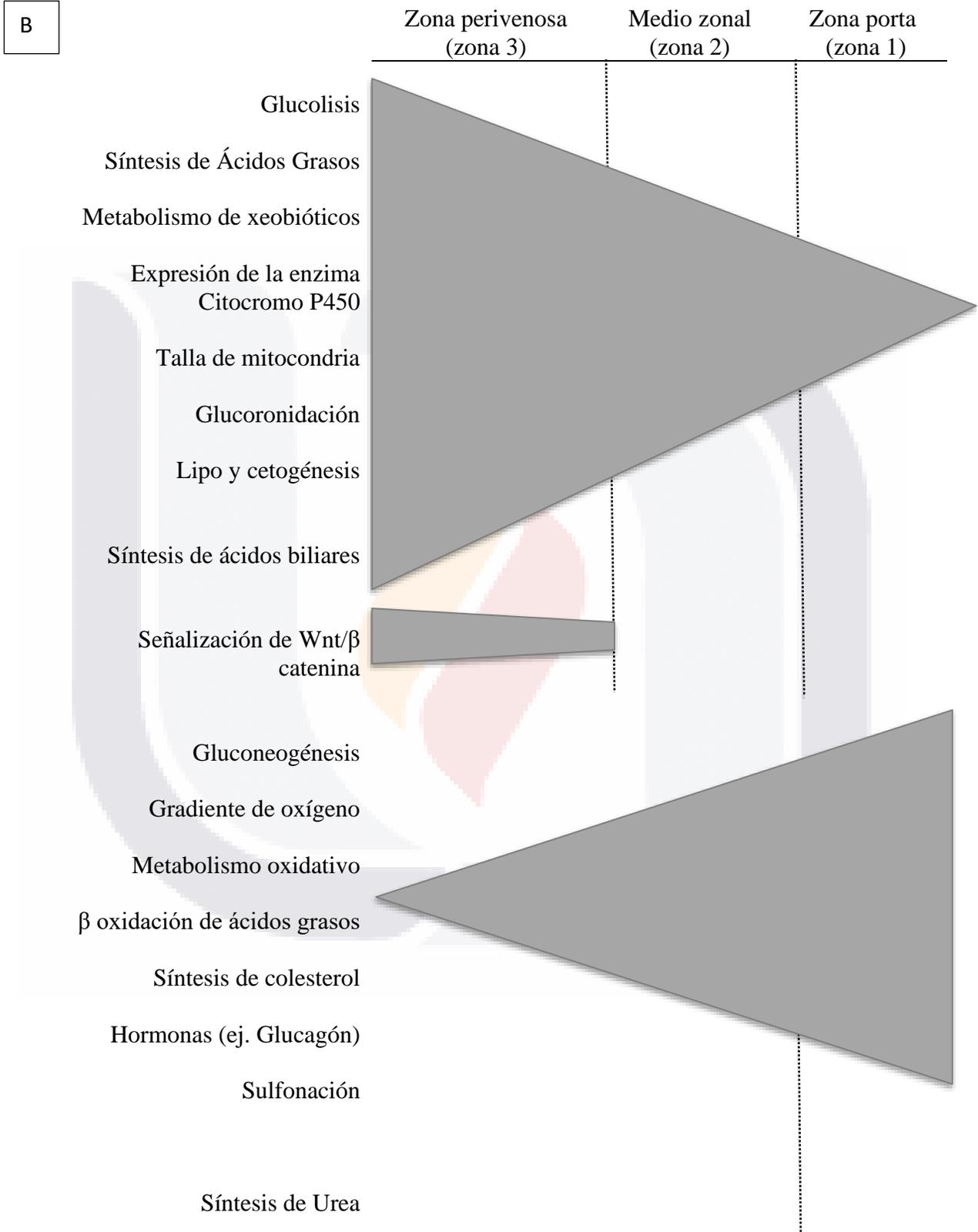
Son las células más abundantes e importantes del hígado, comprenden más del 80% de la población total. Su importancia radica en las funciones que desempeñan, ya que están encargados de la síntesis y almacenamiento de proteínas (como la albúmina y el fibrinógeno) e hidratos de carbono (como el glucógeno), la formación de bilis, el metabolismo de xenobióticos (como el CYT P450), entre otros (Trefts, E., et al. 2017; Ben et al. 2019).

Estas funciones no solo dependen de su ubicación en el lobulillo hepático, sino también de sus características morfológicas. Estas células cuentan con una polaridad única que separa al

sinusoide del canalículo biliar. Así, funcionan como un filtro selectivo que aprovecha los nutrientes provenientes del torrente sanguíneo y libera los productos de desecho al sistema ductal biliar (Keplinger et al. 2014; Müsch A. 2014; Gissen P., et al. 2015).

Dado que el hígado procesa la sangre, la filtra y distribuye nutrientes en el organismo, los hepatocitos son las principales células afectadas en muchos procesos patológicos. Su pérdida lleva a la distorsión paulatina de la arquitectura y función natural del hígado, acompañada de complicaciones como la hipertensión portal, la ascitis, sangrados esofágicos y deficiencia inmunológica, entre otras (Kim Young, M. 2017; Gracia-Sancho, J. et al. 2019).





Expresión de carbamoil- fosfato sintasa I

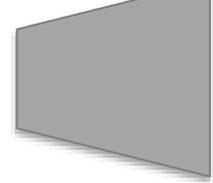


Figura 3. Representación esquemática de la zonación metabólica del hígado. **A.** Microarquitectura hepática: VP: vena porta; CB: conducto biliar; CEH: células estelares hepáticas; AH: Arteria hepática; CE: células endoteliales; CK: Células de kupffer, se pueden distinguir tres zonas: 1, la zona periportal (zona 1); la zona intermedia (zona 2); la zona perivenosa (zona 3). **B.** zonación metabólica del hígado. La zona periportal a diferencia de la zona perivenosa lleva a cabo predominantemente reacciones metabólicas dependientes de oxígeno (Soto et al., 2017, Ben et al., 2019; Ko et al., 2019; Santos, A., et al., 2023).

Células estelares hepáticas (CEH)

Uno de los eventos más importantes que ocurren durante el daño del hígado es la activación de las células estelares hepáticas, las cuales se encuentran localizadas en el espacio de Disse (ver Figura 3A). Durante el estado de equilibrio homeostático, estas células almacenan retinoides en su citoplasma (ver Figura 4), lo que hace del hígado una de las principales fuentes de vitamina A del organismo (Jophlin et al., 2018; Kamm, D. R., & McCommis, K. S. 2022). Además, tienen un papel en el control del flujo portal (Thomsen et al., 2018; Iwakiri, Y., & Trebicka, J. 2021) y participan en vías que regulan la homeostasis de carbohidratos, mitocondrias y lípidos (Trivedi, P., 2021). Las CEH también son responsables de la comunicación celular a través de la liberación de citocinas y factores de crecimiento

que mantienen el equilibrio homeostático.

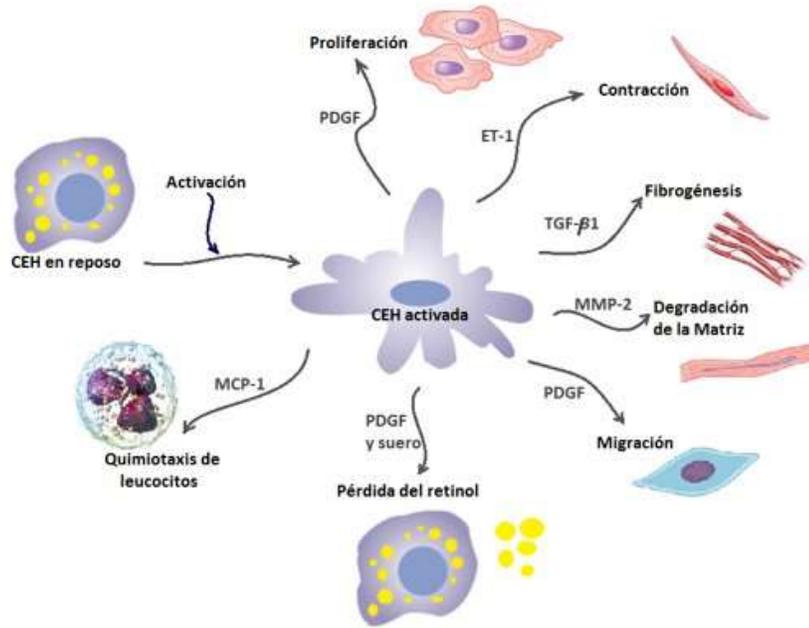


Figura 4. Procesos Implicados en la activación de las Células Estelares Hepáticas (CEH). PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas; ET-1: Endotelina 1; TGF-β1: Factor de crecimiento transformante beta1; MMP-2: Metaloproteasa 2; MCP-1: Proteínaquimio atrayente de monocitos 1.

El proceso de activación de las células estelares hepáticas (CEH) se produce en condiciones de daño hepático continuo y pérdida de la homeostasis hepática. La respuesta inflamatoria persistente, la lesión en las células epiteliales y la matriz extracelular alterada son factores que promueven la activación de las CEH a miofibroblastos. Durante esta activación, las CEH adquieren propiedades proinflamatorias y fibrogénicas, así como la capacidad de sintetizar matriz extracelular (MEC) formada principalmente por colágena, fibronectina, elastina, laminina y ácido hialurónico.

Este proceso de activación se divide en dos fases: la fase de iniciación o preinflamatoria, en la que se producen cambios rápidos en la expresión génica y fenotipo de las células, y la fase de perpetuación, en la que las células adquieren un fenotipo activado. Durante la activación, las CEH expresan marcadores específicos en su membrana plasmática, como la α -actina de

músculo liso (α SMA), la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la desmina y la integrina $\alpha\beta3$, entre otros.

En resumen, la activación de las células estelares hepáticas es un proceso complejo que se produce en respuesta al daño hepático continuo y que resulta en la producción de MEC y la adquisición de un fenotipo activado y proinflamatorio.

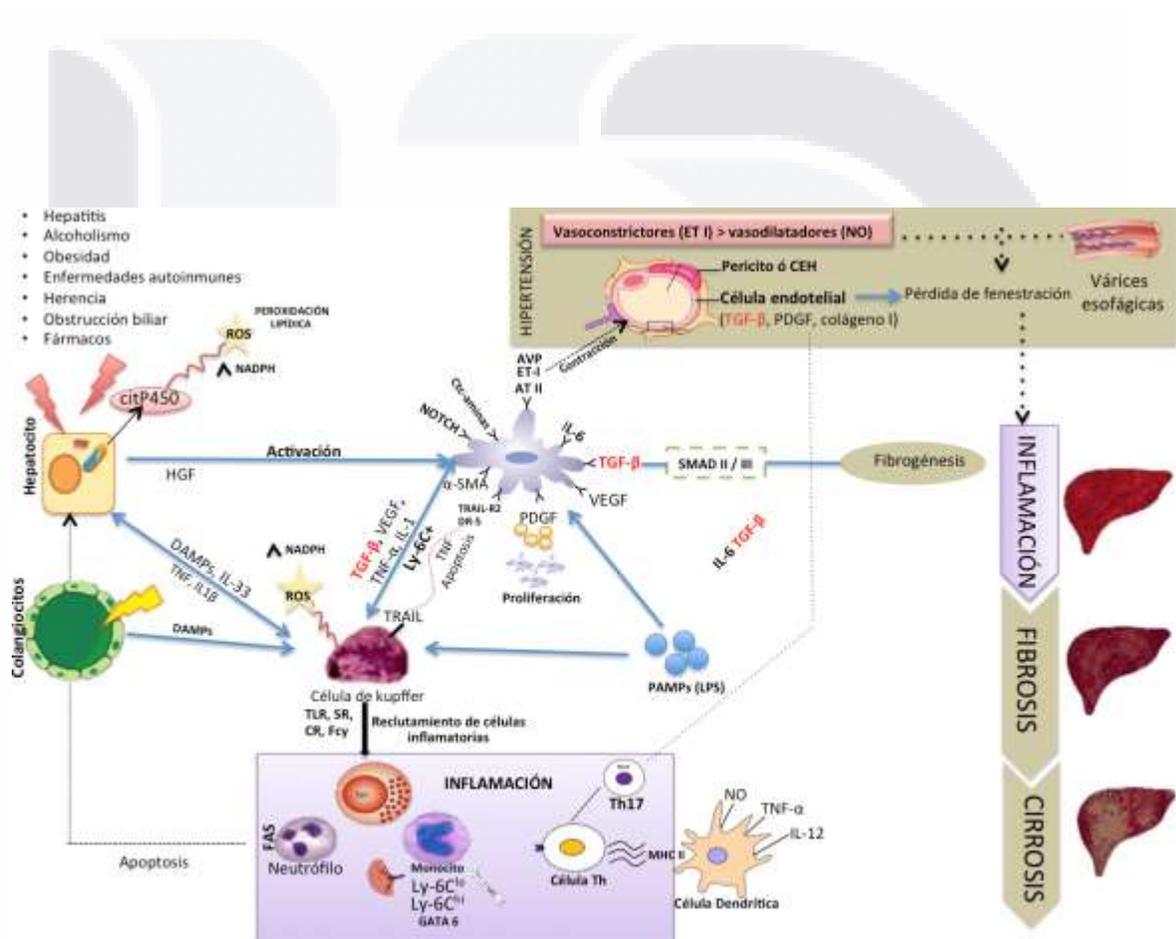


Figura 5. Mecanismos involucrados en la activación de las CEH. (ROS: especies reactivas de oxígeno; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; Cit P450: citocromo p 450; HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos; TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa; TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta; VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular; PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas; AT II: Angiotensina II; ET-1: Endotelina I; AVP: Arginina Vasopresina; α -SMA: alfa actina de musculo liso; NO: Óxido Nítrico; IL: interleucina; FAS: Primera señal de apoptosis; MHC II: Complejo mayor de

histocompatibilidad II; LPS: Lipopolisacáridos; TLR: Receptor tipo Toll; SR: Receptor scavenger; LR: Receptor de complemento).

Células de Kupffer

Tienen un papel importante en la regulación de la inflamación hepática. En situaciones de daño hepático crónico, las células de Kupffer pueden activarse de manera persistente, lo que lleva a la producción continua de citocinas proinflamatorias y a la generación de radicales libres de oxígeno, lo que puede desencadenar la apoptosis de las células hepáticas y la progresión de la fibrosis hepática (Gao, et al., 2018), y estudios recientes han sugerido que las células de Kupffer podrían estar involucradas en la comunicación con las células estelares hepáticas durante su activación (Zhan, S. S., et al., 2020). Además, las células de Kupffer también están involucradas en la regulación de la respuesta inmune adaptativa y en la tolerancia periférica, lo que puede prevenir la aparición de enfermedades autoinmunitarias del hígado (Wu, et al., 2020). En resumen, las células de Kupffer tienen un papel crucial en la respuesta inmune del hígado y en la regulación de la homeostasis hepática.

Células endoteliales hepáticas

Las células endoteliales hepáticas son un componente importante del hígado y tienen un papel crucial en la homeostasis hepática y la función metabólica. En la enfermedad hepática pueden cambiar su fenotipo y su función, estas células experimentan una activación y disfunción proinflamatoria, lo que contribuye a la acumulación de células inflamatorias y fibrosis en el hígado (Gracia-Sancho, 2014). Además, pueden secretar proteínas inflamatorias y factores de crecimiento, lo que puede promover la proliferación de las CEH y la deposición de MEC, lo que conduce a la fibrosis hepática. Además, tienen un papel en la regulación del flujo sanguíneo y perfusión hepática, y su disfunción puede contribuir a la hipertensión portal, una complicación común de la cirrosis hepática (Fernández-Iglesias, A., 2014).

3. PROCESO DE INICIO DEL DAÑO EN LAS DIVERSAS ENFERMEDADES HEPÁTICA.

La inflamación crónica, la muerte celular, la activación de las CEH y un sistema inmune alterado son factores que pueden producir un estado de cirrosis hepática y cáncer hepatocelular. Por lo tanto, para mantener el estado de salud, es esencial que los diversos mecanismos de regulación del hígado, sea capaz de tolerar moléculas inofensivas y permanecer alerta ante posibles agentes infecciosos, células malignas o daño tisular. Cuando estos mecanismos de regulación se alteran, se activan una serie de cambios que impulsan la fibrogénesis y la producción de matriz extracelular por parte de las CEH. Así, diversas citoquinas como el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la interleucina 6 (IL-6) participan en la activación de las CEH y la angiogénesis en el parénquima hepático lesionado. La IL-6 también participa en la regulación de la inmunidad adaptativa y la autoinmunidad, y se ha demostrado que tiene un efecto mitogénico sobre los hepatocitos, lo que puede causar carcinoma hepatocelular con la activación de NLRP3 que desencadena una cascada inflamatoria que incluye la producción de esta citosina. A pesar de esto, la IL-6 también puede tener un impacto beneficioso dentro de las enfermedades hepáticas, promoviendo la proliferación, angiogénesis, regulación negativa de la apoptosis y el estrés oxidativo (Jiang, R., 2018, Liu, X., 2020).

Por otro lado, la capilarización de los sinusoides por las células endoteliales sinusoidales hepáticas (Poisson, et al., 2017) se traduce como la pérdida temprana de la fenestración (inicio de la fibrosis). Estas células activadas expresan TGF-beta, PDGF-BB y colágeno I que induce también la activación de las CEH. Una vez activas durante la lesión hepática el sistema inmunológico ejerce funciones que dan progresión a la enfermedad.

La célula más representativa del proceso inmune en el daño hepático es la célula de Kupffer, este tipo de células puede llegar a promover el carcinoma hepatocelular a través de la activación de ROS (especies reactivas de oxígeno) (Ringelhan, et al., 2018), seguido del sobrecrecimiento colangiocelular y la transformación maligna de células biliares (Llovet, et

al., 2016). Por un lado, expresan una variedad de receptores scavenger, receptores Toll-like (TRL) (Boege, et al., 2017), receptores de complemento y anticuerpo que permiten la internalización de patógenos y su activación. Además, este tipo celular llega a inducir tolerancia a producir citocinas proinflamatorias en respuesta a endotoxinas (Heymann, et al., 2015).

Las células de Kupffer pueden producir TGF- β y, en respuesta a la activación por diversas señales, también pueden secretar citocinas inflamatorias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, que pueden desempeñar un papel en la progresión de la fibrosis hepática y la patogénesis de diversas enfermedades hepáticas (Heymann et al., 2015; Seki et al., 2012).

4. PAPEL DEL TGF- B EN LA FIBROGÉNESIS HEPÁTICA.

La citosina TGF- β 1 juega un papel fundamental en diversos procesos, como la fibrosis hepática, la inflamación, el crecimiento celular, la apoptosis (Meng, 2019; Xu, et al., 2016) y la diferenciación de células ovas, que son las principales responsables de la repoblación hepática (Biernacka, et al., 2011). Su capacidad para activar la señalización de Notch y promover la transición epitelio-mesénquima de las células hepáticas estrelladas (CEH) (Yi, et al., 2017; Ming-Ming, et al., 2018) es esencial para su acción fibrogénica, en la que intervienen mediadores críticos de la fibrogénesis, como la inducción del transporte y organización del aparato de Golgi, y las proteínas SMAD (Maiers, et al., 2017). Estas últimas, en particular Smad2 y Smad3, forman complejos oligoméricos con Smad4 y se translocan al núcleo, donde participan en la regulación transcripcional durante el proceso de regeneración hepática (Zhang, et al., 2015; Jiyuan, et al., 2014; Yang & Shi, 2012).

Además, el TGF- β tiene la capacidad de activar la señalización de Notch, involucrada en muchos procesos patológicos como la fibrosis hepática (Garcia & Baladron, 2016), ya que está implicada en la proliferación, supervivencia, apoptosis y diferenciación celular (Bray, 2016), además de mediar selectivamente las propiedades fibrogénicas del TGF- β 1 (esencial para la formación de MEC) (Zhang, et al., 2015); un estudio en rata demostró que su silenciamiento disminuye la expresión de marcadores de miofibroblastos (Xie, et al., 2013)

y bloquea la acción de α -SMA y colágena I inducida por TGF- β 1 (Chen, et al., 2012, Zhang, et al., 2015).

También se ha demostrado que el TGF- β promueve la apoptosis de las células hepáticas y la producción de citocinas proinflamatorias. Además, TGF- β puede afectar la inmunidad adaptativa y contribuir a la regulación negativa de la función de los linfocitos T y B mediante la inducción de células T reguladoras y la inhibición de su proliferación, respectivamente (Li, M. O., 2008).

5. MODELO DE ANASTOMOSIS PORTO CAVA

La anastomosis porto-cava (APC) en la rata es un procedimiento quirúrgico que consiste en desviar la circulación de la sangre portal de las vísceras abdominales a la vena cava inferior evitando su paso por el hígado. La técnica, descrita inicialmente por Sun Lee en 1961, ha sido de gran utilidad ya que permite reproducir una serie de cambios patológicos estructurales y funcionales característicos de algunas enfermedades hepáticas (Kyu, M., 1970; Oria, M., 2006; Zaitoun, et al., 2006; Aller, M. A., 2008; Vázquez-Martínez., 2019; Muñoz-Ortega, M., 2021). Se ha observado que, en este modelo animal se producen alteraciones importantes en la microcirculación hepática, que contribuyen aún más a la pérdida de las células hepáticas (Lemberg et al., 2009). Además, algunos otros parámetros séricos están relacionados con el grado de daño que los cambios en la microcirculación desencadenan, como altos niveles de amonio en sangre, deterioro de los hepatocitos por la carencia de nutrientes y la hipoxia debido a la supresión de la circulación portal, lo que causa alteraciones en el metabolismo intracelular y las funciones enzimáticas (Aller, M. A., 2008; Vázquez-Martínez., 2019; Muñoz-Ortega, M., 2021).

Los cambios histopatológicos en los hígados de los animales con APC, incluyen el desarrollo de un proceso inflamatorio, con edema e infiltración de neutrófilos, lo que provoca una significativa alteración en la microcirculación hepática. Algunos autores han observado un pico máximo dentro de las primeras horas, mientras que otros han descrito la presencia de edema celular, vacuolización, disrupción de células endoteliales e infiltración de polimorfonucleares (PMN) (Srinivas et al., 2017). A más largo plazo la APC induce la

formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis o neovascularización) como una manera de compensar la falta de nutrientes (Diemer et al., 1977; Mazziotti et al., 1981; Bhatt et al., 2018).

La hiperamonemia es una complicación común de la APC. En modelos animales, se ha observado que después de la cirugía, los niveles séricos de amonio aumentan significativamente. El amonio es un compuesto tóxico que proviene de la descomposición de los aminoácidos durante la digestión de proteínas, un 90% de ese amonio es metabolizado en el hígado al entrar al ciclo de la urea, el 10% restante puede ser producto del metabolismo en riñón, intestinos y musculo (Weiner, I. D., & Verlander, J. W. 2013; Adeyomoye, O. I., 2022).

Algunos autores han establecido una relación directa entre los niveles de amonio y la severidad de la enfermedad en la APC. En modelos animales, la disminución de peso y el aumento en los niveles séricos de amonio aceleran la progresión de la enfermedad (Aller, M. A., 2008; Vázquez-Martínez., 2019; Muñoz-Ortega, M., 2021). En humanos, la hiperamonemia puede desencadenar problemas neurológicos, trastornos del sueño y un aumento en las especies reactivas de oxígeno, lo que afecta la producción de O₂ mitocondrial y puede provocar cambios en las células nerviosas y en las células del sistema inmune (Kosenko, et al., 2017; Diemer, et al., 1977; Mangas, et al., 2018).

En particular, los pacientes con cirrosis y encefalopatía hepáticas presentan alteraciones tanto en la inmunidad innata como adaptativa. Mangas et al. (2018) demostraron esto mediante el análisis de inmunofenotipo por citometría de flujo y perfil de citocinas. La principal alteración asociada a la encefalopatía hepática es el aumento en la activación de subpoblaciones de linfocitos TCD4 y CD69, TCD4+CD28.

Debido a la naturaleza inflamatoria y fibrótica de este modelo se ha usado para el estudio de las enfermedades hepáticas, con buenos resultados en la reproducción de la patología de la fibrosis.

6. MODELO DE LOBECTOMIA NEUROINTERMEDIA HIPOFISIARIA (LNI) EN LA RATA

La LNI es un modelo quirúrgico que consiste en la extirpación de los lóbulos intermedio y neural de la glándula pituitaria, también conocida como lobectomía neurointermedia. Este modelo animal se ha utilizado en investigación desde la década de 1940 para explorar la función de la neurohipófisis y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. En humanos, la técnica se ha utilizado en casos muy específicos de enfermedades endocrinas, como la acromegalia y la enfermedad de Cushing, (Liu Y., et al 2019).

Efectos de la LNI en la rata

Experimentos anteriores realizados en nuestro laboratorio demostraron que la LNI induce diabetes insípida persistente; disminución de las respuestas inmunes humorales, aumento del peso de las glándulas suprarrenales (alrededor de 20% por encima de los niveles de control), disminuciones de peso corporal y timo (20 y 30% por debajo de los valores de control, respectivamente) y leves reducciones en el peso del bazo (Quintanar et al., 2004, 2012).

7. PAPEL DEL SISTEMA NEUROINMUNOENDOCRINO EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA

Durante muchos años se creyó que los sistemas nervioso, inmunológico y endocrino operaban de forma independiente entre sí. Sin embargo, investigaciones clínicas y estudios recientes han demostrado una estrecha interconexión entre estos sistemas, lo que implica que la disfunción en uno de ellos puede afectar el funcionamiento de los otros.

En la cirrosis hepática, el sistema nervioso puede ser afectado por la acumulación de toxinas en el cerebro debido a la disfunción y la encefalopatía hepáticas. La disfunción hepática también puede alterar el equilibrio de neurotransmisores y hormonas, lo que puede afectar la función cerebral y el comportamiento y diversos sistemas endocrinos. El sistema inmunológico también puede ser afectado y contribuir a la inflamación crónica del hígado y la progresión de la enfermedad. Se ha demostrado que los pacientes con cirrosis tienen un

aumento en la actividad de ciertas células inmunológicas, como los macrófagos hepáticos y los linfocitos T, y una disminución en la actividad de otras células inmunológicas, como los linfocitos B.

El sistema endocrino especialmente en pacientes con ascitis y otros trastornos metabólicos asociados con la enfermedad hepática. La disfunción del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y la resistencia a la insulina son comunes en la cirrosis y pueden contribuir a la disfunción metabólica y la progresión de la enfermedad (Fernández-Rodríguez, C. M., 2014, García-Compeán, D., 2018).

Además, los pacientes presentan una caída progresiva de la testosterona, la hormona luteinizante y la triyodotironina y un aumento del estradiol (Bandyopadhyay, S. K., 2009), se ha visto que la disminución en la síntesis del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) está estrechamente asociada con la progresión de la esteatosis hepática, lo que sugiere un papel fisiológico de estas hormonas para el mantenimiento del hígado (Takahashi Y. 2017).

8. MARCADORES BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE DAÑO HEPÁTICO

En la actualidad la evaluación clínica (pruebas de funcionamiento hepático), las pruebas de imagen (Doppler hepático) y la biopsia hepática siguen siendo las principales herramientas para el diagnóstico de las enfermedades hepáticas.

Estas herramientas que orientan sobre el estado metabólico y la etapa de la enfermedad:

Marcadores séricos

Un panel de marcadores séricos (Fibrotest) incluye el ácido hialurónico (AH), la alfa-2-macroglobulina, la gamma-glutamilttransferasa (GGT), la bilirrubina y la apolipoproteína A1. Es una prueba con alta sensibilidad y especificidad para la detección de daño hepático y cirrosis.

Actualmente se utilizan marcadores bioquímicos que están estrechamente relacionados con los procesos de fibrinólisis y fibrogénesis; la gamma glutamilttransferasa (GGT), bilirrubina

total, α -2 macroglobulina, apolipoproteína A1, haptoglobina. Existen además otros marcadores más complejos como la proteína de unión a Mac-2 glutinina positiva para wisteria floribunda (WAF+ -M2BP) que ha sido catalogado como un marcador novedoso para evaluar la fibrosis hepática (Waragai, et al., 2016), la YKL-40 (CHI3L1) un biomarcador de inflamación emergente que se relaciona con la etapa inicial de la fibrosis hepática, el propéptido N-terminal del procolágeno del tipo III (PIIINP), este marcador presenta altos niveles en pacientes con un cuadro clínico agudo de cirrosis hepática alcohólica (Nojgaard, et al., 2003).

Marcadores moleculares

Las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) son enzimas que se encargan de la degradación y remodelación de la matriz extracelular. En la cirrosis hepática, las MMPs pueden estar involucradas en la alteración de la estructura de la matriz extracelular y en la formación de nódulos de regeneración. Además, se ha demostrado que las MMPs pueden contribuir a la resistencia vascular al degradar las proteínas de la matriz extracelular que actúan como barreras para el flujo sanguíneo (Arthur MJ, 2004; Roeb E, et al., 2004).

Se ha demostrado que la expresión de las MMP-2, MMP-9 y MMP-13 están aumentadas en los tejidos fibrosos de la cirrosis hepática, lo que sugiere que estas enzimas pueden estar involucradas en la degradación y remodelación de la matriz extracelular y contribuir a la resistencia vascular y la hipertensión portal de la cirrosis hepática. Además, se ha sugerido que la expresión de las MMP-2 y MMP-9 pueden estar reguladas por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que es una citoquina que se ha implicado en la fibrosis hepática y la hipertensión portal (Benyon RC, 1996; Sun W, et al., 2013).

Por otro lado, los inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz (TIMP) son proteínas que regulan la actividad de las MMPs. En la cirrosis hepática, se ha demostrado que la expresión de TIMP-1 está aumentada en el tejido hepático fibroso y que esto contribuye a la acumulación de colágeno en la MEC. También pueden estar involucrados en la angiogénesis patológica en la cirrosis hepática, ya que estas proteínas pueden regular la actividad de factores de crecimiento como el VEGF y el TGF-

β , que son importantes para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en el hígado (Yoshiji, H., et al. 2000, Elpek, G.Ö. 2014).



I. ANTECEDENTES

El modelo de derivación porto-cava en la rata, desarrollado por Lee y Fisher en 1961, se ha establecido como una herramienta fiable y reproducible para inducir daño hepático y fibrosis. En ratas Sprague-Dawley resultó en una pérdida transitoria de peso corporal y una atrofia específica en el hígado debido a la disminución del flujo sanguíneo hepático parcial. El daño hepático fue evaluado mediante esplenoportograma a los 5 y 7 meses después de la cirugía, lo que reveló un llenado retrógrado de las venas hepáticas en las ratas con derivación. Además, los niveles de amonio en sangre aumentaron tres veces más en comparación con las ratas control en los 60 y 90 días posteriores a la anastomosis. La composición hepática también mostró cambios significativos en el porcentaje de glucógeno, proteínas y peso húmedo del tejido hepático durante el período de 5 a 144 días (Lee, S. H., & Fisher, B. 1961).

Bataller y colaboradores (1997) demostraron la presencia de receptores V1 de AVP en células estelares hepáticas (CEH) en cultivo, así como su capacidad de promover efectos similares a los observados en células de músculo liso vascular (VSMCs): proliferación de las CEH, aumento en la concentración de calcio $[Ca^{2+}]$ intracelular, la contracción y la contracción celular. La medición individual de la concentración de $[Ca^{2+}]$, utilizando fura-2, mostró valores muy similares a los observados en las VSMCs. Además, el porcentaje de CEH que respondió a la presencia de AVP aumentó proporcionalmente con su concentración, llegando hasta un 90% de respuesta máxima en la $[Ca^{2+}]$. En este estudio también se observaron dos patrones de respuesta: el primero fue un rápido aumento seguido de una disminución de la $[Ca^{2+}]$ a niveles basales, mientras que el segundo fue una respuesta oscilante en las células expuestas a altas concentraciones de AVP durante varios minutos. Este comportamiento también se observó en la medición de los niveles de contracción celular, donde se observó un incremento en el porcentaje de contracción celular dependiente de la dosis (más del 50%), y los cambios en la longitud de las CEH se compararon con las observadas en las células tratadas con el potente estimulador de la contracción vascular endotelina 1 (ET-1).

En un modelo experimental de insuficiencia hepática crónica inducida mediante APC, Aller et al. (2012) investigaron el papel de los mastocitos en la regeneración del hígado tras el

daño, así como su presencia en los ganglios linfáticos mesentéricos e intestino delgado. El grado de daño hepático fue evaluado mediante la determinación de enzimas y proteínas que reflejan la funcionalidad hepática. Un mes después de la intervención quirúrgica, se observó atrofia del hígado y de los testículos, pérdida de peso corporal y aumento en el tamaño del riñón. El grupo con APC mostró un aumento de las enzimas de daño hepático, aumento en la concentración de amonio, así como un incremento significativo en los parámetros considerados como marcadores de lesión hepatobiliar. Histológicamente, se observó necrosis en gran parte del tejido, infiltrado inflamatorio, esteatosis y aumento en el porcentaje de colágena tipo I en el área periportal principalmente (Aller et al., 2012).

Los resultados también revelaron una importante disminución de los mastocitos de tejido conectivo y en el tejido hepático de los grupos con APC, lo que sugiere que la disminución de estas células puede estar relacionada con la atrofia hepática. Además, se observó un aumento de mastocitos de tejido conectivo en el íleon, lo que sugiere que la alteración del eje hepatointestinal después de la APC puede inhibir la respuesta natural del hígado a la reparación adecuada. (Aller et al., 2012).

En un estudio en hámster llevado a cabo por Quintanar-Stephano et al. en 2017, se demostró que la deficiencia de AVP (inducida por la LNI) indujo un efecto regenerativo en hígados cirróticos inducidos con CCl₄. En este estudio, los animales se dividieron en cuatro grupos: cirrótico, cirrótico con LNI, cirrótico con reversión y cirrótico con reversión y LNI. Los resultados mostraron que los hígados cirróticos con reversión + LNI mostraron una significativa mejoría en la histopatología hepática: disminución y discontinuidad de los septos fibrosos vistos en Rojo sirio, donde predomina la colágena del tipo III y IV y una disminución de la colágena del tipo I. Además, se observó un restablecimiento de los cordones de hepatocitos, lo que mejoró la apariencia de la estructura parenquimatosa. Esta disminución de los septos fibrosos se relacionó con la sobreexpresión del gen que codifica para MMP-13, así como la disminución de TIMP2, lo que propició el aumento en el diámetro de los nódulos regenerativos y la mejora de la vascularización, lo cual es de vital importancia para la recuperación del daño hepático.

En contraste, los grupos cirróticos e incluso el cirrótico con reversión presentaron hepatocitos con cariorrexis, esteatosis microvesicular, infiltrado inflamatorio, áreas necróticas y un aumento de la expresión de TIMP2 y disminución de MMP-13, en congruencia con el tamaño de las fibras de colágena del tipo I en la zona porta vista en Rojo sirio. Por lo tanto, el grupo cirrótico con ausencia de AVP presentó un mayor índice de regeneración, indicando que la deficiencia de AVP juega un papel determinante en la reabsorción del tejido fibroso cicatricial.

En otro estudio publicado por Muñoz-Ortega et al., en 2021, se demostró que la deficiencia de la hormona AVP, inducida por la LNI, tiene un importante efecto antifibrótico y regenerador del hígado después del daño inducido por APC. En este experimento, ratas Wistar macho se dividieron en los siguientes grupos: Control intacto (CI), LNI, PCA y APC+LNI. Se compararon las pruebas de funcionamiento hepático, expresiones relativas de algunos genes hepáticos (IL-1, IL-10, TGF- β , COLL-I, MMP-9 y MMP-13) y análisis histopatológicos del hígado. Los resultados mostraron que en comparación con los grupos CI y PCA, los niveles de bilirrubinas y proteínas séricas, así como el glucógeno hepático se restablecieron a la normalidad en el grupo APC+LNI, además, en éste mismo grupo se redujeron significativamente los niveles de expresión génica de la IL-1 y COLL-I, mientras que aumentaron los de IL-10, TGF- β y MMP-13. La histopatología hepática del grupo APC+LNI, también mostró una disminución significativa de los signos de daño hepático: menor cantidad de los depósitos de colágeno y menor fibrosis. En conjunto, estos resultados sugieren que a diferencia de los animales solo con APC, en el grupo APC+LNI, los bajos niveles séricos de AVP inducidos por la LNI no fueron suficientes para alcanzar a activar de manera efectiva a los receptores de AVP de las CEH, y a las células inmunes asociadas a la respuesta proinflamatoria-profibrótica, mientras que simultáneamente, la deficiencia de AVP parece activar vías de señalización molecular celular asociadas a un estado antiinflamatorio-antifibrótico, lo que explicaría la reversión parcial del daño hepático y la fibrosis observadas en este experimento. En resumen, este estudio apoya el importante papel que la AVP juega en los procesos inflamatorio-fibróticos y en el mantenimiento de la competencia inmunitaria.

En conjunto, estos resultados apoyan el concepto de que el uso de antagonistas de los receptores de AVP pueden ser terapéuticamente útiles para tratar las enfermedades inflamatorias-fibróticas del hígado.

En un estudio realizado por Vázquez-Martínez et al. (2021), en ratas Wistar con APC de 13 semanas de evolución, encontraron una disminución en la peroxidación lipídica de fracciones subcelulares de hepatocitos. Además de este efecto, estos investigadores describieron que la APC también indujo un estado hipometabólico acompañado de un estado de inflamación hepática permanente característica de la enfermedad hepática crónica como disminución del peso corporal, atrofia hepática, alteraciones en las pruebas de funcionamiento hepático: hiperamonemia, hipoglucemia, incremento de la ALT y disminución de la AST, disminución de la glutamino sintetasa, de la glutamato deshidrogenasa y aumento de las caspasas. En resumen, este trabajo mostró que la APC induce en el hígado una respuesta hipometabólica asociada a una menor reacción prooxidante, y corrobora los efectos nocivos de la APC sobre las pruebas de funcionamiento hepático y la estructura histopatológica del hígado característicos de daño hepático crónico.

II. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades hepáticas se encuentran entre las principales causas de muerte en la población, y se caracterizan por la acumulación de matriz extracelular en el parénquima hepático, lo que induce el desarrollo de insuficiencia hepática y fibrosis. Actualmente, no existe un tratamiento efectivo que pueda revertir el proceso fibrótico ni restablecer las funciones del órgano, por lo que es importante investigar nuevas alternativas de tratamiento para controlar la cirrosis-fibrosis y restablecer las funciones hepáticas en las enfermedades hepáticas crónicas. Dado que en nuestro laboratorio se ha demostrado que la deficiencia de AVP juega un papel importante en el restablecimiento y reversión del daño hepático en modelos de ratas con cirrosis hepática y APC, pensamos que el tratamiento con conivaptán (CV) un antagonista de los receptores V1a-V2 de AVP, puede ser una alternativa terapéutica para el tratamiento de daño hepático crónico en el modelo de APC.

IV. HIPÓTESIS

La deficiencia de AVP inducida por la lobectomía neurointermedia hipofisiaria (LNI) o el tratamiento con el antagonista de los receptores V1a-V2 de AVP (CV), disminuirán el daño hepático de las ratas con APC crónica.



V. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar los efectos de la deficiencia de AVP y los efectos del Conivaptán (CV) sobre el daño hepático en el modelo de APC crónica en la rata.

Objetivos específicos

- Caracterizar en la rata el modelo de APC a través de sus efectos sobre:
- Cantidad de glucógeno hepático.
- Las pruebas de funcionamiento hepático.
- La histopatología hepática.
- Analizar mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia la activación de las células implicadas en el proceso de fibrosis (CEH)
- Analizar por qPCR algunos marcadores moleculares de fibrosis en el hígado.

VI. MATERIALES Y METODOS:

Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar (12-14 semanas) suministradas por la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Los animales fueron mantenidos en un ambiente con ciclos de luz/oscuridad de 12h:12h, con las luces encendidas a las 7:00 am y una temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Se les proporcionó alimento (purina rat chow) y agua ad libitum. Todos los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo con las Normas Institucionales de Bienestar Normativo de la Universidad Autónoma de Aguascalientes y las normas oficiales mexicanas (NOM-062-ZOO-1999), y fueron aprobados por el Comité de Bioética Institucional. Las ratas se dividieron en cinco grupos y se sometieron a las siguientes condiciones experimentales: Control, APC, APC+LNI, APC+CV y LNI. La Figura 6 muestra el cronograma experimental.

Figura 6. Diseño experimental



Anastomosis porto-cava (APC)

La APC se llevó a cabo utilizando un microscopio estereoscópico (Zeiss; OPMI 19-FC con un aumento de 6X). La técnica utilizada fue una adaptación de varios estudios previos [Aller et al., 2012; Padilla-Sánchez, 2013; Muñoz-Ortega et al., 2021).

Descripción de la técnica.

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina al 80% y xilazina al 20% (1 µl/gr µL/g de peso corporal/i.p.). Se afeitó el abdomen de las ratas y se colocaron en posición de decúbito dorsal sobre un colchón térmico. La horquilla incisiva superior se utilizó para fijar la cabeza de la rata a la mesa, mientras que las patas traseras se sujetaron con hilos a las rondanas laterales de la mesa.

Después de realizar la asepsia de la piel con yodo al 2%, se llevó a cabo una incisión en la línea media abdominal de aproximadamente 5 a 6 cm, desde el apéndice xifoides hacia abajo. Las vísceras abdominales se exteriorizaron hacia el lado izquierdo del animal, se colocaron sobre una gasa humedecida con solución salina (0.9%) caliente y se cubrieron con otra para evitar la desecación de los tejidos. Se identificaron la vena porta y la vena gastroduodenal en su unión con la vena porta, se colocaron dos ligaduras en la vena gastroduodenal y se cortó el vaso entre ambas. Se procedió a la disección de la vena porta desde el hilio hepático hasta su unión con la vena esplénica, con cuidado se separó la arteria hepática de la vena porta (estrechamente unidas por tejido conectivo). A nivel del hilio hepático, en la vena porta se colocó una ligadura sin apretar, que sería anudado y la vena seccionada en una etapa posterior del procedimiento. A continuación se procedió a aislar la vena cava inferior procediendo de la siguiente manera: 1) se disecó la vena renal derecha cerca de la vena cava y se coloca una ligadura, sin apretar para no interrumpir el flujo sanguíneo renal; 2) se disecó un segmento de la vena cava desde inmediatamente por arriba de la vena renal izquierda por abajo y se colocó una ligadura sin apretar, y hacia arriba hasta donde la vena cava queda oculta por el borde inferior del lóbulo hepático y se coloca una ligadura sin apretar (la vena renal derecha queda entre estos dos extremos); 3) tres ligaduras temporales se estiran suavemente de sus extremos hasta interrumpir el flujo sanguíneo por la vena cava y se enredan en las rondanas

laterales de la mesa de operaciones. En este punto, la vena cava forma un triángulo por donde no fluye la sangre; 5) se procede a hacer una venotomía elíptica de 3×2 mm en la pared anterolateral izquierda de la vena cava; 6) se elimina la sangre remanente de la vena cava con una solución heparinizada (5%); 7) a continuación se procede a cortar la vena porta de la siguiente manera; se colocó una pinza hemostática en la vena porta a nivel de la vena esplénica para bloquear la circulación sanguínea; 8) se cierra el nudo previamente preparado en la vena porta a nivel del hilio hepático y se cota en bisel. La sangre remanente en la vena se lavó con la solución heparinizada; 9) para la anastomosis porto-cava, se utilizó una sutura de 8 ceros: se colocó primero un punto de sutura uniendo el extremo posterior de la abertura anterolateral de la vena cava al extremo posterior de la vena porta, para enseguida colocar otro en el extremo anterior de la abertura de la vena cava con el extremo anterior de la vena porta; 10) a continuación, con puntos seguidos, se procedió a unir la pared posterior de la vena porta con la pared posterior de la vena cava, al llegar al extremo inferior se procede a unir los bordes anteriores de los vasos hasta regresar al punto inicial; 11) para restablecer el flujo sanguíneo en la anastomosis, se retiraron las ligaduras temporales, comenzando por la ligadura anterior, luego la renal y la posterior, y finalmente se retira la pinza de la vena porta; 12) se revisa la sutura y con hisopos de algodón se controla cualquier fuga de sangre hasta que deje de sangrar; 13) se suturó la pared abdominal en dos planos. El tiempo medio para el procedimiento de supresión del flujo sanguíneo fue de 15 a 20 minutos. Para el manejo postoperatorio, los animales fueron inyectados con 5 ml de SS/s.c. a 38°C en cada flanco, y colocados en una jaula de cuidados intensivos (con colchón térmico y oxígeno clínico). Se administró metamizol sódico (10 mg/kg/i.m./3 días) como analgésico. Para prevenir la infección se administró penprocilina (6.000 UI/i.m./24 h/3 días). Una vez recuperados de la anestesia, los animales fueron trasladados a sus jaulas con libre acceso a alimento y agua de bebida glucosada al 5% (durante 3 días).

Lobectomía neurointermedia pituitaria (LNI)

La LNI se realizó en base al procedimiento descrito previamente por Quintanar-Stephano et al., 2005, con modificaciones menores. La escisión del lóbulo neurointermedio de la hipófisis se realizó bajo un microscopio de disección (Zeiss: OPMI-19-FC con un aumento de 6X)

utilizando el abordaje parafaríngeo y la aspiración suave del lóbulo neurointermedio con una aguja doblada después de lograr una vista sin perturbaciones. En resumen, las ratas se anestesiaron con una mezcla de ketamina al 80 % (n.º de catálogo Q-0449-265) y xilazina (Nº de catálogo Q-7833-099) 20 % (1 µl/gramo de peso corporal/i.p.). Quince minutos antes de la anestesia, se inyectó atropina (0,06 mg/s.c.) para evitar la secreción excesiva de las vías respiratorias. Se afeitó el cuello y se colocó al animal en decúbito dorsal sobre la mesa de operaciones. Con la horquilla incisiva superior se fijaba la cabeza a la mesa, mientras que las patas se sujetaban con hilos a los bordes laterales de la mesa. Se canuló la tráquea a través del hocico.

El abordaje quirúrgico de la glándula pituitaria incluyó los siguientes pasos: 1) asepsia y corte de la piel en la cara anterior del cuello; 2) identificación del músculos digástrico y pterigoideo izquierdos; 3) separación roma del tendón central del músculo digástrico y pterigoideo; 4) colocación de retractores para tener una visión amplia de la parte más profunda de la abertura; 5) identificación del extremo distal de la apófisis pterigoidea izquierdo y los músculos largos de la cabeza; 6) identificación y limpieza de los huesos basioccipital y basiesfenoides; 7) identificación de la articulación occipito-esfenoidal; 8) con una broca de bola del número 8, se trepanó el cráneo en el centro de la articulación occipito-esfenoidal hasta lograr una visión clara de la cápsula pituitaria; 9) con una aguja se seccionó la cápsula pituitaria en su extremo más posterior; 10) elevación del lóbulo adenohipofisario e identificación visual de los lóbulos intermedio y neural (lóbulo neurointermedio) de la hipófisis; y 11) aspiración suave del lóbulo neurointermedio con aguja doblada en un ángulo de 45°. La cirugía no excedió los 15 min y la recuperación total de los animales ocurrió dentro de los 30 a 60 min. Después de la cirugía, a los animales se les inyectó penicilina (6000 UI, i.m. durante 3 días). Se utilizó metamizol (10 mg/kg/i. m./2 días) como analgésico.

Eutanasia

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg/i.p.) y se sangraron de la aorta abdominal. Se prepararon alícuotas de suero y se congelaron a -20 °C hasta la evaluación de las variables químicas correspondientes (pruebas de funcionamiento hepático).

También se tomaron alícuotas de sangre total con EDTA, las cuales fueron procesadas inmediatamente para la determinación del amonio. Los hígados se pesaron y muestras de tejido hepático se congelaron inmediatamente y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se evaluó el contenido de glucógeno. Otras muestras de tejido hepático fresco fueron fijadas en formol neutro al 10% y procesadas para su estudio histopatológico e inmunohistoquímico. Otras muestras de tejido hepático, se colocaron en RNAlater y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se realizaron los análisis de expresión génica por qPCR.

Pruebas de funcionamiento hepático en suero

Se midieron los niveles séricos de ALT, AST, glucosa y bilirrubinas utilizando el equipo SPINLAB 0615 (Spinreact, Girona, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, la concentración de amonio en sangre se midió utilizando el equipo FUJI DRI-CHEM 4000i (Fujifilm España).

Tabla 1. Reactivos y métodos para la determinación de pruebas de función hepática

Nombre	Técnica	Casa comercial	Nº catálogo
AST (TGO)	NADH, cinético UV. IFCC rec.	SPINREACT	BEIS09-E
UREA-LQ	Ureasa-GLDH. Cinético. Líquido.	SPINREACT	BSIS47-E
ALT (GTP)	Con/sin piridoxal-5-fosfato	DIASYS	65558
ALBÚMINA	Verde bromocresol. Colorimétrico	SPINREACT	1001020
PROTEÍNAS TOTALES	Biuret. Colorimétrico	SPINREACT	1001292
GLUCOSA	Trinder. GOD-POD	SPINREACT	10011191
BILIRRUBINAS T&D	DMSO. Colorimétrico	SPINREACT	10011044
AMONIO	FUJI DRI-CHEM	FIJIFILM	GS1-12B

Glucógeno hepático total

Se procedió a tomar una muestra congelada de tejido hepático de 0,25 gramos, la cual se colocó en 1,5 ml de tampón de citrato de fosfato con una concentración de 0,1 M a un pH de 5,2 y se homogeneizó mediante el uso del Polytron. Posteriormente el homogeneizado se mezcló con amiloglucosidasa (sigma) de *Aspergillus niger* a una velocidad de 150 rpm durante 2,5 horas. A continuación, se tomó el sobrenadante y se determinó la concentración de glucosa a través de espectrofotometría. Finalmente, el valor obtenido se multiplicó por el

peso total del hígado con el fin de estimar la concentración total de glucosa presente en todo el tejido (véase anexo C).

Tinciones histológicas

Se tomaron dos piezas de tejido hepático fresco de 0,125 cm³, las cuales fueron fijadas en formalina neutra al 10%. Posteriormente, se incluyeron en parafina, se cortaron en rebanadas de 5 µm de espesor, se montaron en portaobjetos de vidrio y se tiñeron con las técnicas de Hematoxilina y Eosina (HE), Tricrómica de Masson y de rojo Sirio. También se prepararon portaobjetos para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para alfa actina de músculo liso (α -SMA). Para los estudios de histopatología las laminillas teñidas con HE y Masson se tomaron fotografías representativas de cada grupo experimental utilizando un microscopio óptico Nikon (Optiphot-2) con aumentos de 20X y 40X. Las laminillas histológicas teñidas con rojo sirio se fotografiaron bajo luz polarizada para evaluar el área y la distribución de los diferentes tipos de colágena, la cual se expresaron en píxeles/µm². Para este estudio, se tomaron cinco fotografías por laminilla de las áreas de Rappaport utilizando un microscopio Carl Zeiss Axioscop 40, acoplado a una cámara Cool Snap-Pro Color (Media Cybernetics, Rockville, MD, EE. UU.) y las imágenes se analizaron con el software Image-Pro V4.5.1. (ampliación 40X).

Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia de α -SMA

Se desparafinaron las laminillas con xilol hasta llevarlas a etanol absoluto. Para rehidratarlas se utilizaron concentraciones decrecientes de etanol-agua hasta agua destilada y solución de PBS. Posteriormente, se pusieron en buffer de citratos con pH6 en olla a presión a una temperatura de 120-110°C durante 15 minutos, se lavaron los tejidos 3 veces con PBS durante 5 minutos c/u. Para inhibir la peroxidasa endógena, la actividad enzimática se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 1% durante 12 minutos y se lavaron con PBS. Se procedió a la permeabilización con Triton 1X durante 25 minutos. Para inhibir la unión no específica de los anticuerpos, se utilizó albúmina sérica bovina (BSA). Se diluyó el anticuerpo policlonal primario contra la α -MSA (GTX100034) de conejo en una proporción

de 1:200 y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Luego, se agregó el anticuerpo secundario HRP anti-conejo Mach2 (Biocare Medical) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Para obtener la reacción cromógena, se utilizó el kit de diaminobencidina (DAB) (Biocare Medical) y se lavaron los portaobjetos con agua después de contra-teñirlos con hematoxilina durante un minuto. Como tejido control positivo para la α -SMA, se utilizó una laminilla de fibroma uterino, mientras que, como control negativo, se reemplazó el anticuerpo primario con solo PBS. Los cortes se observaron en un microscopio invertido Axiovert 40 CFL de Zeiss.

La reacción de inmunofluorescencia se obtuvo utilizando el anticuerpo primario contra la α -SMA (GTX100034), diluido a una proporción de 1:600 durante toda la noche a temperatura ambiente. Después, se lavó tres veces con PBS. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-conejo de cabra Alexa Fluor® 488 (Invitrogen Thermo Fisher Scientific) y se incubó a la misma temperatura durante 2 horas. Para teñir los ácidos nucleicos, se utilizó Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, Inc) durante 10 minutos. Los portaobjetos se montaron utilizando el medio de montaje acuoso Fluoromount™ (Sigma-Aldrich, Inc). Los cortes teñidos fueron analizados con el microscopio de laser confocal Zeiss LSM 700. Las imágenes obtenidas se procesaron utilizando el software FIJI ImageJ2.

Administración del Conivaptán

El conivaptán (CV) (Número de catálogo BCP07817, Biochempartner, China) se administró a razón de 1 mg/kg de peso corporal. La preparación de la dosis se realizó de la siguiente manera: se disolvieron 30 mg de CV en 1 ml de dimetilsulfóxido al 99,9 % (número de catálogo 276855, Sigma-Aldrich, Alemania). Para obtener la solución de trabajo, se disolvieron 100 μ L de esta solución madre en 900 μ L de agua destilada. Cada animal fue inyectado con 100 μ L (0,3 mg/dosis) de la solución de trabajo cada 24 horas/i.m/ 8 semanas.

Aislamiento del ARN y expresión génica mediante qPCR en tiempo real

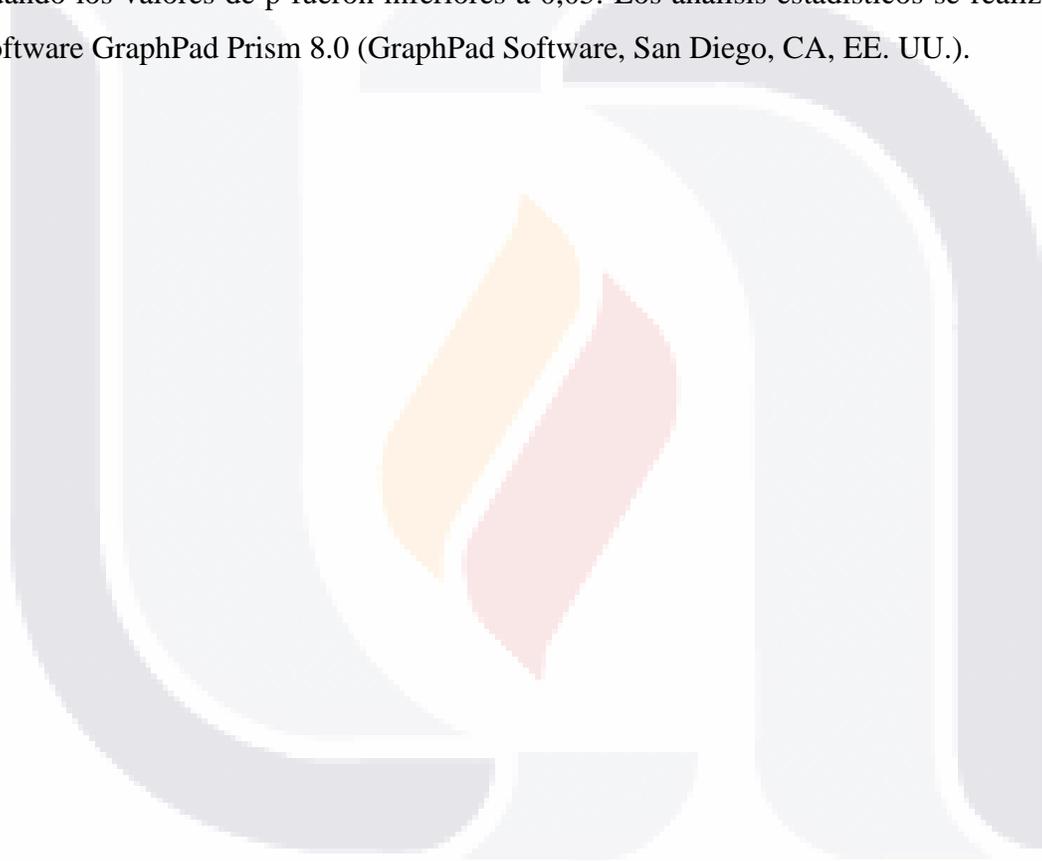
Se procedió al aislamiento del ARN total a partir de 100 mg de cada muestra de hígado, utilizando el sistema de aislamiento Jena Bioscience (Jena Bioscience, Jena, Alemania), siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. La cantidad de ARN total se determinó mediante el espectrofotómetro NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). La transcripción inversa se llevó a cabo utilizando 1 µg de ARN total y el sistema de transcripción inversa GoScript (Promega) para la realización de la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), utilizando el qPCR GreenMaster con UNG-clear (Jena Bioscience, Jena, Alemania) en una Máquina StepOne (Applied Biosystems). El protocolo de qPCR fue el siguiente: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 3 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 45 segundos y 60 °C durante 45 segundos. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para COLL I, MMP-13, metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9), factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), interleucina 6 (IL-6), inhibidor tisular de metaloproteinasa-1 (TIMP-1) e inhibidor tisular de metaloproteinasa-2 (TIMP-2), V1aR y β-actina (Tabla 1). La expresión relativa se normalizó utilizando β-actina como gen de referencia y las diferencias se determinaron utilizando el método 2-ΔΔCt.

Tabla 2. Secuencias de los Oligonucleotidos

Gen	Oligonucleotide-F	Oligonucleotide-R
IL-6	5'-CCTGGAGTTTGTGAAGAACAACACT-3'	5'-GGAAGTTGGGGTAGGAAGGA-3'
TIMP-2	5'-GCATCACCCAGAAGAAGAGC-3'	5'-GGGTCCTCGATGTCAAGAAA-3'
TIMP-1	5'-CATGGAGAGCCTCTGTGGAT-3'	5'-ATGGCTGAACAGGGAAACAC-3'
TGF-β	5'-GACTCTCCACCTGCAAGACCA-3'	5'-CGGGTGACTTCTTTGGCGTA-3'
COLL-1	5'-TTGACCCTAACCAAGGATGC-3'	5'-CACCCCTTCTGCGTTGTATT-3'
MMP-9	5'-CAGAAGCCCAAGGAAGAGTG-3'	5'-AGACCCACAGGAAACCACAG-3'
MMP-13	5'-ATCCCAGCTTAGGGCTCAAT-3'	5'-GGGAAAACAGCTACGCTGAG-3'
V1Ar	5'-GTGGTCGTCTTGGGTACATGC-3'	5'-CTTCACAGTGCGGATCTTGGC-3'
β-ACTIN	5'-GTCGTACCACTGGCATTGTG-3'	5'-GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA-3'

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar de la media (DE). Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de una prueba post-hoc de Tukey. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando los valores de p fueron inferiores a 0,05. Los análisis estadísticos se realizó con el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

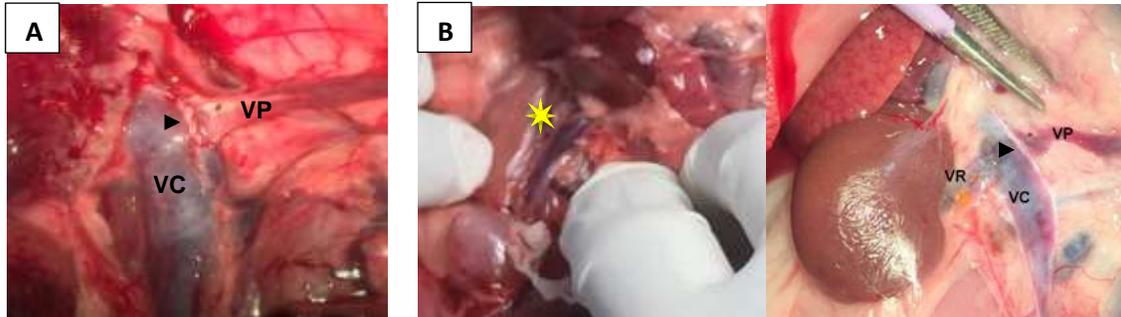


VII. RESULTADOS

En el estudio se empleó el modelo de APC en la rata para generar daño hepático crónico debido a que el flujo sanguíneo de la vena porta es desviado por medio de la anastomosis a la vena cava inferior, lo que suprime el flujo sanguíneo portal hacia el hígado. La vena porta suministra entre el 70-80% del oxígeno y nutrientes al hígado, por lo que en los animales con APC solo el 20-30% de los requerimientos metabólicos del hígado son parcialmente cubiertos por la sangre de la arteria hepática, lo que genera insuficiencia hepática y daño estructural del hígado. Así, los animales APC constituyen un modelo de gran utilidad para estudiar la fisiopatología del daño hepático y para la evaluación de los efectos de diferentes tratamientos sobre las enfermedades hepáticas crónicas, como se demuestra a continuación.

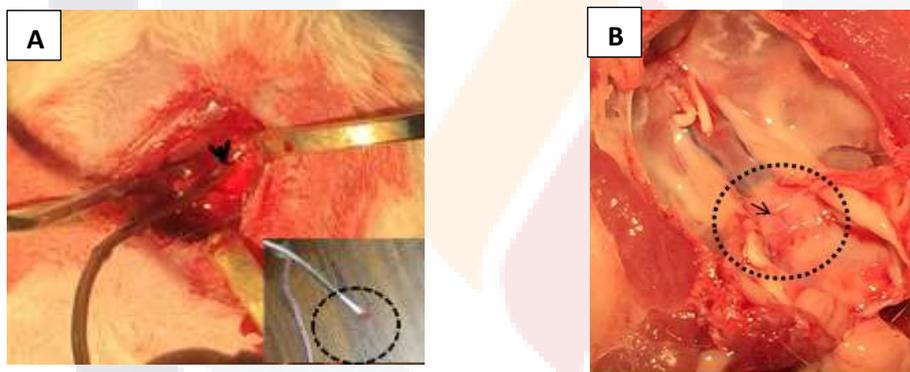
La LNI hipofisiaria es un modelo experimental que consiste en la extirpación quirúrgica de los lóbulos intermedio y neural de la hipófisis lo que da como resultado una disminución permanente de los niveles circulantes de AVP (80%) y oxitocina (90%) respectivamente. Los efectos fisiológicos más conspicuos de la LNI son el desarrollo de un cuadro pasajero en el incremento en la producción de orina e incremento de la ingesta de agua (diabetes insípida) con duración promedio de 3 semanas, hipotensión sanguínea permanente en el 75 % de los animales (Marcela Rodríguez Villanueva et al., FASEB), disminución de la inmunidad innata, y adaptativa (Quintanar-Stephano et al., 2016), disminución de la fibrosis renal (Bernardo Beiza et al., FASEB) y disminución de la fibrosis con regeneración hepática (Quintanar-Stephano et al., 2017; Miñoiz-Ortega et al., 2021). Así, la LNI experimental ha abierto un amplio campo de investigación al hacer evidentes efectos de la deficiencia de AVP, que en condiciones normales no son aparentes. Los resultados que se presentan en este trabajo, indican que el bloqueo de los receptores V1a-V2 de AVP, al igual que la deficiencia de AVP (animales LNI), protegen contra los efectos patológicos hepáticos inducidos por la APC, como se demuestra a continuación.

Figura 7. Estandarización de la APC y la LNI en rata



Proceso de estandarización del modelo quirúrgico APC.

A. Imagen de la anastomosis (punta de flecha) entre la vena porta (VP) y la vena cava inferior (VC). **B.** Hallazgos macroscópicos a las 16 semanas post cirugía, se observa un aumento del calibre de la vena cava (asterisco amarillo), se muestra el sitio de anastomosis (punta de flecha).



Proceso de estandarización del modelo quirúrgico LNI

A. Cirugía lobectomía Neurointermedia Hipofisiaria (Punta de flecha), Extirpación de la adenohipófisis (líneas punteadas). **B.** Hallazgos 8 semanas post cirugía la punta de flecha señala el espacio vacío correspondiente a la neurohipófisis y las líneas punteadas el espacio de extirpación.

Efectos de la APC, LNI, APC+LNI y APC+CV sobre el peso corporal y peso hepático

1) Peso corporal

La figura 8 muestra las medias \pm DE de los pesos corporales semanales de los diferentes grupos experimentales. Se graficaron los porcentajes de cambios de peso con respecto al peso

inicial (semana 0). En comparación con el grupo Control, la APC, la LNI, la APC+NIL y la APC+CV, indujeron una disminución significativa y permanente de los pesos corporales a lo largo del periodo experimental, sin embargo, la comparación de los pesos entre los grupos APC y APC+CV, mostró que el tratamiento con CV indujo un incremento paulatino y significativos del peso corporal al final del experimento (**p<0,01: APC vs APC+CV, y *p<0,05: APC+LNI vs APC+CV, respectivamente).

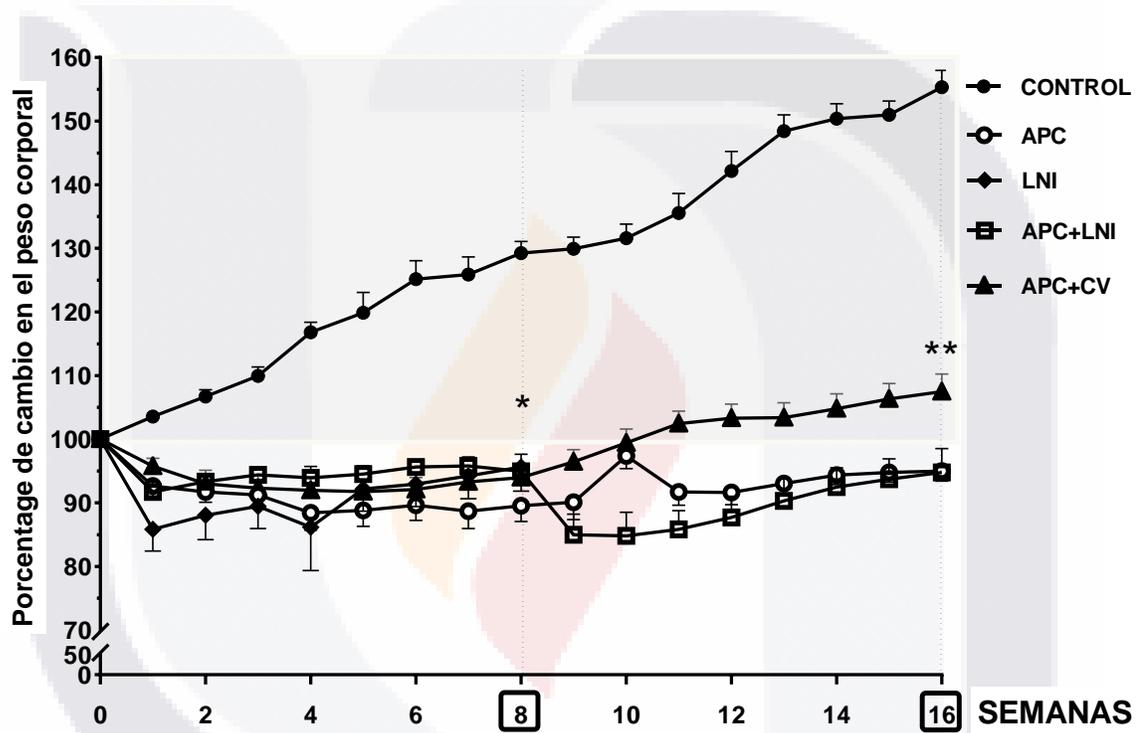


Figura 8. Efectos de la APC, LNI, APC+LNI y APC+CV sobre el peso corporal semanal. El grupo Control intacto sirvió como referencia. Los valores se expresan como la media ± DE del porcentaje de cambio de peso respecto al valor inicial (semana 0 = 100%). Observe como la administración del CV a partir de la semana 8 post cirugía indujo un incremento paulatino y significativo de la curva de peso al final del experimento (** p<0.01). n = 8–10 animales/grupo. CV, conivaptán; LNI, lobectomía pituitaria neurointermedia; APC, anastomosis porto-cava; DE, desviación estándar.

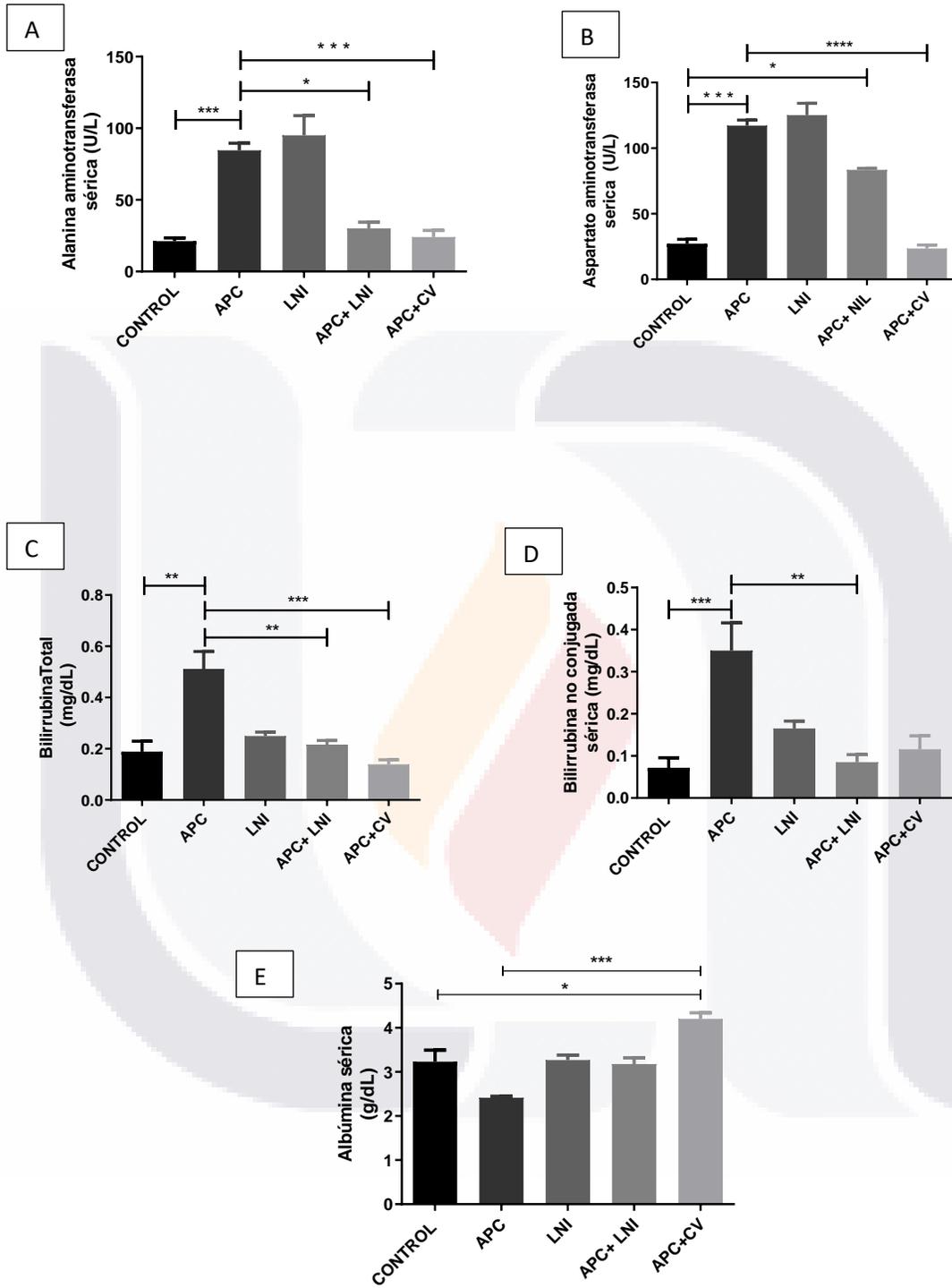
Tabla 3. Análisis morfométrico de los diferentes grupos experimentales al final del experimento.

	CONTROL	APC	LNI	APC+LNI	APC+CV
% de cambio	+50	-29	-22	-29	-23
Peso inicial (g)	239	314	355	342	272
Media del peso corporal (g)	311±2	286±2	319±3	310±2	263±2
Peso del hígado (gr de peso húmedo)	11.32±1.4	6.15±1.3 ***	11.08±1.7	10.07±0.8 #	8.18±0.8

Se determinaron los pesos corporales y del hígado en ratas 16 semanas después de la cirugía. El porcentaje de cambios negativos corresponde al peso corporal perdido durante el protocolo. ***Diferencia significativas vs grupo Control. #Diferencias significativa en comparación con el APC. Los valores se expresan como media±SD. n = 8-10 animales/grupo. Abreviaturas: CV, conivaptán; LNI, lobectomía pituitaria neurointermedia; APC, anastomosis porto-cava.

2. Pruebas de funcionamiento hepático

Tras el sacrificio de los animales, se tomaron muestras sanguíneas para determinar los niveles séricos de marcadores de funcionamiento hepático. El daño de los hepatocitos se evaluó mediante la medición de las enzimas ALT y AST. Los resultados mostraron que en comparación con el grupo Control, ambas enzimas se incrementaron significativamente en los grupos APC y LNI (**p<0,001) respectivamente (Figs. 9-A y 9-B). Observe en la figura 9-A, como los niveles de la ALT regresaron a los niveles normales en los grupos APC+LNI y APC+CV (NS: Control vs APC+LNI y APC+CV). En cuanto a la AST, observe en la figura 9-B, que, aunque esta enzima disminuyó en los APC+LNI y APC+CV, solo en el grupo tratado con CV los niveles de la enzima regresaron a los niveles normales.



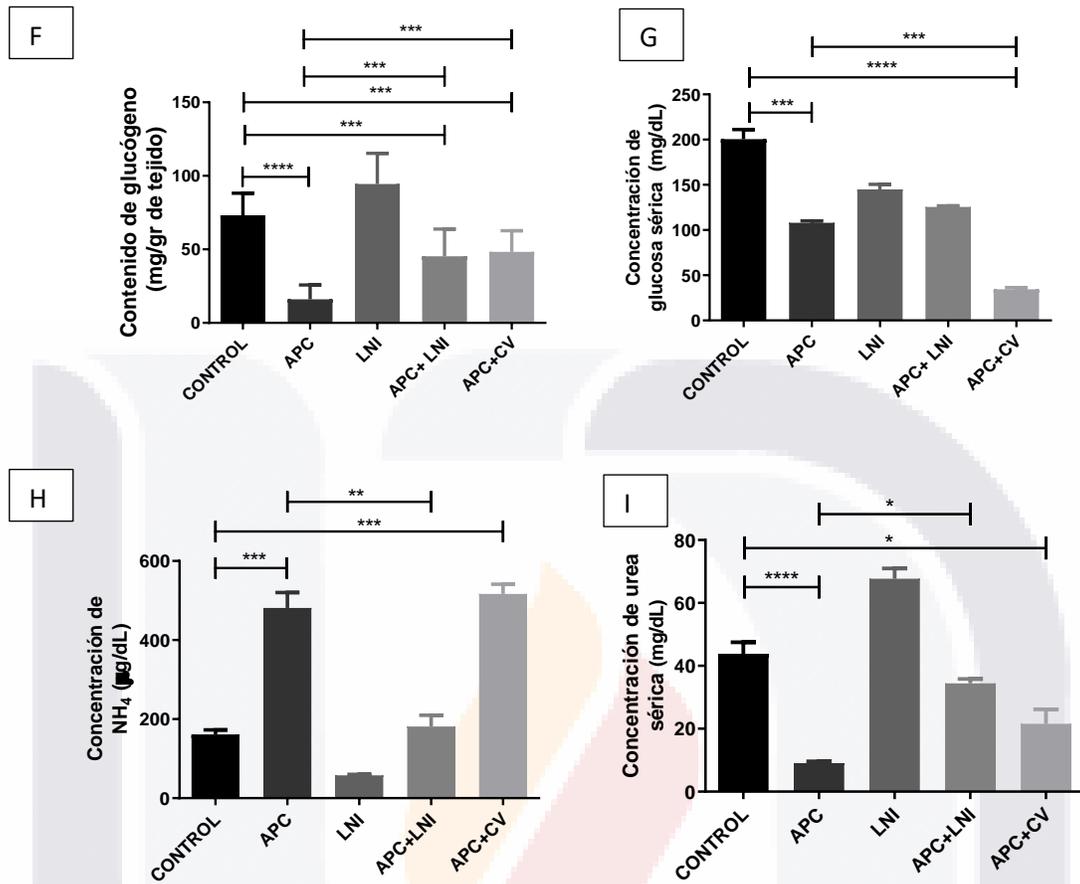


Figura 9. Efectos comparativos entre los grupos Control, APC, LNI, APC+LNI y APC+CV sobre las pruebas bioquímicas séricas y sanguíneas de funcionamiento hepático: ALT (A), AST (B), bilirrubina total (C) y bilirrubina no conjugada (D), albúmina (E), glucemia (G), amonio (H) y urea (I) y contenido de glucógeno hepático (F). *p<0,5; **p<0,01; ***p<0,001 y ****p<0,0001 entre los diferentes grupos. Los valores se expresan como la media±DE. n = 8-10 animales/grupo. Abreviaturas: CV, conivaptán; LNI, lobectomía neurointermedia hipofisiaria; APC, anastomosis porto-cava.

Los niveles séricos de las bilirrubinas totales y bilirrubina no conjugadas de los diferentes grupos, se muestran en las figuras 9-C y 9-D respectivamente. En comparación con el grupo Control, ambas bilirrubinas se incrementaron en el grupo APC (**p<0,01 y ***p<0,001: Control vs APC respectivamente). En estas mismas figuras, observe como en los grupos LNI, la deficiencia de AVP no afectó los niveles séricos de ambas bilirrubinas, mientras que en los grupos APC+LNI y APC+CV la deficiencia de AVP y el tratamiento con

CV respectivamente, indujeron una disminución en los niveles de ambas bilirrubinas a niveles normales (NS: Control vs APC+NIL y APC+CV respectivamente).

La capacidad de síntesis y secreción de las proteínas hepáticas, fueron evaluadas midiendo los niveles séricos de las proteínas totales y la albúmina en los diferentes grupos. Los resultados indicaron que mientras no se afectaron los niveles séricos de las proteínas totales en ninguno de los grupos (resultados no mostrados), los niveles de albúmina disminuyeron un 25% en el grupo APC, sin embargo, la disminución no fue estadísticamente significativa (NS: Control vs APC, LNI y APC+LNI) (Fig. 9-E). Por otro lado, en esta misma figura, observe cómo en el grupo APC+CV, el tratamiento con CV indujo un incremento significativo en los niveles de la albúmina con respecto a los grupos Control y APC (* $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$: Control y APC vs APC+CV respectivamente). La misma figura 9-E, muestra que la LNI y la APC+LNI no afectaron significativamente los niveles de albúmina.

Glucógeno hepático. Se sabe que el hígado juega un papel crucial en la homeostasis de la glucosa y que, en momentos de necesidad, por medio de la glucogenólisis, el glucógeno puede ser movilizado al torrente sanguíneo en forma de glucosa. En la figura 9-F se muestra el contenido de glucógeno hepático en los diferentes grupos. Observe que, en comparación con los demás grupos, la APC indujo una disminución significativa en el contenido de glucógeno (*** $p < 0,001$: Control, LNI, PCA+LNI y PCA+CV vs PCA). Por otro lado, mientras que LNI sola no afectó el contenido de glucógeno, la comparación del grupo APC con los grupos APC+LNI y APC+CV, muestra que tanto la LNI como el tratamiento con CV, indujeron un incremento significativo en el contenido de glucógeno hepático (*** $p < 0,001$: APC vs APC+LNI y APC+CV respectivamente). Aunque estos incrementos no alcanzaron los niveles normales la comparación entre estos grupos con el Control, no mostró diferencias significativas (NS: Control vs APC+NIL y APC+CV) (Fig. 9-F).

Glucemia. En comparación con el grupo Control, la APC indujo una hipoglucemia significativa (*** $p < 0,001$: Control vs APC) (Fig. 9-G). En comparación con el grupo Control, en los grupos LNI y APC+LNI, las glucemias disminuyeron 50% y 30% respectivamente, sin embargo, estos valores no fueron estadísticamente significativas (NS:

Control vs APC y APC+LNI). Observe en la misma figura 9-E, que en comparación con los grupos Control y APC, en el grupo APC tratado con CV, este indujo una hipoglucemia severa (34.44 ± 7.9 mg/dL). Esta hipoglucemia contrasta con el incremento en el peso del hígado y en el contenido de glucógeno hepático observados en este mismo grupo APC+CV (Tabla 3 y figura 9-F).

Amonio y urea. Otra importante función del hígado es la regulación del metabolismo del amonio y la urea, y cambios en las concentraciones sanguíneas, constituyen dos marcadores importantes de daño hepático. Los resultados obtenidos en los diferentes grupos experimentales se muestran en la figura 9-H. Observe que, en comparación con el Grupo Control, la APC indujo un incremento significativo en los niveles de amonio (267%; $***p < 0,001$: Control vs APC). Esta misma figura muestra que en el grupo solo LNI, la deficiencia de AVP causó una disminución de los niveles de amonio en un 65%; aunque esta disminución no fue estadísticamente significativa (NS: Control vs LNI). Por otro lado, observe que en comparación con los grupos Control y APC, en el grupo APC+LNI, la LNI indujo una disminución del amonio a niveles normales (NS: Control vs APC+NIL y $**p < 0.01$: APC vs APC+NIL) (Fig. 9-H). Por último, en contraste con el restablecimiento a la normalidad de los valores de amonio encontrados con en el grupo APC+NIL, la administración de CV al grupo PCA+CV, no afectó los elevados niveles de amonio causados por la sola APC (NS: APC vs APC+CV) (Fig. 9-H).

Urea. La figura 9-I muestra que en comparación con los niveles del grupo Control, la APC indujo una disminución significativa de la urea circulante ($****p < 0,0001$: Control vs PCA), mientras que la LNI indujo un incremento del 58% en los niveles de urea, este no fue estadísticamente significativo (NS: Control vs LNI). Por otro lado, la LNI a los animales APC (grupo APC+LNI), impidió que los niveles de urea disminuyeran a los niveles observados en el grupo APC ($*p < 0,05$: PCA vs APC+NIL) (Fig. 9-I). Finalmente, el tratamiento con CV al grupo APC+CV, indujo un restablecimiento parcial (50%) aunque no significativo de los niveles de urea (NS: APC vs. APC+CV).

3. Análisis histopatológico

Tinción de Hematoxilina-Eosina

Se tomaron fotografías microscópicas de diversas áreas de tejido hepático de cada grupo, teñidos con H-E, para ilustran los hallazgos histopatológicos más representativos de cada condición experimental. La figura 10-A corresponde a un hígado de un animal Control. En este, se pueden apreciar la disposición y características normales de los elementos más importantes que forman la triada hepática (conducto biliar [CB], arteria hepática [AH] y vena porta [VP]) localizada en la zona periportal, rodeados de una delgada capa de tejido conectivo. Aunque los cambios histopatológicos inducidos por las diferentes condiciones experimentales ocurren en todo el hígado, los cambios más evidentes en respuesta a los diferentes tratamientos ocurrieron en las áreas periportales de los lóbulos hepáticos. Así, la figura 10-B, muestra las características histopatológicas de un hígado de rata sometida a APC a las 16 semanas post-cirugía. Observe que, en comparación con el Control, en el grupo APC (Fig. 10-B), ocurrieron cambios notables en la histología hepática, caracterizada por la presencia de discretos infiltrados inflamatorios distribuidos en las diferentes áreas del hígado, principalmente en las áreas periportales que rodean a los vasos de la triada (triaditis), presencia de una cubierta gruesa de tejido fibroso alrededor de la triada (línea interrumpida, leve pleomorfismo nuclear, binucleación ocasional de hepatocitos y una disminución leve del contenido de glucógeno. Otro hallazgo significativo es la presencia de colestasis focal con desarrollo de un mayor número de conducto biliares (Fig. 10-B flechas amarillas).

La comparación de los diferentes componentes periportales de la triada entre el grupo Control (Fig.10-A) y el grupo LNI (Fig. 10-C), no mostró diferencias significativas, mientras que la comparación de estas estructuras de los grupos Control y APC con las del grupo APC+LNI (Fig. 10-D), mostró menores cambios estructurales de la triada (menor cantidad de tejido fibroso rodeando los vasos de la triada), menor número de conductos biliares, menor colestasis focal y menor número de infiltrados inflamatorios (puntas de flecha negra). La comparación entre los grupos Control, APC, APC+LNI con el grupo APC+CV (Fig. 10-E) muestra una mayor cantidad de infiltrados inflamatorios en el área periportal (puntas de

flecha negras), mientras que la cantidad de tejido fibroso disminuyó significativamente, mostrando así, una apariencia semejante a lo observado en los grupos Control y APC+LNI. Observe también que en comparación con el grupo solo APC, la cantidad de tejido fibroso periportal, los conductos biliares son de menor diámetro y menos desarrollados. En conjunto, estos resultados indican que tanto la deficiencia de AVP como el tratamiento con CV en los animales con APC y protegen contra el daño hepático inducido por la APC.

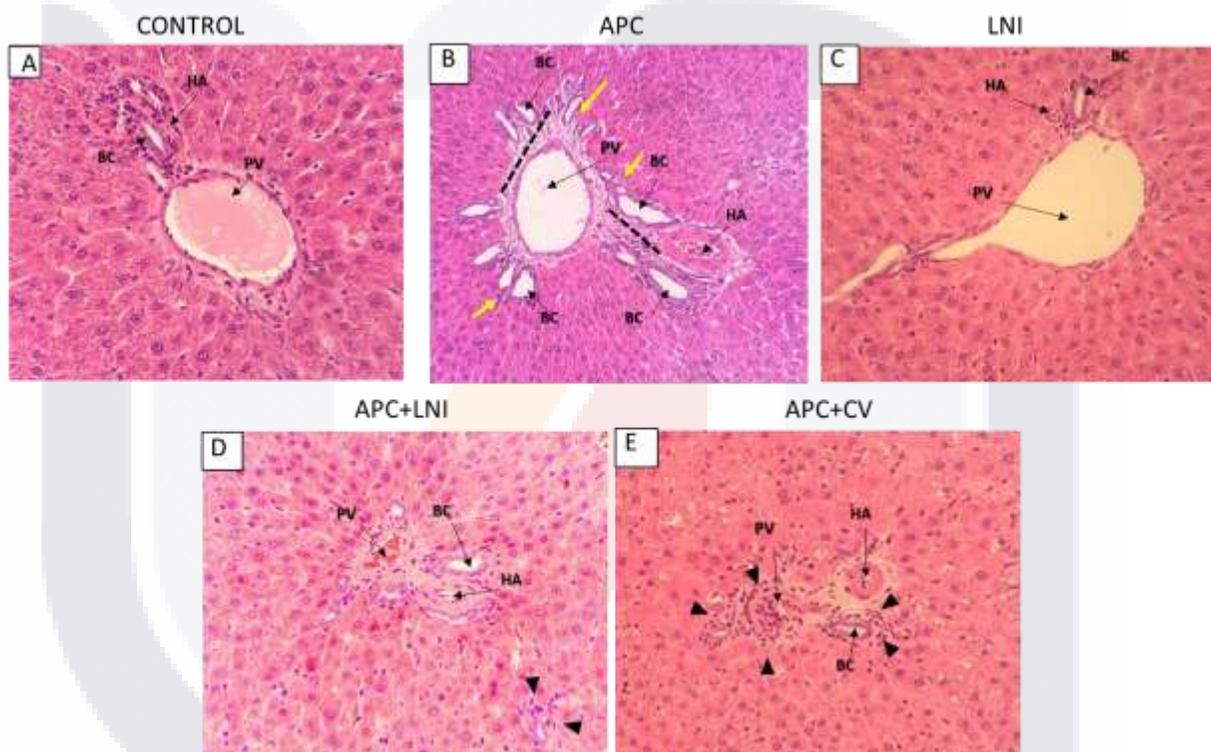


Figura 10. Comparación de los efectos de la APC (B), LNI (C), APC+LNI (D) y APC+CV (E) sobre la histopatología hepática. El grupo Control (A) se incluyó como referencia. Tinción H-E. Las fotografías se tomaron a 400X. Infiltrados inflamatorios; punta de flecha negra, Área de fibrosis en el grupo APC (B) (líneas segmentadas), Conducto biliar; CB, Conivaptán; CV, Arteria hepática; HA, Vena porta; VP. Lobectomía pituitaria neurointermedia; LNI, Anastomosis portocava; APC.

Tinción tricrómica de Masson

La tinción histológica tricrómica de Masson es una técnica que se utiliza para visualizar y diferenciar los tejidos conectivos, musculares y fibras elásticas en laminillas de diferentes

tejidos. Esta tinción tiñe de azul a las fibras de colágena, principalmente de tipo I, que es el principal componente del tejido fibroso cicatricial.

El estudio de las laminillas de hígado teñidas con esta técnica, mostró que mientras que en el grupo Control (Fig. 11-A), las fibras de colágena son delgadas y alargadas y están dispuestas de tal manera forman una discreta y delgada capa de tejido conectivo que rodea a los vasos de la triada hepática (CB, AH y VP). Por otro lado, en los hígados del grupo APC (Fig. 11-B), la colágena es mucho abundantes y forma haces gruesos de fibras que rodean a los vasos de la triada (CB, HE y VP) e invadiendo a las áreas circunvecinas del parénquima hepático. En el grupo LNI, la distribución y características de las fibras de colágena fueron muy semejantes a las descritas en grupo Control, es decir no se encontraron diferencias significativas (Figuras 11-A y 11-B). La comparación entre los grupos APC y APC+NIL (Figs. 10-B y 10-D), mostró que la deficiencia de AVP inducida por la LNI, indujo una disminución significativa en la cantidad de tejido fibroso periportal y de las áreas parenquimatosas circunvecinas lo que sugiere que la deficiencia de AVP juega un papel importante en la involución de la fibrosis hepática. Finalmente, observe que en el grupo APC+CV (Fig. 11-E), el tratamiento con CV también indujo una disminución significativa en la cantidad y distribución de tejido fibroso, semejante a lo ocurrido en al grupo APC+LNI (Fig. 11-D), mientras que en comparación con el grupo solo APC (Fig-10-B), en el grupo APC+CV (Fig. 10-E), se observó una disminución significativa en el número y grosor de las fibras de colágeno, así como un menor número de puentes fibrosos.

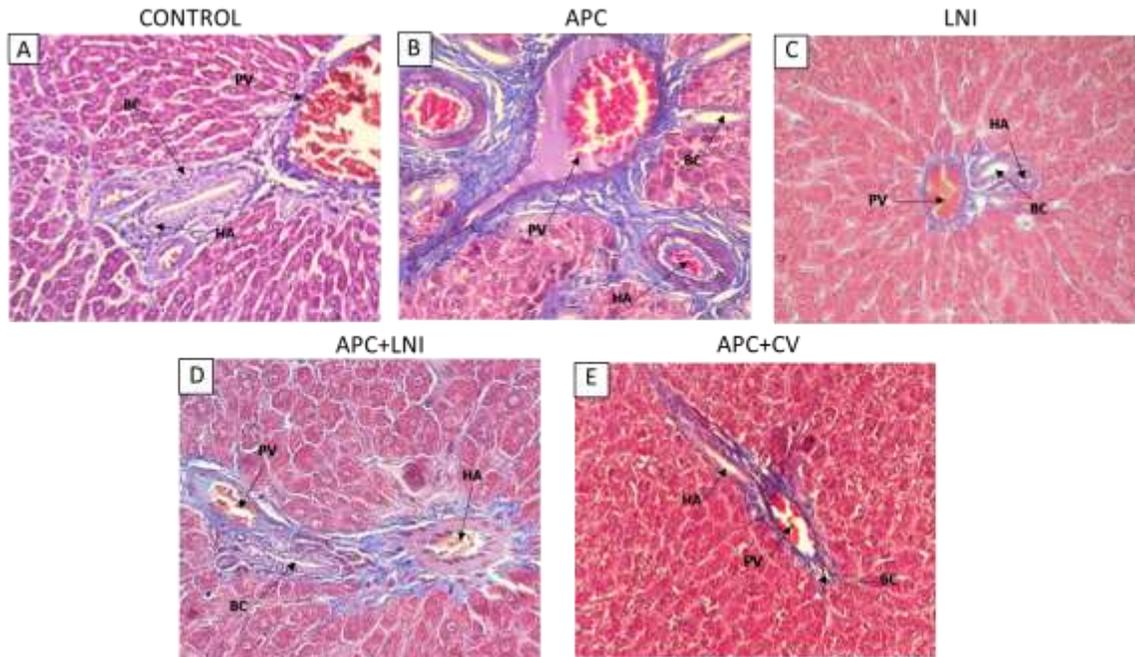


Figura 11. Comparación de los efectos de la APC (B), LNI (C), APC+LNI (D) y APC+CV (E) sobre la fibrosis hepática periportal (color azul), en laminillas teñidas con la técnica tricrómica de Masson. El grupo Control (A) se incluyó como referencia. Las microfotografías se tomaron a un aumento de 200X. Conducto biliar; CB, Conivaptán; CV, Arteria hepática; HA, Vena porta; VP. Lobectomía neurointermedia pituitaria; LNI, Anastomosis portocava; APC. Excepto el grupo LNI, que fue sacrificado a las 8 semanas post cirugía los demás grupos se sacrificaron a las 16 semanas post PCA.

Tinción de rojo sirio

La tinción de rojo sirio se utiliza por su capacidad de teñir diferencialmente la colágena tipo I y colágena tipo III, cuando se observan bajo luz polarizada. En los tejidos normales predomina la colágena tipo III, compuesta de fibras de colágena delgadas que se tiñen de color verde, mientras que las fibras de colágena tipo I se observan de color rojo y amarillo-naranja claro, y es la más abundante en el tejido fibroso cicatricial. Además, la proporción de cada tipo de colágena permite determinar el grado de fibrosis, así como evaluar los cambios en respuesta a los tratamientos antifibróticos. En el presente estudio, el análisis morfométrico de los cambios en las áreas de fibrósisis se hizo en fotografías de hígado de

cada grupo experimental utilizando el programa de análisis de imágenes ImageJ en un área de 1,5202 píxeles/ μm .

En las fotografías de la figura 12 A, B, C y D, se muestra la distribución de la fibrosis y tipo de colágena predominante en las áreas priortales de cada grupo, mientras que en la gráfica de la Fig. 12-F, se muestra la media \pm DE del área de fibrosis de cada grupo. Los resultados indican que la deficiencia de AVP y el tratamiento con CV en las ratas con APC, indujeron una disminución significativa en el porcentaje de fibrosis, así como una reversión en la proporción de colágena Tipo I y un incremento en la colágena tipo III (Fig.12-F).

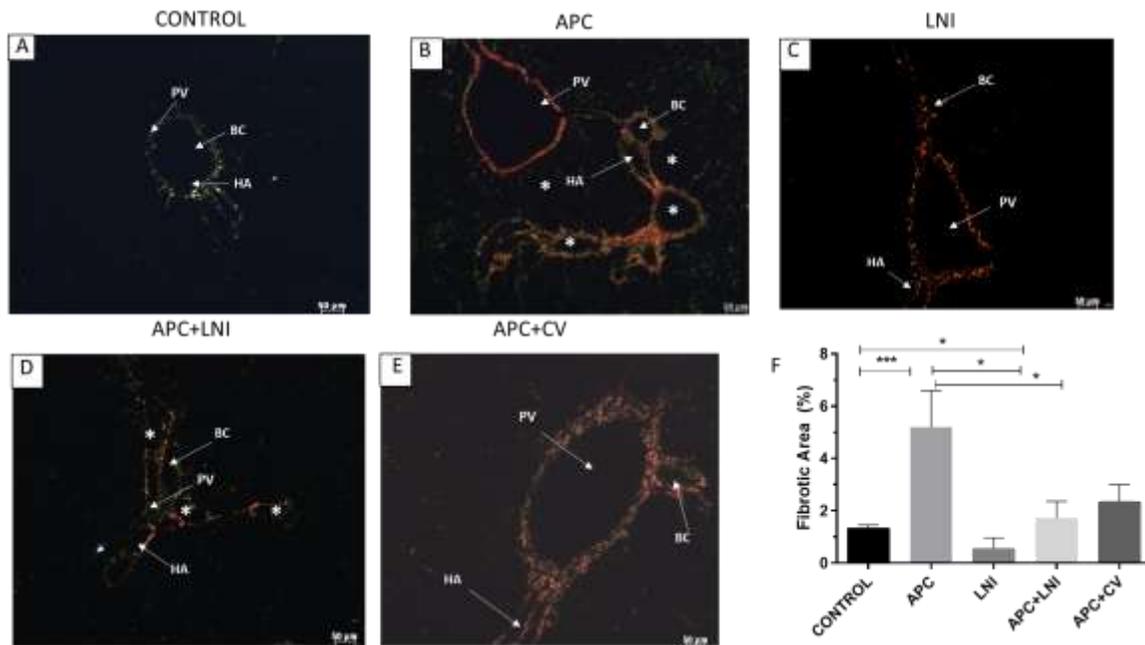


Figura 12. Fotografías de laminillas de hígado teñidas con rojo sirio tomadas bajo luz polarizada de las áreas periportales de todos los grupos: Control (A), APC (B), LNI (C), APC+NIL (D) y APC+CV (E). La figura 12-A, muestra la disposición normal y el predominio de las fibras de colágena tipo III (verde) rodeando a los componentes de la triada: conducto biliar (CB), arteria hepática (AH) y vena porta (VP). La figura 12-B de un animal APC, muestra un importante incremento en el grosor de las fibras de colágena formando tabiques de

mayor espesor que envuelven a la triada e invaden la zona parenquimatosa circundante; observe además, el predominio de la colágena tipo I (rojo-amarillo-naranja). La figura 12-C muestra un predominio de colágena tipo I, sin embargo sus fibras aunque ligeramente más gruesas la cantidad y distribución de la colágena en la matriz extracelular no fue diferente a la del grupo Control. La fotografía 12-D, muestra que comparada con el Control (12-C), contiene menor cantidad de tejido fibroso y una mayor mezcla de ambos tipos de colágena, con un ligero predominio de colágena tipo III. En la figura 12-D, muestra que el CV indujo reversión de la fibrosis y una mayor mezcla de ambos tipos de colágena. Las fotografías se tomaron con un aumento de 10X.

La Tabla 4 resume los principales cambios histopatológicos y citológicos de los hígados de los diferentes grupos experimentales

Grupo experimental	Cambios estromales		Cambios celulares		
	Infiltrado inflamatorio	Fibras de colágeno	Pleomorfismo	Binucleación	Colestasis
CONTROL	-	-	-	-	-
APC	++	++	++	++	+
LNI	-	-	-	-	-
APC+LNI	+	focal (+)	++	+	-
APC+CV	+	-	++	++	-

Tabla 4. Principales cambios histopatológicos estromales y celulares en hígados de los diferentes grupos experimentales. (-) ausente, (+) poco abundantes, (++) más abundantes.

Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia

Estas tinciones histológicas permiten identificar de manera específica la presencia de antígenos específicos mediante el uso anticuerpos dirigidos a un antígeno de interés. En el caso de la técnica de inmunohistoquímica (IHQ), un resultado positivo se visualiza como una tinción marrón delimitada al área del conjugado enzimático, mientras que en la inmunofluorescencia (IF), se observa la fluorescencia del marcaje localizado en el tejido debido a la utilización de fluoróforos (Fig. 13).

La α -SMA es parte de la estructura protéica de las fibras de colágena, y su visualización permite evaluar en los tejidos el grado de fibrosis tanto en condiciones normales como

patológicas. En el presente trabajo se utilizaron ambas técnicas para evaluar la expresión de α -SMA en el tejido hepático de los diferentes grupos experimentales. Se sabe que los estímulos nocivos al hígado, se activan las células estelares y diferencian en miofibroblastos los cuales expresan a la proteína α -MSA, uno de los componentes fundamentales de las fibras de colágena, lo que incrementa el depósito de la matriz extracelular, dando lugar a la fibrosis. Así, a medida que aumenta la expresión de α -SMA el resultado será un aumento de tejido cicatricial en el hígado, tal como se observa en el grupo APC. Por tal motivo, la utilización de ambas técnicas permite reforzar los hallazgos obtenidos en las tinciones histológicas de tricrómica de Masson y de rojo sirio. Los resultados indican claramente que la deficiencia de AVP y el bloqueo de los receptores de AVP por el CV indujeron una disminución significativa en el grado de fibrosis hepática, y sugieren fuertemente que el conivaptan puede ser utilizado en el tratamiento contra la fibrosis hepática.

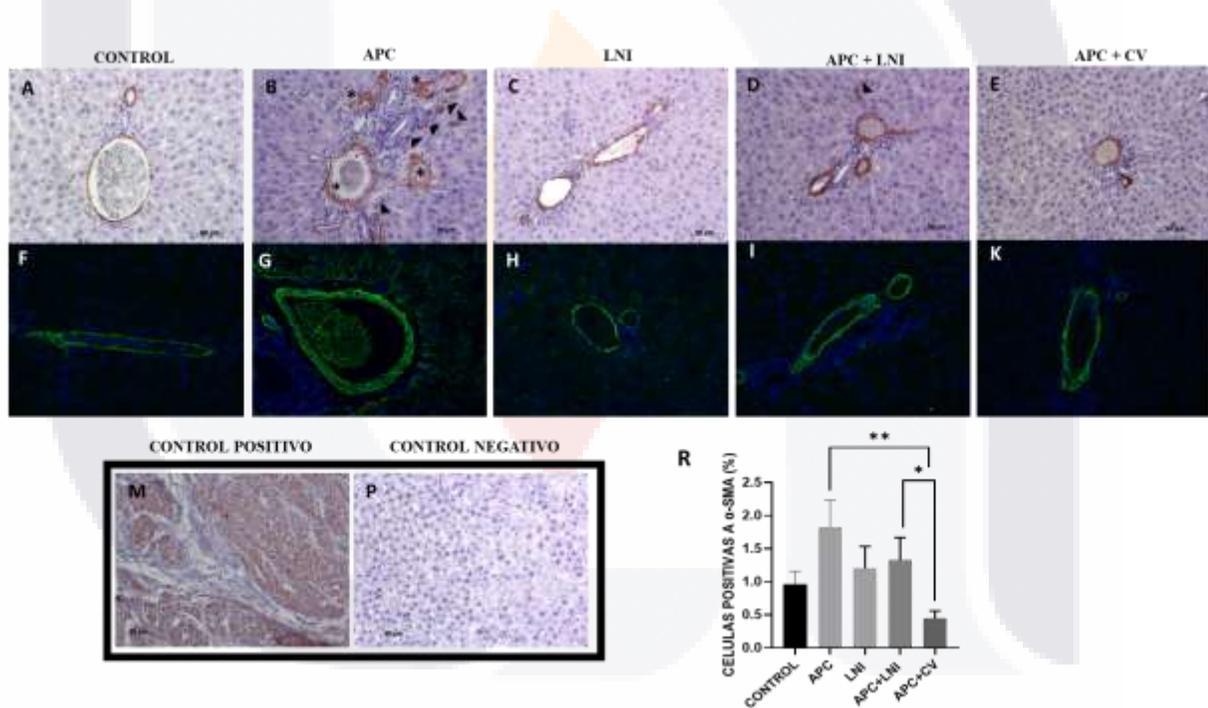


Figura 13. Fotografías de las áreas periportales de hígado teñidas para α -SMA con las técnicas de inmunohistoquímica (A, B, C, D y E) e inmunofluorescencia (F, G, H, I y J) respectivamente. Control, Anastomosis portocava (APS), Lobectomía neurointermedia hipofisiaria (LNI), APC+LNI y APC+CV. El control positivo de α -SMA (M) (mioma uterino). Control negativo (L) (mioma uterino sin el anticuerpo primario). aumento 20X. Las barras representan 50 μ m. La gráfica R, de esta misma figura 13, muestra el porcentaje de células positivas para la α -MSA de cada grupo evaluadas con el programa ImageJ. Conivaptán (CV). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

9. Expresión génica de marcadores fibrogénicos (qPCR).

Con el objeto de profundizar en los mecanismos moleculares y celulares que median el proceso inflamatorio y la fibrosis hepática en los diferentes grupos experimentales, se analizó por PCR cuantitativa (qPCR) la expresión de algunos genes clave en estos procesos como el *TGF-β*, colágena tipo I (*COLL-I*), inhibidores de la metaloproteasas tisulares 1 y 2 (*TIMP-1* y *TIMP-2*) y las metaloproteasas de la matriz extracelular 9 (*MMP-9*) y 13 (*MMP-13*). Se sabe que *TGF-β*, juega un papel profibrogénico importante en la inducción del depósito de colágena I (*COLL-I*). Los presentes resultados mostraron un aumento significativo en la expresión de *TGF-β* en el grupo APC (11 veces más que el grupo control, **** $p < 0,0001$: APC vs Control) (Fig.14-A). Por otro lado, en comparación con el grupo APC, los grupos APC+LNI y APC+CV, mostraron una disminución del 40% en la expresión del *TGF-β*, aunque estas disminuciones no fueron estadísticamente significativas (NS: APC vs APC+LNI y APC+CV. Fig. 14-A). No obstante, observe que la disminución de la expresión de *TGF-β* en estos grupos (Fig. 14-A), correlaciona con la disminución en la expresión de la *COLL-I* (Fig. 14-B). Así, estas observaciones apoyan el concepto de que el *TGF-β* participa en la regulación de la expresión de *COLL-I*, y que los incrementos en la expresión de *TGF-β* y *COLL-I* son parcialmente inhibidas por la deficiencia de AVP (LNI) y el bloqueo de los receptores V1a-V2 de AVP por el CV (Figs. 14-A y 14-B). Por otro lado, se sabe que durante el daño hepático se altera el equilibrio entre los procesos *síntesis-degradación* de la matriz extracelular (MEC) y que en estos procesos participan los TIMPs 1 y 2 y las MMPs 9 y 13, de tal manera que si predomina la presencia de TIMP-2 favorece el desarrollo de la fibrosis, mientras que si predomina la presencia de la MMPs-13, se incrementa el mecanismo de degradación. La Fig. 14-C muestran que en comparación con el grupo Control, la expresión de TIMP-1 aunque más expresada en los grupos PCA, PCA+NIL y PCA+CV, las diferencias entre ellos no fueron significativas. Por otro lado, la expresión del *TIMP-2* (Fig. 14-D) en los diferentes grupos experimentales, mostró que en comparación con el grupo PCA, solo el grupo APC+CV, experimentó un incremento significativo en la expresión de este inhibidor de metaloproteasas (* $p < 0.05$: PCA vs APV+CV. Fig. 14-D). ...ras que no ocurrieron diferencias significativas en la expresión de *TIMP-1* entre el APC vs APC+LNI, al

comparar el grupo APC con , en comparación con el grupo APC, la expresión de los *TIMP-1* y *TIMP-2*, en el grupo APC+LNI no mostró cambios significativos, mientras que en comparación con el grupo APC+CV, la expresión de *TIMP-1*, no fue afectada, la expresión de *TIMP-2* aumentó significativamente indicando que CV indujo una disminución (. Además, como se muestra en la Figura 14, también fue evidente una disminución relativa en la expresión de TGF-β y COL-1 en el grupo APC+CV.

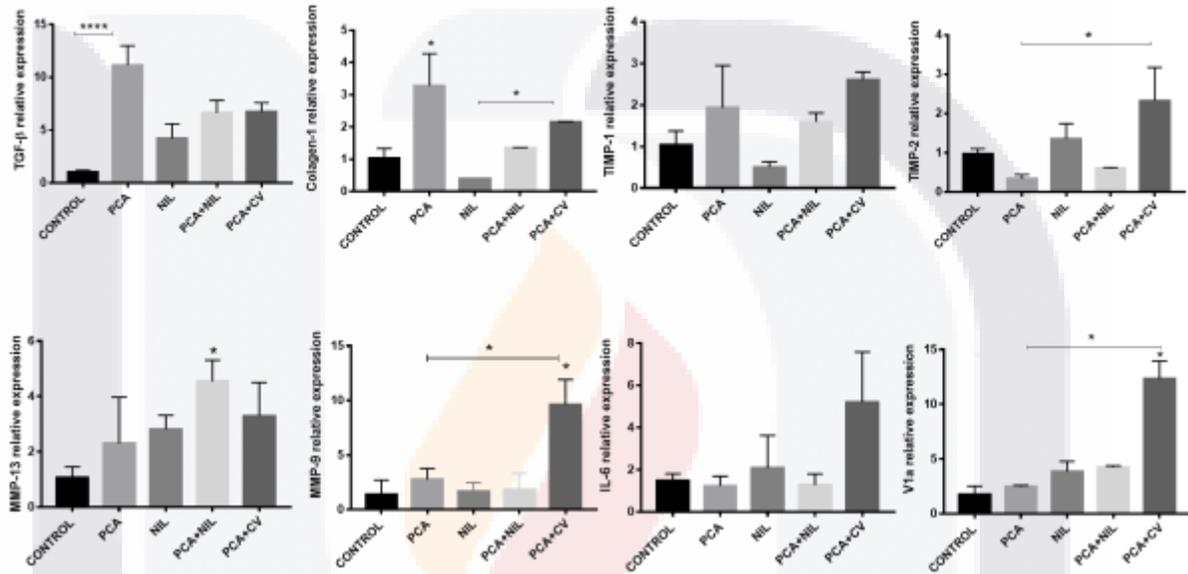


Figura 14. Expresión de marcadores reguladores de ECM en rata. El análisis cuantitativo por qPCR muestra los niveles relativos de expresión (eje Y) para cada marcador (TGF-β, Colágeno-1, MMP-13, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, V1aR e IL-6), estos se evaluaron con un ANOVA de dos vías y una prueba de Tukey post hoc. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 de los grupos de tratamiento con relación al control. Grupos (n=3). Abreviaturas: ECM, matriz extracelular; IL, interleucina; MMP, metaloproteinasas de matriz; qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; TGF-β, factor de crecimiento transformante-beta; TIMP, inhibidor tisular de metaloproteinasas; V1AR, receptor de arginina vasopresina V1a.

VIII. DISCUSION

Los resultados del presente proyecto confirman que la APC es un modelo experimental que reproduce la enfermedad hepática crónica, caracterizada por desarrollo progresivo de fibrosis, alteraciones metabólicas, fisiopatológicas y morfológicas del hígado, como atrofia hepática, disminución del contenido de glucógeno, aumento de los niveles séricos de ALT y AST, hiperbilirrubinemia (total y no conjugada), bajos niveles séricos de urea y glucosa, hiperamonemia, insuficiencia hepática, alteraciones histológicas, alteraciones hemodinámicas y fibrosis (8,9,23,29). Así, los efectos de la APC sobre las diversas funciones hepáticas, nos permitieron comparar con un alto grado de certeza los efectos de la deficiencia de AVP y el tratamiento con CV sobre las funciones hepáticas de los grupos APC+LNI y APC+CV.

Se sabe que la AVP es una hormona inmunoestimulante la cual, actuando directamente sobre diversas células del sistema inmune, estimula la respuesta inflamatoria [20-23]. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares a través de los cuales la AVP o la deficiencia de AVP (inducida por la LNI), regula las funciones hepáticas y la respuesta inflamatoria del hígado durante el daño hepático están empezando a ser estudiadas (Bataller et al., 1997; Quintanar-Stephano et al., 2017; Muñoz-Ortega et al. 2021; Villabona. 2010; Koshimizu et al., 2012). En este sentido, Quintanar-Stephano et al., 2017, describieron que la deficiencia de AVP (inducida por la LNI) en hámster con cirrosis (inducida por CCl₄), causó disminución en los niveles de fosfatasa alcalina en suero y la expresión de colágena tipo I y TIMP-2, mientras que aumentó los depósitos de colágena tipo III, sí como de la expresión de MMP-13 y el tamaño de los nódulos de regeneración. Así, estos autores demostraron que la deficiencia de AVP participa de manera importante en la regeneración hepática a través de: 1) inhibir la actividad de los fibroblastos productores de colágena tipo I y favorecer la actividad de los fibroblastos productores de Colágena tipo III, 2) regular a la baja la actividad de la fosfatasa alcalina del epitelio de los conductos biliares, y 3) inhibir la expresión de TIMP-2 mientras incrementa la producción de la MMP-13. Así, en conjunto, la deficiencia de AVP estaría favoreciendo la regeneración de las funciones hepáticas y la disminución de la fibrosis

del hígado. En un segundo artículo estos mismos autores utilizando como modelo de daño hepático la APC en la rata, confirmaron los resultados de los efectos regeneradores de la LNI sobre el daño hepático y la disminución de la fibrosis en el hámster cirrótico. En este segundo trabajo, los autores compararon las pruebas de funcionamiento hepático, la expresión de genes relacionados con el proceso inflamatorio (IL-1, IL-10, TGF- β , colágena 1 (COLL-I), MMP-9 y MMP-13) y cambios histopatológicos en grupos de ratas Control Intacto (CI), NIL, APC, y APC+NIL. Los resultados mostraron que en comparación con los grupos CI y APC, en el grupo APC+LNI, las bilirrubinas, las proteínas séricas y glucógeno hepático se recuperaron en un 100%, se redujo la expresión de genes relacionados con procesos inflamatorios (IL-1 y COLL-I), mientras se incrementó la expresión de los genes de IL-10 y MMP-13, relacionados con los procesos antiinflamatorios antifibróticos respectivamente. Así mismo, en comparación con el grupo CI y APC, en el grupo APC+NIL, el estudio histopatológico mostró una disminución significativa de los signos de daño hepático; menor cantidad de fibrosis periportal. Estos investigadores sugirieron que un posible mecanismo por el cual la deficiencia de AVP media los efectos observados, se podría deber, a que los bajos niveles séricos de AVP no fueron suficientes para activar de manera eficiente a los receptores de AVP, lo que estaría dando lugar a una menor activación de las vías de señalización celular asociadas al proceso inflamatorio y la fibrosis, mientras que se estarían activando otras vías de señalización celular asociadas a una respuesta antiinflamatoria-antifibrótica. Estos resultados apoyan el concepto de que la AVP juega un papel crucial en los procesos inflamatorios-profibróticos y el mantenimiento de la competencia inmunitaria.

Los resultados del presente proyecto confirmaron, por un lado, el efecto benéfico de la deficiencia de AVP sobre el daño hepático, mientras que el efecto de bloquear los receptores de AVP con el CV, los resultados fueron parcialmente semejantes a los de la deficiencia de AVP. Así, la comparación de los efectos de la LNI versus los del CV, mostraron las siguientes diferencias. La deficiencia de AVP en los animales APC+NIL, reversionó a valores normales el peso del hígado, la glucemia, la ALT (pero no la AST), la bilirrubina total y no conjugada, la albúmina, la urea y el amonio, mientras que el contenido de glucógeno hepático lo restableció solo parcialmente (Tabla 3 y Fig. 9). Por otro lado, la administración de CV a los

animales con APC, indujo reversión a la normalidad del peso hepático, la ALT y las bilirrubinas, mientras que el glucógeno hepático, la AST y la urea, solo se revirtieron parcialmente. En este mismo grupo, los niveles de amonio persistieron elevados, así como la albúmina, mientras que la glucemia cayó a niveles hipoglucemiantes (37 mg/dl). (Tabla 3 y Fig. 9).

La comparación de los cambios histopatológicos entre los grupos APC versus los APC+LNI y APC+CV, mostró que tanto la deficiencia de AVP como el tratamiento con CV indujeron una reversión significativa del daño hepático, principalmente en las áreas periportales y de la triada hepática, en las que se observó una significativa disminución de las áreas de fibrosis (Figs. 10, 11 y 12). Comparativamente, la disminución de la fibrosis fue más evidente en el grupo tratado con CV (Fig. 11). En este sentido, el grupo APC+CV mostró una mayor disminución de la cantidad de células positivas a la α -SMA (Fig. 13), sugiriendo que el CV indujo disminución significativa de la activación de los fibroblastos productores de fibrosis. El efecto antifibrótico del CV sobre la fibrosis hepática también se aprecia en la Figs. 11 y 13. Estos resultados sugieren que el uso de antagonistas de los receptores de AVP podrían ser utilizados como una alternativa terapéutica en el tratamiento de enfermedades hepáticas que cursen con daño hepático crónico.

La mayoría de las células del hígado poseen receptores de AVP, lo que sugiere que los efectos de la deficiencia de AVP o el tratamiento con CV afectan muchas de las funciones metabólicas de los hepatocitos, de las células epiteliales de los conductos biliares, las células del sistema inmune, las células estelares hepáticas, miofibroblastos, fibroblastos, células de Kupffer, macrófagos, células endoteliales y epiteliales vasculares, células musculares lisas vasculares (22, 30), las cuales son activadas por los factores proinflamatorios causantes del daño, dando lugar al desarrollo de la insuficiencia hepática y fibrosis. Así, los mecanismos a través de los cuales la deficiencia de AVP o el CV revierten los efectos de la APC, pueden ser parcialmente explicados por las acciones conocidas de la AVP sobre los diferentes tipos celulares que componen al hígado. Los receptores de AVP más abundantes en el hígado son los receptores V1a, los cuales, al ser estimulados por la AVP, activan un gran número de vías de señalización celular que participan en las diferentes vías metabólicas de carbohidratos, proteínas y grasas, así como de las respuestas inmunes a nivel del hígado (11).

Dado que la deficiencia de AVP indujo la recuperación de prácticamente todas las variables fisiológicas del hígado en los animales con APC+LNI, los presentes resultados sugieren fuertemente que en condiciones normales la AVP participa de manera importante en la regulación de todas las vías del metabolismo hepático y de la respuesta inflamatoria. Esta consideración, da lugar al planteamiento de la siguiente pregunta; ¿Por qué la deficiencia de AVP restablece las funciones hepáticas de los animales con APC? Una posible respuesta a esta pregunta puede ser que la AVP funcione como una hormona reguladora del metabolismo celular, en donde la deficiencia de AVP estaría activando vías de señalización que desencadenan la replicación de nuevos hepatocitos, mientras que activan las vías de señalización que inducen la expresión de factores anti fibróticos, como la IL-10 (Muñoz Ortega et al., 2021), la MMP-13 y el TIMP-2, así como la inhibición de factores proinflamatorios como el TGF- β y la IL-1 (Muñoz-Ortega et Al., 2021. Esta suposición es apoyada por nuestros hallazgos previos, en los que la deficiencia de AVP en los hámsteres cirróticos, incrementaron la expresión de la MMP-13, disminución del TIMP-2 y de las áreas de fibrosis (Quintanar et al, 2017).

IX. CONCLUSIONES

Con los resultados de esta tesis podemos concluir lo siguiente:

- 1) La AVP juega un importante papel en la fisiopatología de la enfermedad hepática crónica y los mecanismos que median estos efectos son puestos en evidencia a través de investigar los efectos de la deficiencia de AVP por la lobectomía neurointermedia hipofisiaria.
- 2) La deficiencia de AVP activa diferentes vías de señalización celular que favorecen la regeneración del hígado e inhibe el proceso inflamatorio a pesar de daño hepático persistente.
- 3) Los efectos del conivaptán, el antagonista de los receptores V1a-V2 de AVP, son mediados por los mismos mecanismos celulares y moleculares que median los efectos de la deficiencia de AVP, sin embargo, queda pendiente de investigar si las variables de las funciones hepáticas que no fueron afectadas por el conivaptán (la hiperamonemia y la hipoglucemia), se debieron a la dosis farmacológica utilizada o a la participan de otros mecanismos celulares que interfieren con los efectos del conivaptán. Se requieren más experimentos encaminados a investigar estas posibilidades.
- 4) Al parecer, la importancia del papel de la AVP en la fisiopatología del daño hepático, está relacionada con que la mayoría de las células que conforman al hígado, incluyendo las células del sistema inmune, los fibroblastos y otras células profibrogénicas son activadas AVP, la cual favorece el desarrollo del daño hepático activo.
- 5) Basado en los presentes resultados los hallazgos de los efectos del conivaptán, sugieren que los bloqueadores de los receptores de AVP, pueden ser utilizados como terapia alternativa para pacientes con insuficiencia hepática y fibrosis. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar esta hipótesis.

XI. GLOSARIO

1. ACTH: La hormona adrenocorticotropa, corticotropina o corticotrofina es una hormona polipeptídica, producida por la hipófisis y que estimula a las glándulas suprarrenales
2. Amonio: Producto tóxico derivado del metabolismo proteico, con un metabolismo complejo que involucra diferentes órganos, en especial el hígado en donde se lleva a cabo el ciclo de la urea, que es fundamental para su eliminación.
3. Angiotencina II: Es la forma activa de la angiotensina, que es un péptido inductor de la constricción de los vasos sanguíneos y la hipertensión resultante, o presión arterial alta.
4. Celulas de kupffer: Son macrófagos localizados en el hígado formando las paredes de los sinusoides que hacen parte del sistema reticuloendotelial.
5. Citocromo P450: Superfamilia de hemoproteínas, forman parte de cadenas de transferencia de electrones con multicomponentes, denominadas sistemas contenedores de P450 se localiza en los mamíferos en el retículo endoplásmico de los hepatocitos, y en los enterocitos que tapizan la luz de la pared intestinal.
6. Colágena tipo 1: Biopolímero compatible que hidrata y funciona como pegamento celular.
7. Colágena tipo 3: Es un colágeno fibrilar y consiste en una sola cadena de colágeno, a diferencia de la mayoría de los demás colágenos.
8. Corteza Adrenal: Situada rodeando la circunferencia de la glándula suprarrenal. Su función es la de regular varios componentes del metabolismo con la producción de mineralcorticoides y glucocorticoides
9. Diacil glicerol: Es una molécula del espacio intracelular que actúa como mediador de comunicación celular.
10. Encefalopatía hepática: Es la disfunción cerebral ocasionada por la incapacidad del hígado para eliminar toxinas (compuestos amoniacados) del torrente sanguíneo.
11. Espacio de disse: Es una ubicación en el hígado entre un hepatocito y un sinusoides.

12. Glucogénesis: Es la ruta anabólica por la que tiene lugar la síntesis de glucógeno a partir de un precursor más simple, la glucosa-6-fosfato. Se lleva a cabo principalmente en el hígado, y en menor medida en el músculo.
13. Glucólisis: Ruta metabólica que sirve de paso inicial para el catabolismo de carbohidratos en los seres vivos.
14. Glucosa: Es un carbohidrato o glúcido capaz de ser absorbido de los alimentos y transformar en energía durante el proceso del metabolismo.
15. Hígado: Es el órgano más grande dentro del cuerpo. Ayuda a digerir los alimentos, almacenar energía y eliminar las toxinas
16. Hipotálamo: Región del cerebro que forma parte del diencefalo y se encuentra situada debajo del tálamo. Produce diferentes hormonas, entre ellas antidiurética y oxitocina.
17. Interleucina 6 (IL-6): Es una citocina proinflamatoria secretada por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos.
18. Arginina vasopresina (AVP): Es una hormona sintetizada en el hipotálamo, la cual es liberada principalmente en respuesta a cambios en la osmolaridad sérica o en el volumen sanguíneo.
19. Matriz extracelular (MEC): La matriz extracelular está compuesta de proteoglicanos, agua, minerales y proteínas fibrosas. Su principal función es la de proveer de soporte a organelos y vasos sanguíneos.
20. Neurohipófisis: Parte del sistema neuroendócrino. Los axones terminales, procedentes de las neuronas del hipotálamo, secretan dos hormonas principales en el plexo.
21. Óxido nítrico: Es un gas incoloro y soluble en agua, presente en pequeñas cantidades en los mamíferos, cuya principal función controlar la presión sanguínea con la vasodilatación de los vasos.
22. Páncreas: Es un pequeño órgano, situado en la cavidad abdominal, inmediatamente por detrás del estómago. Su función es secretar al torrente sanguíneo varias hormonas importantes (insulina, glucagón, polipéptido pancreático y somatostatina).
23. TGF-beta: Es una citocina multifuncional que afecta el desarrollo, diferenciación, crecimiento y apoptosis en la mayoría de los tipos celulares.

24. TNF Alfa: Es una proteína de señalización celular (citoquina) involucrada en la inflamación sistémica y es una de las citoquinas que conforman la reacción de fase aguda.
25. Urea: Es el producto final que aparece cuando las proteínas se metabolizan. Se forma en el hígado como producto de deshecho y se vierte al torrente sanguíneo y es un indicador del funcionamiento de los riñones y el hígado.
26. Lobectomía Neurointermedia Hipofisiaria (LNI): Microcirugía que consiste en la extirpación de la neurohipofisis.
27. Glucógeno: Polisacárido de reserva energética formado por cadenas ramificadas de glucosa, es almacenado prioritariamente en hígado, y también lo está en músculo esquelético.
28. Albúmina: Principal proteína sanguínea producida por el hígado. Su principal función es el transporte de sustancias (ej. Hormonas) en el torrente sanguíneo.
29. Anastomosis porto-cava (APC): Microcirugía que consiste de la unión de la vena porta a la vena cava infrahepática.
30. Tetracloruro de carbono (CCl₄): Compuesto químico sintético altamente hepatotóxico.
31. Sinusoides hepáticos: Son capilares que se encuentran entre las láminas o cordones de hepatocitos y donde confluyen las ramas de la arteria hepática y la vena porta.
32. Conducto biliar: Tubo muy fino donde circulan enzimas que ayudan en la digestión de grasas en la alimentación.
33. Células estelares hepáticas (CEH): Células hepáticas contenidas en el espacio de Disse, cuya principal función es el almacenamiento de retinoides, la homeostasis de la MEC y el control de la presión sanguínea.
34. Especies reactivas de oxígeno (ROS): Moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada.
35. Aspartato aminotransferasa (AST/TGO): Enzima localizada en el citoplasma de las células hepáticas, cardíacas y musculares.
36. Alanina aminotransferasa (ALT/TGP): Enzima localizada en el citoplasma de las células hepáticas.

-
37. Fosfatasa alcalina (FA): Enzima de tipo hidrolasa localizada en la membrana celular de muchos tejidos corporales, principalmente hígado (vias biliares) y huesos.
38. Dimetil sulfoxido (DMSO): Disolvente orgánico de sustancias químicas, crioprotector en cultivos celulares, en biología molecular ayuda a disminuir las reacciones disruptivas.



X. BIBLIOGRAFÍA

1. Adeyomoye, O. I., Akintayo, C. O., Omotuyi, K. P., & Adewumi, A. N. (2022). The Biological Roles of Urea: A Review of Preclinical Studies. *Indian journal of nephrology*, 32(6), 539–545.
2. Ali, F., Raufi, M. A., Washington, B., & Ghali, J. K. (2007). Conivaptan: a dual vasopressin receptor v1a/v2 antagonist [corrected]. *Cardiovascular drug reviews*, 25(3), 261–279.
3. Alison, R. M., & Lin, W.-R. (2018). Macrophages come on tap for liver fibrosis therapy. *Hepatology* , 1-10.
4. Aller, M. A., García-Fernández, M. I., Sánchez-Patán, F., Santín, L., Rioja, J., Anchuelo, R., Arias, J., & Arias, J. L. (2008). Plasma redox status is impaired in the portacaval shunted rat--the risk of the reduced antioxidant ability. *Comparative hepatology*, 7, 1.
5. Aller, M., Martinez, V., Corcuera, M., Benito, J., & Traver, E. (2012). Liver impairment after portacaval shunt in the rat: The loss of protective role of mast cells? *Elsevier* , 301-310.
6. Asfar, P., Radermacher, P., Calès, P., & Oberti, F. (2010). The effects of vasopressin and its analogues on the liver and its disorders in the critically ill. *Current opinion in critical care*, 16(2), 148–152.
7. Banini, B., & Sanyal, A. (2017). Current and future pharmacologic treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* , 134-141.
8. Bandyopadhyay, S. K., Moulick, A., Saha, M., Dutta, A., Bandyopadhyay, R., & Basu, A. K. (2009). A study on endocrine dysfunction in adult males with liver cirrhosis. *Journal of the Indian Medical Association*, 107(12), 866–869.

9. Bankir, L., Bichet, D. G., & Morgenthaler, N. G. (2017). Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation. *Journal of internal medicine*, 282(4), 284–297. <https://doi.org/10.1111/joim.12645>
10. Ben-Moshe, S., & Itzkovitz, S. (2019). Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 16(7), 395–410.
11. Berasain C, Avila MA. Regulation of hepatocyte identity and quiescence. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Oct;72(20):3831-51.
12. Boege, Y., Malehmir, M., Weber, A., Healy, M., Lorentzen, A., Vucur, M., et al. (2017). A dual role of caspase-8 in triggering and sensing proliferation-associated DNA damage, a key determinant of liver cancer development. *Elsevier* , 342-359.
13. Bouami, S., Gwiasda, J., Beneke, J., Kaltenborn, A., Liersch, S., Suero, E., et al. (2018). Prognostic factors for long-term survival after adult liver transplantation. *Elsevier* , 1670-1675.
14. Bray, S. (2016). Notch signalling in context. *Molecular Cell Biology* , 722-735.
15. Celikbilek, A., Celikbilek, M., & Bozkurt, G. (2018). Cognitive assessment of patients with nonalcoholic fatty liver disease. . *Eur J Gastroenterol Hepatol.* , -.
16. Chen, Y., Zheng, D., Zheng, S., Guo, S., Zhang, S., & Weng, Z. (2012). Inhibition of Notch signaling by a gamma-secretase inhibitor attenuates hepatic fibrosis in rats. *PloS One* , 1-11.
17. Chmielewska, N., & Liskiewicz, K. (2017). The behavioral and molecular evaluation of effects of social instability stress as a model of stress-related disorders in adult female rats. *The international journal on the biology of stress* , 549-561.
18. Dank, M., & Padányi, P. (2018). Systemic treatment options of primary hepatocellular carcinoma. *Magy Onkol* , 53-61.
19. Dantzer R. (2018). Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa. *Physiological reviews*, 98(1), 477–504.
20. Detian, Y., Shan, H., Emanuel, B., Lei, L., Nina, G., Florian, H., et al. (2017). Kupffer Cell-Derived Tnf Triggers Cholangiocellular Tumorigenesis through JNK due to Chronic Mitochondrial Dysfunction and ROS. *Elsevier* , 771-789.

21. Dhanda, S. (2018). Systemic inflammation without gliosis mediates cognitive deficits through impaired BDNF expression in bile duct ligation model of hepatic encephalopathy. *Elservier* , 214-232.
22. Diemer, N., Klee, J., & Schroder, H. (1977). Glial and nerve cell changes in rats with porto-caval anastomosis. *Neuropathology* , 59-68.
23. Dou, L., Shi, X., He, X., & Gao, Y. (2020). Macrophage Phenotype and Function in Liver Disorder. *Frontiers in immunology*, 10, 3112.
24. El-serag, H., & Kanwal, F. (2014). Epidemiology of hepatocellular carcinoma en the united states: where are we? where do we go? *Hepatology* , 1767-1775.
25. Ezhilarasan D. (2022). Hepatic stellate cells in the injured liver: Perspectives beyond hepatic fibrosis. *Journal of cellular physiology*, 237(1), 436–449.
26. Ezhilarasan, D., & Najimi, M. (2023). Intercellular communication among liver cells in the perisinusoidal space of the injured liver: Pathophysiology and therapeutic directions. *Journal of cellular physiology*, 238(1), 70–81.
27. Facciorusso, A., Amoruso, A., Neve, V., Del Prete, V., & Barone, M. (2014). Role of vaptans in the management of hydroelectrolytic imbalance in liver cirrhosis. *Hepatology* , 793-799.
28. Fred, F., & Poordad, M. (2015). Presentation and complications associated with cirrhosis of the liver. *Current Medical Research & Opinion* , 50-64.
29. Freng, R., Yuan, X., Shao, C., Ding, H., Liebe, R., & Weng, H. (2018). Are we any closer to treating liver fibrosis (and if no, why not)? *J Dig Dis* , 1751.
30. Fukuda, T., Fukuchi, T., Yagi, S., & Shiojiri, N. (2016). Immunohistochemical analyses of cell cycle progression and gene expression of biliary epithelial cells during liver regeneration after partial hepatectomy of the mouse. *EXPERIMENTAL ANIMALS* , 135-146.
31. Furneaux, R. W. (2011). Liver haemodynamics as they relate to portosystemic shunts in the dog: A review. *ELSEVIER* , 175-180.
32. Gajalakshmi, P., Majumder, S., Viebahn, C., Swaminathan, G., & Chatterjee, S. (2017). Interleukin-6 secreted by bipotential murine oval liver stem cells induces

- apoptosis of activated hepatic stellate cells by activating NF- κ B-inducible nitric oxide synthase signaling. *Biochem Cell Biol* , 263-272.
33. Garcia, G., & Baladron, V. (2016). The complex role of NOTCH receptors and their ligands in the development of hepatoblastoma, cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Biology of the Cell* , 29-40.
 34. Gebhardt R, Matz-Soja M. Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. *World J Gastroenterol*. 2014 Jul 14;20(26):8491-504.
 35. Gibelli NEM, Tannuri U, Mello ES de. Immunohistochemical studies of stellate cells in experimental cholestasis in newborn and adult rats. *Clinics*. 2008;63(5):689-94.
 36. Gissen P, Arias IM. Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *J Hepatol*. 2015 Oct;63(4):1023-37.
 37. Gliedman, M., Sellers, R., Burkle, J., & Enquist, I. (1962). Cirrhosis with ascites. *Annals of Surgery* , 147-152.
 38. Goldsmith SR (2006) ¿Existe una justificación cardiovascular para el uso de antagonistas de los receptores de vasopresina V1a/V2 combinados? *Am J Med* 119 : S93 - S96 .
 39. Goldsmith SR , Elkayam U (2006) Un estudio piloto de rango de dosis de conivaptán en insuficiencia cardíaca aguda descompensada . *Circulación* 114 :abs 2732.
 40. González, I., Santulli, P., Chouzenoux, S., Carmona, F., Chapron, C., & Batteux, F. (2017). Dysregulation of the ADAM17/Notch signalling pathways in endometriosis: from oxidative stress to fibrosis. *Molecular Human Reproduction* , 488-499.
 41. Gracia-Sancho, J., Marrone, G., & Fernández-Iglesias, A. (2019). Hepatic microcirculation and mechanisms of portal hypertension. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 16(4), 221–234.
 42. Grigorescu, M. (2006). Noninvasive Biochemical Markers of Liver Fibrosis. *Gastrointestin liver Dis* , 149-159.
 43. Guillot, A., & Tacke, F. (2019). Liver Macrophages: Old Dogmas and New Insights. *Hepatology communications*, 3(6), 730–743.
 44. Gyorgy, B. (Noviembre de 2017). Origins of portal hypertension in nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive diseases and sciences* , 1-16.

45. Heymann, F., Peusquens, J., Kohlhepp, M., Ergen, C., Niemietz, P., & Martin, C. (2015). Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by kupffer cells. *Hepatology* , 3-37.
46. Heymann, F., Peusquens, J., Ludwig-Portugall, I., & Kohlhepp, M. (2015). Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology* , 279-291.
47. Higashi, T., Friedman, S. L., & Hoshida, Y. (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Advanced drug delivery reviews*, 121, 27–42.
48. Iwakiri, Y. (2014). Pathophysiology of portal hypertension. Elsevier , 281-291.
49. Iwakiri, Y., & Trebicka, J. (2021). Portal hypertension in cirrhosis: Pathophysiological mechanisms and therapy. *JHEP reports : innovation in hepatology*, 3(4), 100316. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100316>
50. Jankord, R., Zhang, R., Flak, J. N., Solomon, M. B., Albertz, J., & Herman, J. P. (2010). Stress activation of IL-6 neurons in the hypothalamus. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 299(1), R343–R351.
51. Jean-Philippe, P., Kluwe, J., De Minicis, S., Jing-Jing, J., Geum-Youn, G., Myoung-Kuk, J., et al. (2013). Hepatic Macrophages But Not Dendritic Cells Contribute to Liver Fibrosis by Promoting the Survival of Activated Hepatic Stellate Cells in Mice. *Hepatology* , 1461-1473.
52. Ji, H., Zhang, Y., Gao, F., Huang, C., Abad, C., Busuttill, R., et al. (2013). Neuropeptide PACAP in Mouse Liver Ischemia and Reperfusion Injury: Immunomodulation via cAMP-PKA Pathway . *Hepatology* , 1225-1237.
53. Ji, H., Zhang, Y., Shen, X., Gao, F., Huang, C., & Abad, C. (2013). Neuropeptide PACAP in Mouse Liver Ischemia and Reperfusion Injury: Immunomodulation via cAMP-PKA Pathway. *Hepatology* , 1225-1237.
54. Jiyuan, C., Yunfeng, X., Xia, L., Xin-Hua, F., & Yanlin, W. (2014). Smad3 Signaling Activates Bone Marrow-Derived Fibroblasts in Renal Fibrosis. *HHS Public Access* , 545-556.

55. Jophlin, L. L., Koutalos, Y., Chen, C., Shah, V., & Rockey, D. C. (2018). Hepatic stellate cells retain retinoid-laden lipid droplets after cellular transdifferentiation into activated myofibroblasts. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 315(5), G713–G721.
56. Ju, C., & Tacke, F. (2016). Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Cellular and Molecular Immunology*, 316-327.
57. Jungermann K. Metabolic zonation of liver parenchyma. *Semin Liver Dis.* 1988 Nov;8(4):329-41.
58. Kalsi, S., Dargan, P., & Waring, S. (2011). A review of the evidence concerning hepatic glutathione depletion and susceptibility to hepatotoxicity after paracetamol overdose. *Dovepress*, 87-96.
59. Kamm, D. R., & McCommis, K. S. (2022). Hepatic stellate cells in physiology and pathology. *The Journal of physiology*, 600(8), 1825–1837.
60. Karsdal, M., Jensen, T., Genovese, F., Kristensen, J., Nielsen, M., Sand, J., et al. (2015). Novel insights into the function and dynamics of extracellular matrix in liver fibrosis. *Physiol Gastrointest Liver*, G807-G830.
61. Kietzmann T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biol.* 2017 Apr;11:622-630.
62. Kim Young, M. (2017). The progression of liver fibrosis in Non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 341-347.
63. Kimball, S. R., & Jefferson, L. S. (1990). Mechanism of the inhibition of protein synthesis by vasopressin in rat liver. *The Journal of biological chemistry*, 265(28), 16794–16798.
64. Klarik, Z., Toth, E., Kiss, F., Miko, I., Furka, I., & Nemeth, N. (2013). A modified microsurgical model for end-to-side selective portacaval shunt in the rat. Intraoperative microcirculatory investigations. *Acta Cirurgica Brasileira*, 625-531.
65. Klein J. R. (2021). Dynamic Interactions Between the Immune System and the Neuroendocrine System in Health and Disease. *Frontiers in endocrinology*, 12, 655982.

66. Kocabayoglu, P., Lade, A., Lee, Y., Dragomir, A., Sun, X., Fiel, m., et al. (2015). B-PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis inmurine liver injury, but not carcinogenesis. *Journal of Hepatology. ELSEVIER* , 141-147.
67. Kosenko, E., Tikhonova, L., Alilova, G., Montoliu, C., & Barreto, G. (2017). Portacaval shunting causes differential mitochondrial superoxide production in brain regions. *elsevier* , 109-118.
68. Kyu, M., & Cavanagh, B. (1970). SOME EFFECTS OF PORTO-CAVAL ANASTOMOSIS IN THE MALE RAT. *Br. J. exp. Path.* , 217-227.
69. Lalama, M., M.P.H, & Saloum, Y. (2016). Nutrition, fluid, and electrolytes un chronic liver Disease. *An Official Learning Resource of AASLD* , 18-22.
70. Laycock J. Perspectives on vasopressin. 2010. Imperial College Press. Chapter 1 “Introduccion to Vasopressin”. 10 pp.
71. Lee, S. H., & Fisher, B. (1961). Portacaval shunt in the rat. *Surgery*, 50, 668–672.
72. Lemberg, A., & Alejandra., F. (2009). Hepatic encephalopathy, ammonia, glutamate, glutamine and stress oxidative. *Annals of Hepatology* , 95-102.
73. Li, P., He, K., Li, J., Liu, Z., & Gong, J. (2017). The role of Kupffer cells in hepatic diseases. *Molecular immunology*, 85, 222–229.
74. Lim, K., Kim, J., Hwang, S., Zhang, L., Han, H., Bae, D., et al. (2018). Direct Conversion of Mouse Fibroblasts into Cholangiocyte Progenitor Cells. *Stem Cell Reports* , 108-115.
75. Li-Ng, M., & G. Verbalis, J. (2009). Conivaptan: Evidence supporting its therapeutic use in hyponatremia. *Dovepress* , 82-92.
76. Llovet, J., Zucman-Rossi, J., Pikarsky, E., Sangro, B., Schwartz, M., Sherman, M., et al. (2016). Hepatocellular Carcinoma. *Nature Reviews* , 1-18.
77. Lo, R., Andrew, A., & Jan, F. (2008). Vasopressin in Liver Disease – Should We Turn On or Off? . *Current Clinical Pharmacology* , 156-165.
78. Luedde, T., Kaplowitz, N., & Schwabe, R. (2014). Cell death and cell death responses in liver disease: Mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology* , 765-783.
79. M, I., Lacoviello, M., G., D. P., B, L., E, L., E, G., et al. (2018). Vasopressin In Heart Failure. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* .

80. Maiers, J., Kostallari, E., Mushref, M., Assuncao, T., Haiyang, L., Jalan-Sakrikar, N., et al. (2017). The Unfolded Protein Response Mediates Fibrogenesis and Collagen I Secretion Through Regulating TANGO1 in Mice . *Hepatology* , 983-998.
81. Mak KM, Png CYM. The Hepatic Central Vein: Structure, Fibrosis, and Role in Liver Biology. *Anat Rec (Hoboken)*. 2020 Jul;303(7):1747-1767.
82. Matsuda, M., & Seki, E. (2020). Hepatic Stellate Cell-Macrophage Crosstalk in Liver Fibrosis and Carcinogenesis. *Seminars in liver disease*, 40(3), 307–320.
83. Mavari, G., Devita, M., & Michelis, M. (2015). A Review of the Nonpressor and Nonantidiuretic Actions of the Hormone Vasopressin. *Frontiers in medicine* , 2-19.
84. Michalopoulos, G. (2010). Liver Regeneration after Partial Hepatectomy Critical Analysis of Mechanistic Dilemmas. *The American Journal of Pathology.* , 2-13.
85. Ming-Ming, N., Tao, X., Ya-Rui, W., Ying-Hua, H., Zhou, Q., Huang, C., et al. (2018). Inhibition of IRF3 expression reduces TGF- β 1-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 72, 2-23.
86. Montagner, A., Polizzi, A., Fouche, E., Ducheix, S. L., Lasserre, f., Barquissau, V., et al. (2015). Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Hepatology* , 1202-1214.
87. Moran, S., López-Sánchez, M., Milke-García, M. D. P., & Rodríguez-Leal, G. (2021). Current approach to treatment of minimal hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *World journal of gastroenterology*, 27(22), 3050–3063.
88. Muñoz-Ortega, M., Macías-Segura, N., Ventura-Juárez, J., Ávila-Blanco, M. E., Ponce-Damian, L. D., González-Blas, D., Sánchez-Alemán, E., & Quintanar-Stephano, A. (2021). Recovery from Liver Failure and Fibrosis in a Rat Portacaval Anastomosis Model after Neurointermediate Pituitary Lobectomy. *Journal of immunology research*.
89. Müsch A. (2014). The unique polarity phenotype of hepatocytes. *Experimental cell research*, 328(2), 276–283.
90. Nagamani, S. C. S., Ali, S., Izem, R., Schady, D., Masand, P., Shneider, B. L., Leung, D. H., & Burrage, L. C. (2021). Biomarkers for liver disease in urea cycle disorders. *Molecular genetics and metabolism*, 133(2), 148–156.

91. Nallagangula, K., Kurpad, S., Venkataswamy, L., & Chandrappa, M. (2018). Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression. *Future Science* , 2056-2079.
92. Naseem, S., Hussain, T., & Manzoor, S. (2018). Interleukin-6: A promising cytokine to support liver regeneration and adaptive immunity in liver pathologies. *ELSEVIER* , 36-45.
93. Nicou, A., Serriere, V., Prigent, S., Boucherie, S., Combettes, L., Guillon, G., et al. (2003). Hypothalamic vasopressin release and hepatocyte Ca²⁺ signaling during liver regeneration: an interplay stimulating liver growth and bile flow. *The Faseb* , 1-24.
94. Nojgaard, C., Johansen, J., Christensen, E., Skovgaard, L., Price, P., & Becker, U. (2003). Serum levels of YKL-40 and PIIINP as pronostic markers in patients with alcoholic liver disease. *Elsevier* , 179-186.
95. Ødegård, J., Sondresen, J., Aasrum, M., Tveteraas, I., Guren, T., Christoffersen, T., et al. (2017). Differential effects of epidermal growth factor (EGF) receptor ligands on receptor binding, downstream signalling pathways and DNA synthesis in hepatocytes. *Taylor&Francis* , 1029-1041.
96. Oria, M., Ragner, N., Chatauret, N., Bartoli, R., & Odena, G. (2006). Functional abnormalities of the motor tract in the rat after portocaval anastomosis and after carbon tetrachloride induction of cirrhosis. *Metabolic Brain Disease* , 297-308.
97. Palin, K., Moreau, M., Sauvant, J., Orcel, H., Nadjar, A., Guillou, A., et al. (2009). Interleukin-6 activates arginine vasopressin neurons in the supraoptic nucleus during immune challenge in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* , 289-299.
98. Perla, F., Prelati, M., Lavorato, M., Visicchio, D., & Anania, C. (2017). The Role of Lipid and Lipoprotein Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children* , 1-14.
99. Peterson, K., Cottam, M., Kennedy, A., & Hasty, A. (2018). Macrophage-Targeted Therapeutics for Metabolic Disease. *Pharmacology* , 1016.
100. Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., et al. (2017). Liver sinusoidal endothelial cell: Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 66, 212-227.

101. Poon, K., Chen, C., Thorat, A., & Jeng, L. (2015). Fibrinolysis after reperfusion of liver graft. *EL SEVIER* , 41-43.
102. Procaccini, C., Pucino, V., De Rosa, V., & Marone, G. (2014). Neuro-Endocrine Networks Controlling Immune System in Health and Disease. *Frontiers in immunology* , 143-148.
103. Qiu, J., Thapaliya, S., Runkana, A., & Yang, Y. (2013). Hyperammonemia in cirrhosis induces transcriptional regulation of myostatin by an NF- κ B-mediated mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 18162-18167.
104. Quatrini, L., Ricci, B., Ciancaglini, C., Tumino, N., & Moretta, L. (2021). Regulation of the Immune System Development by Glucocorticoids and Sex Hormones. *Frontiers in immunology*, 12, 672-853.
105. Quintanar-Stephano, A., Kovacs, K., & Berczi, I. (2004). Effects of neurointermediate pituitary lobectomy on humoral and cell-mediated immune responses in the rat. *Neuroimmunomodulation*, 11(4), 233–240.
106. Quintanar, A., Ventura, J., & Sánchez, E. (2017). Liver cirrhosis reversion is improved in hamsters with a neurointermediate pituitary lobectomy. *El Sevier* , 496-503.
107. Ramachandran, P., Pellicoro, A., Vernon, M., & Boulter, L. (2012). Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* , 3186-3195.
108. Ramos-Vara JA, Miller MA. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. *The journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society.* 2014 Jan;62(1):3-16.
109. Reddy, M., & Rela, M. (2017). Portosystemic collaterals in living donor liver transplantation: What is all the fuss about? *Liver transplante* , 537-544.
110. Ringelhan, M., Pfister, D., O'connor, T., Pikarsky, E., & Heikenwalder, M. (2018). The immunology of Hepatocellular carcinoma. *Nature Immunology* , 359-386.
111. Ritz, T., Krenkel, O., & Tacke, F. (2017). Dynamic plasticity of macrophage functions in diseased liver. *ELSERVIER* , 1-8.

112. Robonson, M., Harmon, C., & O'Farrelly, C. (2016). Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Nature* , 267-276.
113. Rondon-Berrios, H., & Berl, T. (2017). vasopressin Receptor Antagonists in Hyponatremia: Uses and Misuses. *Frontiers in Medicine* , 134-141.
114. S. H. LEE, M. B. (1961). Portacaval shunt in the rat. *University of Pittsburgh* , 668-672.
115. Sandgren, J., Linggonegoro, D., & Zhang, S. (2018). Angotensin AT1a Receptors Expressed in Vasopressin-Producing Cells of the Supraotic Nucleus Contribute to the Osmotic Control Of vasopressin. *Physiology-Regulatory.* , 435-448.
116. Santos, A., Delgado, T. C., Marques, V., Moncayo, C. R., Alonso, C., Vidal-Puig, A., Hall, Z., Martínez-Chantar, M. L., & Rodrigues, C. M. P. (2023). Spatial metabolomics and its application in the liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*.
117. Scroggins, S., Santillan, D., Lund, J., Sandgren, J., & Krotz, L. (2018). Elevated vasopressin in pregnant mice induces T-helper subset alterations consistente with human preeclampsia. *Clinical Science* , 419-436.
118. Shawcross, D. (2015). Is it time to target gut dysbiosis and immune dysfunction in the therapy of hepatic encephalopathy? *Gastroenterology & Hepatology* , 539-542.
119. Skuratovskaia, D., Vulf, M., Khaziakhmatova, O., Malashchenko, V., Komar, A., Shunkin, E., Shupletsova, V., Goncharov, A., Urazova, O., & Litvinova, L. (2020). Tissue-Specific Role of Macrophages in Noninfectious Inflammatory Disorders. *Biomedicines*, 8(10), 400.
120. Sligte, T., Bourass, I., & Sels, J. (2004). Non-alcoholic steatohepatitis: rewiw of a growing medical problem. *Elservier* , 10-21.
121. Soto-Gutierrez A, Gough A, Verneti LA, Taylor DL, Monga SP. Pre-clinical and clinical investigations of metabolic zonation in liver diseases: The potential of microphysiology systems. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017 Oct;242(16):1605-1616.
122. Srinivas, m., & Rela, M. (2017). Portosystemic collaterals in living donor liver transplantation: What is all the fuss about? *Liver Transplantation* , 23-34.
123. Strasser R , Van Den Hoven WE , Harmsen AR , Verschoor HSC , Terpstra IJ (2000) Bloqueo in vivo de los receptores V1 en humanos por conivaptán (YM087);

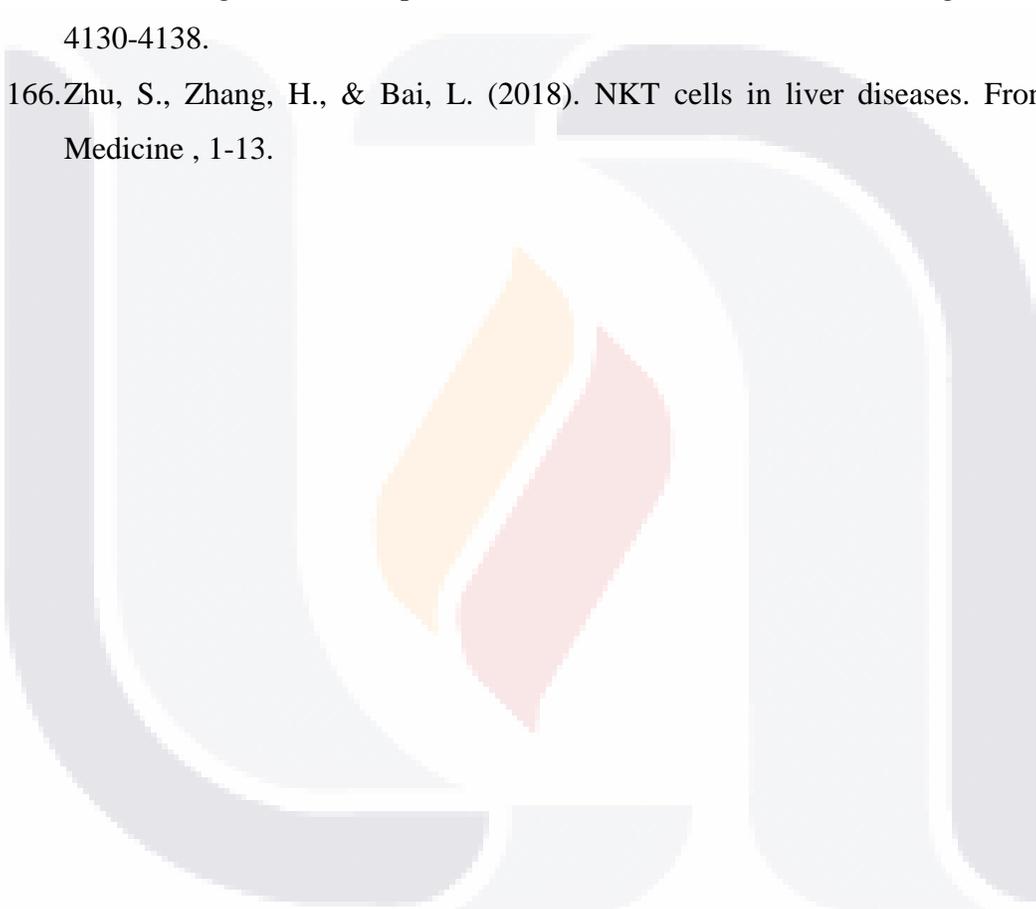
- Inhibición dependiente de la dosis de la agregación plaquetaria inducida por vasopresina . Eur Heart J 21 :594 abs.
124. Sulemanjee, N. Z., & Schwarz, E. R. (2006). Conivaptan: a selective vasopressin antagonist. *Drugs of today* (Barcelona, Spain : 1998), 42(6), 379–386. <https://doi.org/10.1358/dot.2006.42.6.985639>
125. Surewaard, B., & Kubes, P. (2017). Measurement of bacterial capture and phagosome maturation of Kupffer cells by intravital microscopy. *Methods* (San Diego, Calif.), 128, 12–19.
126. Tacke F. (2017). Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *Journal of hepatology*, 66(6), 1300–1312.
127. Tacke, F. (2017). Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *ELSERVIER* , 1300-1312.
128. Takahashi Y. (2017). The Role of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I in the Liver. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1447.
129. Tahara A , Tomura Y , Wada KI , Kusayama T , Tsukada J , Takanashi M , Yatsu T , Uchida W , Tanaka A (1997) Perfil farmacológico de YM087, un nuevo y potente antagonista no peptídico de los receptores de vasopresina V1 y V2, in vitro e in vivo . *J Pharmacol Exp Ther* 282 : 301 - 308 .
130. Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* , 1-17.
131. Tanoue A. (2009). New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: effects of vasopressin receptor on regulations of hormone secretion and metabolisms of glucose, fat, and protein. *Journal of pharmacological sciences*, 109(1), 50–52.
132. Taylor CR, Shi S-R, Chaiwun B, Young L, Imam SA. *Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. Principles and Practice*. Oxford University Press, New York, NY. 2013.
133. Thomsen, K. L., Francesco, C., Rombouts, K. H., Vilstrup, Fausto, A., Rajeshwar, M., et al. (2018). Ammonia: A novel target for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Elsevier* , 91-97.

134. Thomson, J., Hargrove, L., Kennedy, L., Demieville, J., & Heather, F. (2017). Cellular crosstalk during cholestatic liver injury. *Liver Res* , 26-33.
135. Tian, Z., Chen, Y., Yao, N., chunha, H., & Yuchao, W. (2018). Role of Mitophagy Regulation by ROS in Hepatic Stellate Cells During Acute Liver Failure. *Physiology-Gatroitentinal and Liver Physiology* , 1152-1163.
136. Trautwein, C., Friedman, S., Schuppan, D., & Pinzani, M. (2015). Hepatic Fibrosis: Concept to treatment. *Journal of Hepatology*. EL SEVIER, 62, S15-S24.
137. Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current biology: CB*, 27(21), R1147–R1151.
138. Trivedi, P., Wang, S., & Friedman, S. L. (2021). The Power of Plasticity-Metabolic Regulation of Hepatic Stellate Cells. *Cell metabolism*, 33(2), 242–257.
139. Tsuchida, T., & Friedman, S. L. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 14(7), 397–411.
140. Tsuchida, T., Friedman, & Scott. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Gastroenterology and Hepatology*, 397-411.
141. Valerie, S., Berthon, B., Boucherie, S., Jacquemin, E., Guillon, G., Claret, M., et al. (2001). Vasopressin receptor distribution in the liver controls calcium wave propagation and bile flow. *Faseb Journal* , 22-44.
142. Vázquez-Martínez, O., Valente-Godínez, H., Quintanar-Stephano, A., Gasca-Martínez, D., López-Cervantes, M. L., Palma-Tirado, L., de Jesús Guerrero-Carrillo, M., Pérez-Solís, M., & Díaz-Muñoz, M. (2019). Reduced Liver Lipid Peroxidation in Subcellular Fractions Is Associated with a Hypometabolic State in Rats with Portacaval Anastomosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
143. Vergani, L. (2017). Fatty acids and effects on in vitro and in vivo models of liver steatosis. *Med Chem* , 1334.
144. Verbalis JG , Ghali JK , Gross P , Gustave C , Long WA , Smith N (2005) Conivaptan, un nuevo antagonista de la arginina vasopresina, produjo acuareisis y aumentó la concentración sérica de sodio en pacientes con hiponatremia eurolémica o hipervolémica . *Crit Care Med* 33 : A170 - A170 .

145. Viñuela-Berni, V., Gómez-González, B., & Quintanar-Stephano, A. (2020). Blockade of Arginine Vasopressin receptors prevents blood-brain barrier breakdown in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Scientific reports*, 10(1), 467.
146. Wan, Y., Garner, J., Wu, N., Phillip, L., Han, Y., McDaniel, K., et al. (2016). Role of stem cells during diabetic liver injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. , 195-203.
147. Wang, C., Ma, C., Gong, L., Guo, Y., Fu, K., Zhang, Y., Zhou, H., & Li, Y. (2021). Macrophage Polarization and Its Role in Liver Disease. *Frontiers in immunology*, 12, 803037.
148. Waragai, Y., Suzuki, R., Takagi, T., Sugimoto, M., Asama, H., Watanabe, K., et al. (2016). Clinical significance of serum Wisteria floribunda agglutinin- positive Mac-2 binding protein in pancreatic ductal adenocarcinoma. *ELSEVIER* , 1044-1050.
149. Wegner, S., Pollard, K., Darevsky, D., & Perez, L. (2017). Limited excessive voluntary alcohol drinking leads to liver dysfunction in mice. *Alcohol clinic Exp.* , 345-358.
150. Wenzek, C., Boelen, A., Westendorf, A. M., Engel, D. R., Moeller, L. C., & Führer, D. (2022). The interplay of thyroid hormones and the immune system - where we stand and why we need to know about it. *European journal of endocrinology*, 186(5), R65–R77.
151. Weiner, I. D., & Verlander, J. W. (2013). Renal ammonia metabolism and transport. *Comprehensive Physiology*, 3(1), 201–220. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120010>
152. Windt, V. d., V, S., Zhang, H., Goswami, J., Yazdani, H., Lougran, P., et al. (2018). Neutrophil extracellular traps promote inflammation and development of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* , 299-312.
153. Wirth, K., Kizy, S., & Steer, C. (2018). Liver Regeneration in the Acute Liver Failure Patient. *Elsevier*, 22 (2), 169-287.
154. Xie, G., Karaca, G., Swiderska-Syn, M., Michelotti, G., Kruger, L., Chen, Y., et al. (2013). Cross-Talk Between Norch and Hedgehog regulates Hepatic stellate Cell fate in Mice. *Hepatology* , 1801-1813.

155. Yang, C., & Shi, Q. (2012). Transforming growth factor- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition in hepatic fibrosis. *Hepato-Gastroenterology* , 1960-1963.
156. Yang, X., Bosoi, C., Jiang, W., Tremblay, M., & Rose, C. (2010). Portacaval anastomosis-induced hyperammonemia does not lead to oxidative stress. *Metabolic Brain Disease* , 11-15.
157. Yi, W., Ruo-Wu, S., Bing, H., Zhen, L., Le, X., Feng-Yu, Z., et al. (2017). Notch signaling mediated by TGF- β /Smad pathway in concanavalin A-induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* , 2330-2336.
158. Younossi, Z., Stepanova, M., Rafiq, N., Henry, L., Loomba, R., & Makhlof, H. (2017). Nonalcoholic steatofibrosis independently predicts mortality in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* , 421-428.
159. Zaitoun, A., Apelqvist, G., Al-Mardini, H., Gray, T., Bengtsson, F., & Record, C. (2006). Quantitative Studies of Liver Atrophy After Portacaval Shunt in the Rat. *Quantitative Studies of Liver Atrophy After Portacaval Shunt in the Rat* , 225-232.
160. Zetter, M., Barrios-Payán, J., Mata-Espinosa, D., Marquina-Castillo, B., Quintanar-Stephano, A., & Hernández-Pando, R. (2019). Involvement of Vasopressin in the Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis: A New Therapeutic Target?. *Frontiers in endocrinology*, 10, 351.
161. Zeynalov, E., Jones, S. M., Seo, J. W., Snell, L. D., & Elliott, J. P. (2015). Arginine-Vasopressin Receptor Blocker Conivaptan Reduces Brain Edema and Blood-Brain Barrier Disruption after Experimental Stroke in Mice. *PloS one*, 10(8).
162. Zhang, D., Goossens, N., Guo, J., Tsai, M.-c., Chou, H., Sangiovanni, A., et al. (2015). A hepatic stellate cell gene expression signature associated with outcomes in hepatitis C cirrhosis and hepatocellular carcinoma after curative resection. *Hepatology* , 1754-1764.
163. Zhang, K., Zhang, Y. Q., Ai, W. B., Lin-Yan, W., Xiao-Lian, W., Chang-Bai, L., et al. (2015). Hes1 , an important gene for activation of hepatic stellate cells, is regulated by Notch1 and TGF- β /BMP signaling . *World J Gastroenterol* , 878-887.

164. Zhang, L., Changwei, L., Xiao-ming, M., Cheng, H., Fengyun, X., & Jun, L. (2015). Smad2 protects against TGF- β 1/Smad3-mediated collagen synthesis in human hepatic stellate cells during hepatic fibrosis. *Mol Cell Biochem* , 17-28.
165. Zhang, Q., Xu, M., Cai, X., Qu, Y., & Lu, G. (2015). Myofibroblastic transformation of rat hepatic stellate cells: the role of Notch signaling and epithelial-mesenchymal transition regulation. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* , 4130-4138.
166. Zhu, S., Zhang, H., & Bai, L. (2018). NKT cells in liver diseases. *Frontiers of Medicine* , 1-13.



XI. ANEXOS

ANEXO A

ANASTOMOSIS PORTO-CAVA EN LA RATA

Adaptada de Lee-Fisher (1961)

Material

- Se este protocolo manejamos ratas Macho de la cepa Wistar de entre 300- 350 g de peso corporal.
- Mesa de cirugía con control de temperatura 38°C
- Rasuradora
- Bisturí
- Pinzas de disección con dientes pequeña
- Tijera de mayo
- Tijera pequeña
- Separadores de liga
- Gasas
- Solución salina isotónica a 38°
- Microscopio estereoscópico
- Pinzas de disección de microcirugía rectas
- Pinzas de disección de microcirugía de punta curva
- Tijeras de microcirugía
- Pinza para vena porta, hisopos de algodón pequeños

- Torundas de algodón
- Hilo seda del número 8 ceros Porta agujas para micro agujas
- Porta agujas para agujas de sutura para la pared abdominal y la piel
- Jeringa de 10 ml con aguja curvada a 45°
- Solución antiséptica.

Procedimiento

1. Anestesia: Isoflurane o Éter de metilo
2. Apertura de la pared abdominal
3. Exposición y disección amplia de las venas porta y cava evitando su ruptura
4. Ligadura de la vena espleno-mesentérica

Preparación de la vena cava

5. Supresión del flujo sanguíneo de la vena renal derecha a nivel de su desembocadura con la vena cava inferior por medio de un hilo de tracción.
6. Supresión del flujo sanguíneo de la vena cava inferior por arriba de la vena renal izquierda por medio de un hilo de tracción
7. Supresión del flujo sanguíneo de la vena cava por arriba de la desembocadura de la vena renal derecha por medio de un hilo de tracción.
8. La tracción de estos hilos, bloquea totalmente el flujo sanguíneo a la vena cava, y es sobre el lado izquierdo de esta porción sobre la que se realiza la apertura lateral que debe ser al menos de 5 mm de diámetro.

Preparación del cabo portal y apertura lateral de la vena cava

9. Ligadura de la vena porta a nivel del hilio hepático
10. Supresión del flujo sanguíneo portal con la pinza de Heifetz (no más de 20 minutos)
11. Corte sagital de la vena portal a nivel del hilio hepático y lavado del contenido.
12. Corte lateral de la ven porta y lavado del contenido

Anastomosis

13. Colocación de los puntos ancla: 1) uniendo el borde distal de la vena cava con el borde distal de la vena porta y 2) uniendo el borde superior del cabo proximal de la vena cava con el borde proximal del cabo de la vena porta, 3) sutura con puntos continuos de bordes posteriores de ambos vasos hasta el punto ancla inferior, 4) sutura con puntos continuos de los bordes anteriores de ambos vasos hasta el punto ancla anterior. Aunque el número de puntos es variable, generalmente con 6-8 puntos se logra un sellado adecuado de la anastomosis cuando se utiliza un sutura de 8 ceros con aguja curva cilíndrica.
14. Revisión de la anastomosis y su funcionamiento.
15. Cierre de la pared abdominal en dos planos

Cuidados post operatorios

- 1) Alojamiento en jaulas individual las primeras 24 horas para evitar lesiones
- 2) Para evitar la deshidratación, se inyectan 2.5 ml de solución salina isotónica a 38° C en cada flanco.
- 3) Analgesia.
- 4) Alimentación y agua ad libitum (durante los 3 primeros días después de la cirugía los animales toman agua glucosada al 10%)

ANEXO B

LOBECTOMIA NEUROINTERMEDIA HIPOFISIARIA

-Se este protocolo manejamos ratas Macho de la cepa Wistar de entre 300- 350 g de peso corporal.

-Mesa de cirugía con control de temperatura 38°C

-Rasuradora

-Bisturí

-Pinzas de disección con dientes pequeña

-Tijera de mayo

-Tijera pequeña

-Separadores de liga

-Gasas

-Solución salina isotónica a 38°

-Microscopio estereoscópico

-Tijeras de microcirugía

-Torundas de algodón

-Hilo seda del número 8 ceros

-Porta agujas para agujas de sutura para la pared abdominal y la piel

-Aguja curvada a 45°

-Solución antiséptica

-Abateleguas

- Mandril y cánula (1mm de diámetro)
- Micromotor eléctrico de contraángulo recto para odontología



Procedimiento

1. Anestesia: Isoflurane
2. Rasurar la parte anterior del cuello de la rata y hacer la asepsia
3. Canular la tráquea con ayuda del abatelenguas y el mandril
4. Con ayuda de un estereoscópico hacer una incisión la cara anterior del cuello previamente rasurado
5. Exposición de la tráquea
6. Rechazar la tráquea a un costado
7. Diseccionar y con ayuda de un micromotor eléctrico tomar el abordaje parafaríngeo-transoccipital-esfenoidal hasta la glandula pituitaria
8. Mediante aspiración suave mediante una aguja doblada extraer los lóbulos intermedio y posterior de la glándula pituitaria. El método empleado ha sido descrito previamente (Quintanar-Stephano et al., 2004, 2012). A todos los animales se les inyectó bencilpenicilina (800 000 UI, i.m.) una vez al día durante 4 días y metamizol (10 mg / kg; i.m.) en dosis única.

ANEXO C

Cuantificación de Glucógeno hepático

Buffer de Citrato fosfato

(50 mL)

1.775 g de Fosfato dibásico de sodio

1.3125 g de ácido cítrico en 25 mL de H₂O destilada

(150 mL)

5.325 g de fosfato dibásico de sodio

3.937 g de ácido cítrico en 75 ml de H₂O destilada

Agregar ácido cítrico al fosfato dibásico hasta llegar a un pH de 5.2

1. Pesar 0.250 g de hígado
2. Colocar en un tubo de ensaye de 10 mL de capacidad y agregar 1.5 mL de buffer de Fosfato citrato
3. Homogeneizar con el Polytron
4. Determinar la glucosa total y la glucosa libre.

4.1 Glucosa Total

En tubos eppendorf se agita con vortex la mezcla de la enzima aminoglucosidasa con el buffer de citratos, se añaden 500 µL del homogeneizado de tejido y se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas 3 minutos.

4.2 Glucosa libre

En tubos Eppendorf se vierten 500 µL del hígado homogeneizado con 1000µL de buffer de citratos, se mantiene en agitación constante durante 2 horas 30 minutos.

Para la determinación de glucosa se cuantifica en un equipo de Química húmeda (SPINLAB) usando el protocolo de Spinreact Glucose-TR



ANEXO D**INMUNOHISTOQUIMICA****BUFFER DE CITRATO 10X (100 mL)**

Ácido cítrico monohidratado 0.1 M (1.9g / 90 mL agua destilada)

Citrato de Sodio tribásico dihidratado 0.1 M (12.05g /410 ml agua destilada)

-Disolver por separado y entonces agregar el ácido cítrico al citrato de sodio hasta ajustar pH 6

-Almacenar la solución en botella oscura.

-No usar después de un mes de preparado.

-Ajustar pH con ácido cítrico 1% (0.4g/40mL) o NaOH 10M

BUFFER DE CITRATOS 1X (1000 mL)

100 mL de buffer de citratos 10X

900 mL de agua destilada pH 6

BUFFER DE FOSFATO SALINO (PBS) 10X (1000 mL)

KH_2PO_4 0.02M (2.72 g)

Na_2HPO_4 0.08M (11.3 g)

NaCl 1.5 M (90 g)

Agua destilada (1 lt)

Ajustar el pH 7.2 y almacenar a temperatura ambiente.

PBS + Tritón x-100 al 0.2%

Tritón X-100 100 ml

PBS 1X 50 ml

Preparación de Laminillas

METODO PARA RECUBRIR LAMINILLAS CON (3- AMINOPROPYL)

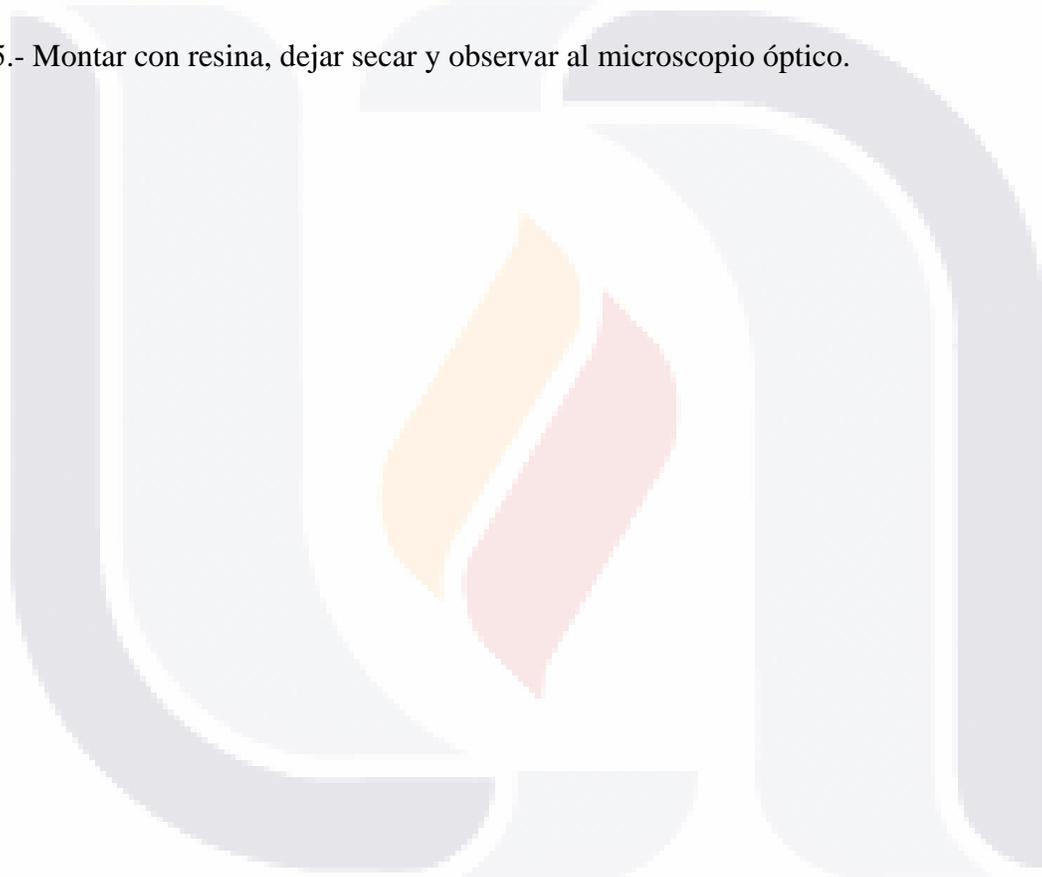
TRIETHOXY SILANE

- 1.- Usar laminillas nuevas en caso de ser necesario, limpiarlas con una gasa impregnada con alcohol 96% (preparar suficientes laminillas para que el proceso sea costeable).
- 2.- Colocar las laminillas limpias en un portalaminillas (preferentemente de metal).
- 3.- Preparar una solución de silano al 2% en acetona. (3 aminopropyl) triethoxysilane (silano, A3648, Sigma).
- 4.- Depositar la solución del silano al 2% en acetona en un recipiente adecuado para que queda el portalaminillas.
- 5.- Sumergir el portalaminillas en la solución de silano al 2% durante 5 minutos a temperatura ambiente, cuidando que todas las laminillas se encuentren completamente sumergidas dentro de la solución.
- 6.- A continuación, el porta laminillas se retira y se procede a lavar las laminillas. Para realizar el lavado, el porta laminillas se coloca dentro de un recipiente que contiene suficiente agua destilada durante un minuto, en seguida se retira el agua destilada y nuevamente se llena el recipiente de agua destilada para lavar nuevamente las laminillas durante un minuto.
- 7.- A continuación, el porta laminillas se retira del agua (quitar el exceso de agua con una sanita y cuidar que las laminillas no queden pegadas) y se coloca en la estufa a 50° C durante 12 horas para que las laminillas se sequen.
- 8.- Finalmente, las laminillas se retiran del porta laminillas y se guardan en sus respectivas cajas, (previamente rotuladas) a temperatura ambiente).

Procesamiento de tejidos

- Desparafinar 1h a 56° C (previamente desparafinados).
 - Xilol 30 minutos (2 veces) 25 minutos c/u.
 - Etanol:
 - Alcohol al 100% (1) – 3 minutos
 - Alcohol al 100% (2) – 3 minutos
 - Alcohol al 96% - 3 minutos
 - Alcohol al 70% - 3 minutos
 - Alcohol al 50% - 3 minutos
 - Alcohol al 30% - 3 minutos
 - Agua destilada – 3 minutos
 - PBS – 3 minutos
- 1.- Desenmarcar / desenmascarar antígenos en olla convencional BIOCARE con buffer de citrato con pH 6 (Diva Decloakevcat) durante 12 minutos hasta que alcance 25 mmHg (ponerlo en agua milliQ).
 - 2.- Dejar enfriar en hielo.
 - 3.- Lavar con PBS 1X 3 veces durante 5 min cada vez.
 - 4.- Incubar con peróxido de hidrógeno durante 10 min al 0.9%
 - 5.- Lavar con PBS 1X 3 veces durante 5 min cada vez.
 - 6.- Incubar con PBS Tritón al 1% durante 25 min.
 - 7.- Incubar con Background Punisher durante 3 min., se blanquea con albúmina al 1% o suero de caballo al 5%
 - 8.- Lavar con PBS 1X durante 5 minutos cada vez.
 - 9.- Incubar con anticuerpo primario durante toda la noche a TA o durante 1 hora a 37° C.
 - 10.- Lavar 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos cada uno.

- 11.- Incubar con anticuerpo secundario (polímero de BIOCARE) durante una hora y media (Mach 2, Rabbit RHRP52OL).
- 12.- Lavar con PBS 1X 3 veces durante 5 minutos cada uno.
- 13.- Revelar con DAB 0B801L de BIOCARE.
- 14.- Contrateñir con Hematoxilina de Gill, virar con agua amoniacal al 2%
- 15.- Montar con resina, dejar secar y observar al microscopio óptico.



ANEXO E

TINCIONES HISTOLOGICAS

Procesamiento de tejidos

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

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

- Alcohol al 50% (35 minutos)
- Alcohol al 70% (35 minutos)
- Alcohol al 80% (35 minutos)
- Alcohol al 90% (35 minutos)
- Alcohol al 95% (35 minutos)
- Etanol 100% (40-45 minutos)
- Etanol 100% (40 minutos)
- Xilol:Etanol 1:1 (45 minutos)
- Xilol 100% (50-60 minutos)
- Xilol 100% (50-60 minutos)
- Parafina (2 horas)
- Parafina (2 horas)

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

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

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

TINCIÓN CON HEMATOXILINA EOSINA

Preparación de la hematoxilina de Harris

5 gr de Hematoxilina

50 mL de Alcohol al 100%

100g de Aluminio de potasio o amonio

2.5g de Oxido rojo de mercurio

1000mL agua destilada.

Se disolvió la hematoxilina en el alcohol al 100%

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

Xilol 5 minutos

Xilol 5 minutos

Alcohol al 100% 2 minutos

Alcohol al 100% 2 minutos

Alcohol al 96% 2 minutos

Alcohol al 96% 2 minutos

Agua destilada 3 minutos

Hematoxilina de Harris 3 minutos

Agua corriente 10 minutos

Eosina 3 minutos

Agua destilada 3 minutos

Alcohol al 96% 2 minutos

Alcohol al 96% 2 minutos

Alcohol al 100% 2 minutos

Alcohol al 100% 2 minutos

Xilol 5 minutos

Xilol 5 minutos

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

TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON

Procedimiento:

-Desparafinar a 56° C toda la noche.

-Enfriar un poco y meter a Xilol 5 minutos.

-Xilol 5 minutos.

-Alcohol al 100% 3 minutos.

-Alcohol al 100% 3 minutos.

-Alcohol al 96% 3 minutos.

-Alcohol al 96% 3 minutos.

-H₂O destilada 4 minutos.

1. Solución Bouin (1 h a 60 – 65°C o toda la noche a temperatura ambiente).

Precalentar la solución Bouin.

Solución saturada de ácido pícrico

Ácido pícrico

9 g

Agitar unas horas y precipitar lo que no se disuelva por 24 h.

H₂O destilada

600 mL

Solución de Bouin

Reactivos

Solución saturada de ácido pícrico	375 mL
Formaldehido 37%	125 mL
Ácido acético glacial	25 mL

Nota: Estable por 2 años, es irritante y carcinogénico.

- Enfriar los portaobjetos en agua de grifo (18–26 °C), dentro de un vaso de Coplin.
- Lavar los portaobjetos con H₂O destilada para eliminar el amarillo de los cortes hasta que el corte se observe blanco.
- Hematoxilina de Weigert 10 minutos (se prepara al momento 1:1, solución A y B).

Solución A**Reactivos**

Hematoxilina	2.5g
Alcohol 95%	250 mL

Nota: inflamable, evitar contacto e inhalación.

Solución B**Reactivos**

Cloruro Férrico 29% acuoso(2.9g+10mL H ₂ O destilada)	10 mL
HCl concentrado	2.5 mL
H ₂ O destilada	237.5 mL

Nota: Estable por 1 año, corrosivo, evitar el contacto y la inhalación.

Concentración final

1.2%

1%

La mezcla A:B es estable por 3 días.

- Eliminar el colorante con H₂O destilada 10 minutos.
- Escarlata de Biebrich 5 minutos.

Escarlata de Biebrich

Reactivos		Concentración final
Escarlata de Biebrich	2.7 g	0.9%
Fucsina ácida	0.3 g	0.1%
Ácido acético glacial	3 mL	1%
H ₂ O destilada	300 mL	-----

Nota: estable por 6 meses, evitar el contacto y la inhalación

7. Enjuagar con H₂O destilada 3 minutos.
8. Ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico 15 minutos.

Ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico

Reactivos	
Ácido fosfotúngstico	10 g
Ácido fosfomolibdico	10 g
H ₂ O tri-destilada	400 mL

Nota: Estable por 6 meses, evitar contacto e inhalación

9. Eliminar el ácido inclinando las laminillas.
10. Azul de anilina de 15 a 30 minutos.

Azul de anilina

Reactivos	
Azul de anilina	10 g

Ácido acético glacial 8 mL

H₂O destilada 400 mL

Nota: Estable por 6 meses, evitar contacto e inhalación

11. Enjuagar con H₂O destilada hasta eliminar el color.

12. Ácido acético 1%, 2 minutos.

Ácido acético glacial 1%0

Reactivos

Ácido acético glacial 2mL

H₂O destilada 200 mL

13. Descartar solución y enjuagar con H₂O destilada.

14. Pasar por un baño de Alcohol 96%.

15. Alcohol al 96% 3 minutos.

16. Alcohol al 96% 3 minutos.

17. Alcohol al 100% 3 minutos.

18. Alcohol al 100% 3 minutos.

19. Xilol 5 minutos.

20. Xilol 5 minutos.

21. Montar.

TINCION ROJO SIRIO

Solución de rojo sirio-picro

Rojo sirio 0.5g

Solución acuosa saturada de ácido pícrico 500mL

Rojo sirio (sigma-aldrich 365548), ácido pícrico (sigma P6744-1GA)

Agua acidificada

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

Preparación de tejido:

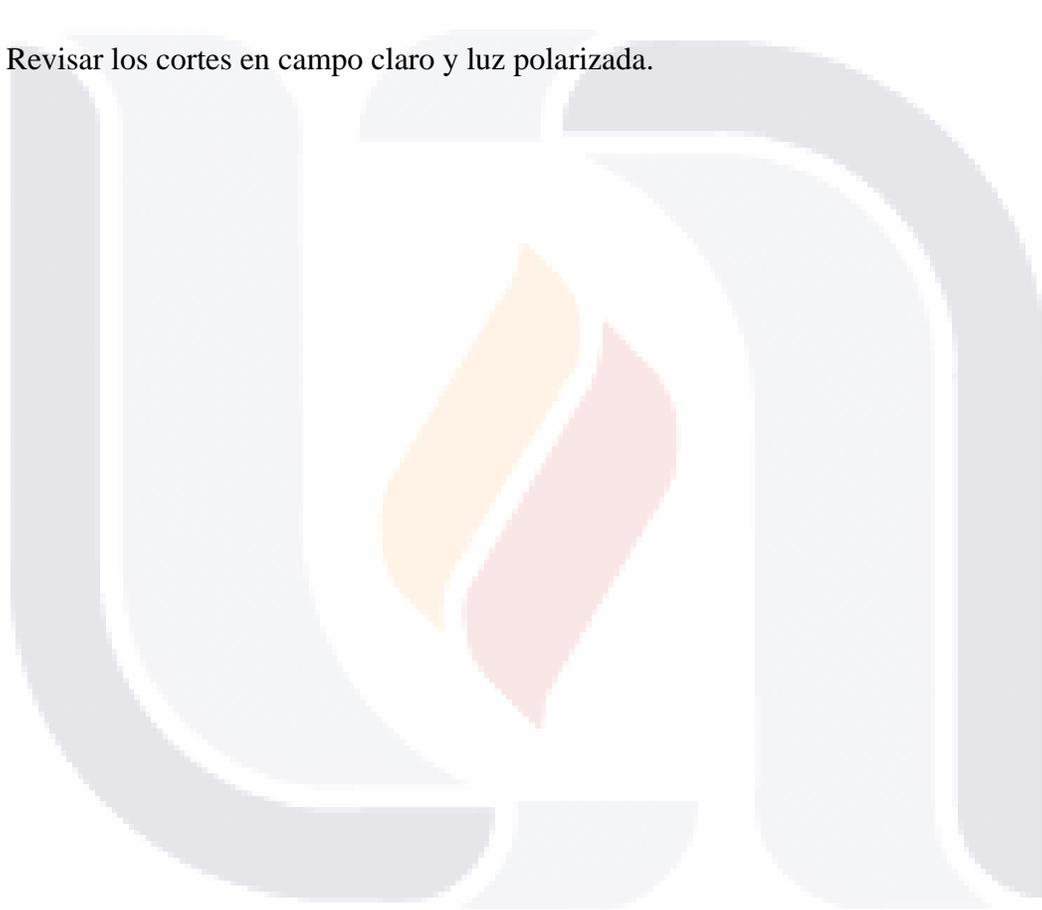
1. Se hidratan los cortes (5 μ L) provenientes de los bloques de parafina bajo el procedimiento convencional.

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

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

3. Se incuban en la solución de rojo sirio-picro durante 1 hora.

4. Se lavan dos veces con agua acidificada (2 baños de cada lavado).
5. Se deshidratan en dos cambios de etanol al 96% (45 segundos/lavado)
6. Montaje de la preparación histológica. Cubrir el tejido con Entellan (1.07961-0500; Merck) evitando dejar burbujas. Las laminillas se dejan secar durante 24 horas a temperatura ambiente.
7. Revisar los cortes en campo claro y luz polarizada.



ANEXO F

Farmacología

CONIVAPTAN

1. Pesar 30 mg del conivaptán y disolver en 1 mL de DMSO
2. Conservar en oscuridad hasta su uso.
3. Hacer dilución hasta el momento de su uso.
4. Tomar 100 ml del stock y ponerlos en 900 ml de agua destilada y administrar en un lapso no mayor a 4 a 6 h, cada 12 horas.

