



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

**“EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIFIBROGÉNICO DE LA
TAMSULOSINA DURANTE SU INTERACCIÓN CON CÉLULAS
ESTELARES ACTIVADAS”**

PRESENTA

Q.F.B. BUENDÍA DELGADO ROBERTO DE JESÚS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIAS AREA
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA

TUTORES

DR. JAVIER VENTURA JUÁREZ

DR. MARTIN HUMBERTO MUÑOZ ORTEGA

COMITÉ TUTORAL

DRA. RAQUEL GUERRERO ALBA

Aguascalientes, Ags., 26 de mayo de 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como tutor designado del estudiante ROBERTO DE JESÚS BUENDÍA DELGADO con ID 205397 quien realizó la tesis titulada: "EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIFIBROGÉNICO DE LA TAMSULOSINA DURANTE SU INTERACCIÓN CON CÉLULAS ESTELARES ACTIVADAS", un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 16 de mayo de 2023


Dr. en C. Javier Ventura Juárez
Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado

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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como co-tutor designado del estudiante ROBERTO DE JESÚS BUENDÍA DELGADO con ID 205397 quien realizó la tesis titulada: "EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIFIBROGÉNICO DE LA TAMSULOSINA DURANTE SU INTERACCIÓN CON CÉLULAS ESTELARES ACTIVADAS", un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 16 de mayo de 2023

Dr. en C. Martin Humberto Muñoz Ortega
Co-Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado

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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

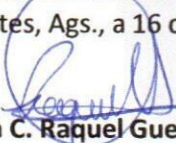
Por medio del presente como asesor designado y parte del comité tutorial del estudiante ROBERTO DE JESÚS BUENDÍA DELGADO con ID 205397 quien realizó la tesis titulada: "EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIFIBROGÉNICO DE LA TAMSULOSINA DURANTE SU INTERACCIÓN CON CÉLULAS ESTELARES ACTIVADAS", un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 16 de mayo de 2023


Dr. en C. Raquel Guerrero Alba
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado

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

Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 16/05/2023

NOMBRE: ROBERTO DE JESÚS BUENDÍA DELGADO ID 205397

PROGRAMA: MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA LGAC (del posgrado): TOXICOLOGÍA

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

TÍTULO: EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIFIBROGÉNICO DE LA TAMSULOSINA DURANTE SU INTERACCIÓN CON CÉLULAS ESTELARES ACTIVADAS

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): El proyecto tiene un alto impacto en la salud, ya que mediante los resultados obtenidos se deduce que las células estelares hepáticas causantes de la cirrosis hepática, responden a neurotransmisores para activarse y proliferar. Por lo que un antagonista de estos receptores tales como la tamsulosina puede reducir la actividad fibrogénica de estas células sin generar un efecto toxicológico en los hepatocitos.

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>	
SI	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>	
SI	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
SI	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI	Coincide con el título y objetivo registrado
SI	Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI	Tiene el CVU del Conacyt actualizado
N.A.	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</i>	
N.A.	Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
N.A.	El estudiante es el primer autor
N.A.	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
N.A.	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
N.A.	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
N.A.	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:

Sí X
No _____

FIRMAS

Elaboró:

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

DRA. ELSA MARCELA RAMÍREZ LÓPEZ

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. RAQUEL GUERRERO ALBA

* 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 JÁUREGUI RINCÓN

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

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

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

AGRADECIMIENTOS

Mediante estas palabras quisiera agradecer a todas las personas que me apoyaron incondicionalmente para la finalización de mi Maestría.

Mi pequeña perrita Lucas que es un angelito ahora, pero siempre fue uno de mis motores para seguir en cada momento de mi vida y mi carrera, siempre estará en mi corazón. Gracias por tu amor, pequeña.

Mis papás y mis hermanas que siempre confiaron en mí y que sabían que lo lograría desde el primer momento en que elegí mi carrera y mi posgrado. Los amo y espero estén orgullosos de su hijo y de su hermanito menor.

Mi grupo de amigos, que sin ellos no hubiera podido soportar la presión de la investigación, los mejores amigos y hermanos que pude conseguir en la universidad, que por estos tantos años siempre fueron risas y diversión, siempre apoyándome y sabiendo que podía confiar en ellos, por soportarme y darme esa ayuda que nunca pedí, pero siempre me dieron y nunca supe agradecerles por tanto, gracias a mis Babos, Poncho, Lezama y Jumanji.

Gracias a uno de mis mejores amigos Julio que fue una persona importante en la etapa de mi maestría, donde fue un ángel y me apoyo en una etapa de bajón, él me dio la mano para seguir hacia adelante, poder ser una mejor persona y ser lo que soy ahora. No sé cómo agradecerte por ser uno de mis mejores amigos.

A mi Clan de videojuegos, los mejores amigos que desde más de 10 años siempre me siguen apoyando y dándome ánimos para seguir adelante. Hasta hoy agradezco el día que los conocí y no me arrepiento de ello, los amo. Israel, Emmanuel, Alonso, Moiron, Diego, Andrea, gracias por toda la buena vibra que me dan.

Mis compañeros de Maestría que siempre fueron un apoyo en todo el proceso, gracias por los consejos y el conocimiento que me brindaron. Son los mejores y espero sigan adelante como siempre lo han hecho.

Gracias a Mariana Medina, la mejor estudiante de doctorado que conozco, la que siempre supo cómo lidiar conmigo en los procesos complicados y más difíciles de un posgrado, estaba para apoyarme en lo necesario de mi investigación y poder terminarla de la mejor manera posible.

Un gran abrazo y agradecimiento a los maestros Marco Zamarripa, Héctor Araiza, Gonzalo Muñoz, y la maestra Cristina Serna, que son los mejores maestros de la UAA, de los que siempre podía pedir apoyo y me daban la mano para poder lograr mis metas.

Agradezco a la Dra. Raquel Guerrero que me apoyo en para poder llevar mi proyecto de investigación fuera de la universidad y poder ir a uno de los congresos más importantes de México.

Un agradecimiento grande al Dr. Javier Ventura, uno de los mejores doctores de la UAA, el que siempre me regañó para poder lograr mis objetivos y que siempre fue un gran pilar para la finalización de mi posgrado. Gracias por confiar en mí y ser uno de mis tutores para lograr mi maestría.

Mi más grande agradecimiento al Dr. Martin Muñoz Ortega, el mejor tutor, maestro, compañero, doctor, químico y amigo que pude tener en todo el proceso de mi investigación, que desde mi licenciatura siempre me apoyo y el siempre confió en mí, que siempre supo que yo podía lograr esto y mucho más, espero este orgulloso de mi por poder finalizar esta etapa de mi vida, porque sin él no hubiera logrado nada. Perdón por tan poco y gracias por tanto.

Gracias a las personas que quizás no mencione en este pedazo de papel, pero que saben de corazón que agradezco el estar ahí, estar presente y ser personas importantes en mi vida, que me condujeron a ser la persona que soy hoy, la persona que tiene una visión de seguir hacia adelante, de no rendirme y de ser fuerte. Me caí muchas veces solo, y siempre intente salir hacia adelante, agradezco a las personas que estaban ahí y me agarraron fuerte la mano para poder salir de lo difícil.

De corazón, gracias.

“Temo de los eventos del futuro, no en si mismos, sino en sus resultados”

Edgar Allan Poe

“Arriesgarse es perder momentáneamente el equilibrio. No arriesgarse es perderse a si mismo”.

Soren Kierkegaard

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	4
Abstract.....	5
Introducción:	6
Células Estrelladas Hepáticas	6
Activación de las células estrelladas del hígado	7
Fibrogénesis Hepática	8
Producción de la matriz intersticial	8
Citocinas en el daño hepático y expresión de marcadores fibrogénicos en las CEH.	10
TNF- α	10
IL-6	11
TGF-β	11
Colágeno tipo1	12
α-SMA	13
Receptor X Retinoide alfa	13
PPARγ	14
Norepinefrina (NE)	15
Receptores Adrenérgicos	16
Impacto de los antagonistas adrenérgicos en la reducción de la fibrosis hepática	17
Tamsulosina	18
Justificación:.....	18
Objetivo General:.....	19
Objetivos Particulares:	19
Metodología.....	19
Cultivo celular primario de CEH de Rata Wistar	19
MTT para evaluar proliferación generada por el estímulo de la Norepinefrina	20
MTT para evaluar la viabilidad generada por la interacción de la Tamsulosina	20
Inmunofluorescencia	21
Preparación del rojo oleoso:	21

Tinción de rojo oleoso:	21
PCR en tiempo real	22
Extracción de ARN	22
Retrotranscripción de ARN	22
Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).	22
Análisis Estadístico	23
Resultados	24
CAPITULO 1	24
Cinética de Células estelares hepáticas de quiescentes a activadas.	24
Obtención de Células Estelares Hepáticas	25
Caracterización de CEH por morfología.	26
CAPITULO 2	27
Interacción de Células Estelares Hepáticas quiescentes y activadas con Agonista y Antagonista... ..	27
El tratamiento con Tamsulosina bloqueo la capacidad proliferativa generada por la Norepinefrina sobre las CEH	30
CAPITULO 3	40
Evaluación de marcadores moleculares en los días 3 y 7 de activación.....	40
Expresión de genes a los 7 días de extracción (qPCR) análisis en CEH activadas	43
Discusión	47
Conclusión:.....	50
Bibliografía	51
Apéndice A	54
Apéndice B	57
Apéndice C	58

Índice de figuras

Figura 1.- Células Estrelladas en corte morfológico.	7
Figura 2.- Señalización de hepatocitos.	10
Figura 3.- Funciones de PPAR γ.	15
Figura 4.- Electroforesis de receptores de CEH.	17

Figura 5.- Extracción de CEH.....25
Figura 6.- Caracterización de CEH26
Figura 7.- Proliferación de las CEH con Norepinefrina.....28
Figura 8.- Tamsulosina con CEH activadas29
Figura 9.- Bloqueo de receptores adrenérgicos por Tamsulosina30
Figura 10.- Inmunofluorescencia con Norepinefrina31
Figura 11.- Cinética de interacción con Norepinefrina en el día 332
Figura 12.- Cinética de interacción con Norepinefrina en el día 7.....33
Figura 13.- Tinción Rojo Oleoso en CEH en el día 1.....34
Figura 14.- Tinción Rojo Oleoso en CEH en el día 3.....35
Figura 15.- Tinción Rojo Oleoso en CEH en el día 7.....36
Figura 16.- Inmunofluorecencia de CEH con Tamsulosina en el día 1.....37
Figura 17.- Inmunofluorecencia de CEH con Tamsulosina y Norepinefrina en el día 338
Figura 18.- Inmunofluorecencia de CEH con Tamsulosina y Norepinefrina en el día 7.....39

Índice de gráficas

Grafica 1 y 2.- Expresión de genes de α -SMA Colágeno tipo I a los 3 días de extracción de CEH.....41
Grafica 3 y 4.- Expresión de genes de PPAR γ y TGF- β día 3 de extracción.....42
Grafica 5 y 6.- Expresión de α -SMA en el día 7 de extracción.43
Grafica 7 y 8.- Expresión de PPAR γ y TGF- β 44
Grafica 9 y 10.- Expresión de α -SMA y Colágeno tipo 1, desde estado quiescente a estado activado.45
Grafica 11 y 12.- Expresión de PPAR γ y TGF- β , desde estado quiescente a estado activado.....46

Índice de tablas

Tabla 1.- Secuencia de oligonucleótidos utilizados para qPCR23

Resumen

La cirrosis hepática es una enfermedad crónica que afecta a una quinta parte del mundo. En México, es la tercera causa de mortalidad, después de las enfermedades cardíacas y diabetes como las principales. Es causada por la producción descontrolada de matriz extracelular por las células estrelladas hepáticas (CEH). Se han hecho intentos para desarrollar tratamientos que puedan revertir esta enfermedad y se ha prestado atención a los estímulos responsables de la activación de las CEH, con base a que se ha demostrado la presencia de adrenorreceptores en estas células ya que se ha demostrado que su antagonismo disminuye la activación de estas células fibrogénicas. Objetivo: Establecer la posibilidad de un tratamiento que disminuya la capacidad fibrogénica de las CEH basado en un antagonismo alfa-adrenérgico. Material y Métodos: Se utilizaron CEH de rata en estado quiescente y activadas, obtenidas mediante cultivo primario. Para identificar las CEH en estado quiescente se identificó la presencia de retinol, el cual lo pierden por activación. El grado de activación se evaluó mediante inmunofluorescencia mediante la presencia de α -SMA y citoquímica con Rojo oleoso. La proliferación celular se evaluó mediante la técnica de reducción de MTT. La norepinefrina se utilizó para activar la señalización adrenérgica y la tamsulosina se utilizó como antagonista de esta vía. Resultados: Inicialmente estandarizamos el cultivo primario de CEH, identificadas por el marcador α -SMA a los 7 días de cultivo, así como la pérdida de retinol. Posteriormente, se demostró que el tratamiento con noradrenalina activaba las células estelares debido al aumento progresivo de la α -SMA y su aumento de la proliferación. Además, se demostró que el tratamiento con tamsulosina disminuyó el marcaje de α -SMA y evitó la pérdida de retinol y redujo la proliferación. Conclusión: La tamsulosina tiene un efecto directo en la disminución de la actividad proliferativa de los CEH quiescentes y activadas.

Abstract

Liver cirrhosis is a chronic disease that affects a fifth of the world. In Mexico is the third cause of mortality, heart disease and diabetes being the main ones. It is caused by the uncontrolled production of extracellular matrix by hepatic stelar cells (HSC). Attempts have been made to develop treatments that can reverse this disease, attention has been paid to the stimuli responsible for the activation of HSC, on the basis that the presence of adrenoreceptors in these cells has been demonstrated, its antagonism has been shown to decrease the activation of these fibrogenic cells. Objective: To demonstrate in the present work a possible treatment with a neuroimmune activity that decreases the fibrogenic capacity of HSC. Material and Methods: Quiescent and activated rat HSC obtained by primary culture were used. Retinol was identified to identify quiescent HSC, which is lost by activation. The degree of activation was evaluated by immunofluorescence for α -SMA and cytochemistry with oily red. Cell proliferation was evaluated using the MTT reduction technique. Norepinephrine was used to activate adrenergic signaling and tamsulosin was used as an adrenergic antagonist. Results: Initially, we standardized the primary culture of HSC, identified by the α -SMA marker at 7 days of cultivation. Subsequently, it was demonstrated that Noradrenaline treatment activated stellate cells due to the progressive increase of α -SMA and its proliferation. Moreover, tamsulosin treatment was shown to decrease retinol loss by preventing its activation and reducing proliferation. Conclusion: Tamsulosin has a direct effect on decreasing the activity of quiescent and activated HSCs.

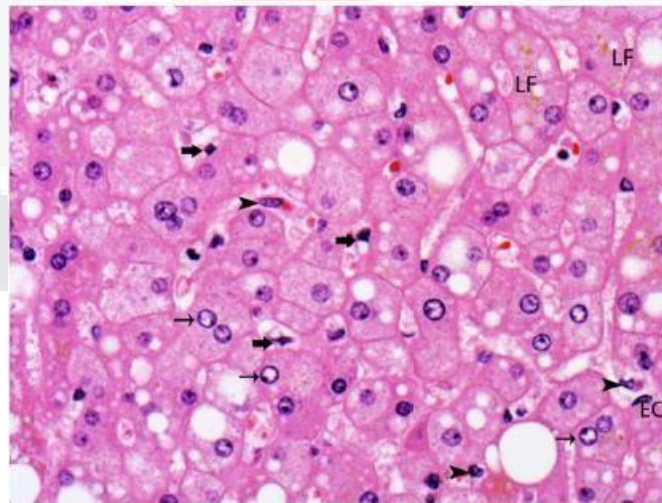
Introducción:

Células Estrelladas Hepáticas

Fue Karl Kupffer en el año 1876 quien descubrió y describió a las células estrelladas del hígado (CEH), cuando estaba intentando buscar fibras nerviosas en el hígado, utilizando la técnica de cloruro de oro. Fue así como logró identificar un grupo de células que presentaban prolongaciones que entraban en contacto con la pared sinusoidal y también con los hepatocitos, las cuales llamó células estrelladas.

(Sarem, R. Z. 2006)

Las células estrelladas son células mesenquimales, peri sinusoidales ubicadas a lo largo de las sinusoides en el espacio perisinusoidal de Disse, también pueden presentarse entre las células parenquimatosas. Normalmente este espacio contiene algunas fibras nerviosas y algunos componentes de la matriz extracelular (MEC) como fibras **colágenas de tipo I y III**; y componentes de la membrana basal que, por lo general, no llegan a formar una membrana basal verdadera. En su estado quiescente estas células son llamadas células de Ito, y constituyen al 5-8% del número total de células hepáticas, considerando hepatocitos, Células de Kupffer (macrófagos), las células de la vía biliar y las CEH. Normalmente el espacio de Disse se define como la zona limitada por los hepatocitos y la pared sinusoidal formada por las células endoteliales sinusoidales. (Sarem, R. Z. 2006)



(Sarem, R. Z. 2006)

Figura 1.- Se muestra como los sinusoides están revestidos por células endoteliales. Ec: Células endoteliales, Células de Kupffer (puntas flecha), Células estrelladas (flechas gruesas) y hepatocitos (flechas delgadas). Figura de Murli Krishna, 2013.

En el espacio sinusoidal nacen numerosas largas y finas prolongaciones citoplasmáticas, llamadas prolongaciones primarias. De estas prolongaciones primarias surgen las prolongaciones secundarias, que entran en contacto directo con las células endoteliales. En condiciones normales. (Sarem, R. Z. 2006).

Activación de las células estrelladas del hígado.

Tras la lesión crónica del tejido hepático resultante de cualquier etiología, como son problemas de alcohol o el uso crónico de fármacos, tanto las CEH como las otras células productoras de la matriz extracelular (MEC) presentes en el tracto portal sufren un proceso anormal que se denomina activación. La activación de las CEH es un proceso patológico que se caracteriza por la pérdida de las gotas de grasa, el aumento del número y en el tamaño de las células; y la transdiferenciación fenotípica a células proliferativas, fibrogénicas y contráctiles, que tienen características muy similares a los miofibroblastos. Tanto los estímulos patológicos como los mediadores intercelulares y los cambios de la MEC son factores de vital importancia para llevar a cabo dicha activación celular.

El inicio del proceso de la activación de las CEH se produce por:

1. El impacto que existe por la lesión de las células parenquimatosas o las células del tracto biliar sobre la homeostasis tisular.
2. Los efectos de los estímulos citocínicos provenientes tanto de células inflamatorias como de células vecinas.
3. Las modificaciones en la composición de la MEC, que las CEH perciben por medio de los receptores tipo integrinas que conectan componentes de la MEC al citoesqueleto.

(Sarem, R. Z. 2006)

El proceso de activación de las CEH puede dividirse en 2 etapas, la primera es de iniciación y la segunda es de perpetuación. La iniciación (también se le llama etapa preinflamatoria) corresponde a los primeros acontecimientos del proceso y comprende los cambios rápidos de la expresión genética y del fenotipo que permiten a las CEH responder a los estímulos locales y citocínicos; es el resultado de los estímulos paracrinos provenientes de las células vecinas, como macrófagos pertenecientes al hígado y los cambios tempranos de la composición de la MEC. La perpetuación corresponde a los acontecimientos celulares que

amplifican el fenotipo activado por medio de los efectos crecientes de las diversas citocinas, y comprende la proliferación, fibrogénesis, contractilidad, producción de citocinas, quimiotaxis y motilidad celular, pérdida de los retinoides y regulación de la MEC. Esta etapa es el resultado de estímulos autocrinos y paracrinos, así como de la remodelación en un proceso acelerado de la MEC. Todas estas alteraciones provocan en las CEH, algunos cambios importantes en la expresión genética que generan una serie de modificaciones fenotípicas que les permiten responder a los crecientes estímulos patológicos. Modificaciones fenotípicas en las CEH se sostienen por medio de una compleja y sofisticada señalización intercelular autocrina y paracrina. (Sarem, R. Z. 2006)

Fibrogénesis Hepática

La fibrosis hepática es una consecuencia patológica de estímulos crónicos de diferente naturaleza pueden ser: virales, autoinmunes, inducido por drogas, entre ellas el alcohol, así como de las enfermedades colestáticas y metabólicas. Puede ser definida como el resultado de la acumulación progresiva de la matriz extracelular (MEC) y disminución de su remodelado por las enzimas metaloproteasas, lo cual altera la arquitectura normal del hígado. Cuando ocurre un daño, una reacción inflamatoria aguda o un daño de la matriz extracelular, se produce una reacción de reparación y en respuesta a las células parenquimatosas perdidas por necrosis o apoptosis, se produce auto replicación, regeneración y sustitución de las células muertas. No obstante, ante la agresión mantenida los mecanismos se desregulan y falla la regeneración llegándose a la fibrosis hepática. Las CEH juegan un papel fundamental en la respuesta inmune hepática ya que pueden funcionar como células presentadoras de antígenos y de hecho pueden modular la proliferación de los linfocitos T; aunque su papel mejor conocido es su participación en el proceso de fibrosis hepática. Otros miofibroblastos hepáticos contribuyen en el proceso fibrótico, pero se sabe que las CEH participan en un 80% (Sarem, R. Z. 2006).

Producción de la matriz intersticial

Normalmente la MEC del hígado consta de variadas sustancias colágenas y no colágenas cuyas composición y concentración son responsabilidad de las CEH. Estos componentes intercelulares son elementos esenciales para mantener la morfología y las funciones de las células del hígado y sus alteraciones determinan modificaciones patológicas tanto desde el punto de vista morfológico como funcional. Existen metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) que son un grupo de enzimas que se encargan de catalizar los

componentes de la MEC. Los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) pueden bloquear las actividades catalíticas de estas enzimas a fin de mantener en condiciones normales un equilibrio fisiológico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la MEC. Dentro de las MMP cabe mencionar las colagenasas, que degradan los colágenos intersticiales (tipos I, II y III); las gelatinasas, que se encargan de catalizar componentes de la membrana basal, y las estromelisin, que hacen lo mismo sobre una amplia serie de sustancias como los proteoglucanos, la laminina, etc. En cultivo primario de CEH, la expresión de MMP como las colagenasas y las estromelisin aumenta transitoriamente en la primera etapa del cultivo, para luego disminuir hasta volverse indetectable, mientras que tanto la expresión del TIMP-1 como la del TIMP-2 aumentan llamativa y progresivamente en dicho cultivo (Batista, A. J. 2018).

El daño hepático de origen alcohólico se produce también como consecuencia de la presencia de acetaldehído, que es el metabolito del alcohol con mayor capacidad para generar estrés oxidativo en los hepatocitos. En el caso de la esteatohepatitis no alcohólica, la manifestación hepática del síndrome metabólico, la acumulación de lípidos en el interior de los hepatocitos promueve el desarrollo de estrés oxidativo, inflamación, muerte celular y fibrosis (P. Angulo, 2002).

La angiogénesis contempla la formación de nuevos vasos a partir de redes vasculares preexistentes. Este proceso no sólo participa dichos factores, sino que se requiere de la presencia de otras moléculas como proteínas de matriz extracelular, receptores de moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas. Estas últimas participan en la degradación de la lámina basal y de las proteínas de matriz, facilitando que se lleve a cabo la migración de las células endoteliales; mientras que los receptores de moléculas de adhesión participan en las uniones entre esas células (Jiménez-Andrade G y Espinosa C. 2011).

Las células endoteliales que son estimuladas por factores angiogénicos producidos por los hepatocitos, incluido el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el TGF- β . Por otro lado, los hepatocitos son activados por el factor de crecimiento epitelial (EGF) y el factor de crecimiento hepático (HGF) para la transcripción de genes y por lo tanto aumentar el tejido hepático, esto ante una situación ideal de regeneración. Por otro lado, también se sabe que cuando ocurre durante el daño crónico, el hígado expresa un aumento de proteínas embrionarias como la alfa-fetoproteína (α -FP), así como la expresión del oncogén c-MyC; estos son marcadores de proliferación hepática, aunque hay un aumento sostenido de estos marcadores los cuales predicen un posible proceso neoplásico.

(Serna-Salas, 2018)

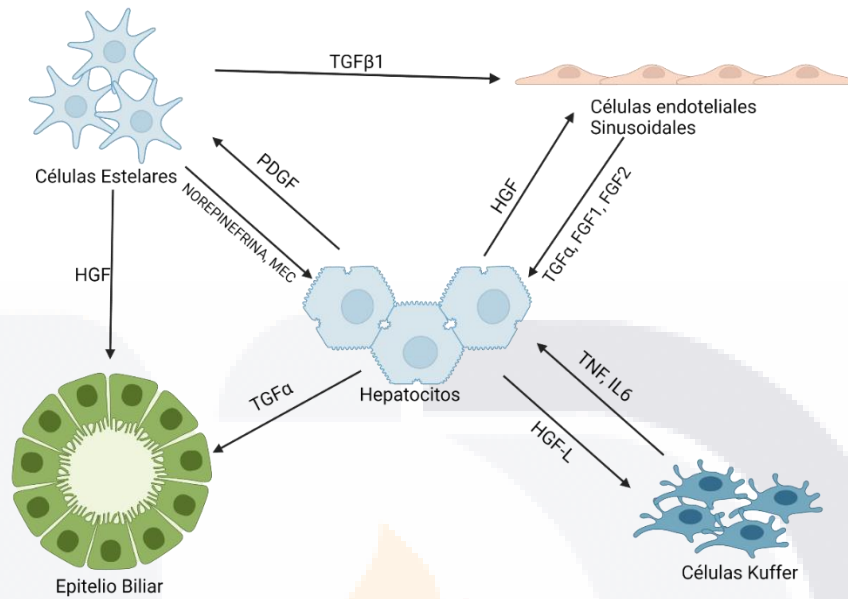


Figura 2.- Interacciones de señalización entre diferentes tipos de células hepáticas durante la regeneración del hígado. Muchas sustancias y agentes fibrogénicos provenientes de las células inflamatorias y de las células hepáticas, entre ellas las CEH, se liberan durante el proceso inflamatorio, donde actúan de forma paracrina y autocrina sobre las CEH y contribuyen a mediar y mantener el proceso fibrogénico.

(Sarem, R. Z. 2006)

Citocinas en el daño hepático y expresión de marcadores fibrogénicos en las CEH.

TNF- α

El TNF- α es una citocina sintetizada por los macrófagos y neutrófilos, es esencial para la reparación hepática mediante la activación del factor transcripcional NF- κ B, con capacidad de activar vías pro-apoptóticas (principalmente caspasas) y anti-apoptóticas al mediar la respuesta inmune.

(Miranda-Díaz, et al., 2010)

El TNF α induce la activación de caspasas, lo cual provoca la muerte de los hepatocitos por apoptosis, a su vez infiltración de leucocitos y la muerte por fallo hepático. Evitar los efectos dañinos del TNF α en los hepatocitos proporcionaría una vía terapéutica importante para el tratamiento de la hepatopatía alcohólica o tóxica. Además, en la mayoría de las circunstancias, el TNF α induce la liberación de otras citocinas inflamatorias, como la IL-1 y la IL-6, por los macrófagos hepáticos, lo que amplifica y cronifica el grado de lesión hepatocelular.

(M.J. Czaja, 2001)

IL-6

La IL-6 es producida por macrófagos hepáticos. Sin embargo, estudios previos han demostrado que es producido por líneas celulares de hepatomas, lo que sugiere que también puede ser producido por hepatocitos (Northemann et al., 1990). Investigaciones anteriores afirmaba que los ratones deficientes en IL-6 tienen una regeneración hepática deficiente. Por ello se asoció con una activación deficiente de Stat3.

(Cressman et al., 1996)

IL-6 es probablemente un factor que contribuye a la optimización de procesos de la etapa temprana de la regeneración del hígado, pero no debe ser visto como el iniciador del proceso (George K. Michalopoulos. 2007). La IL-6 juega un importante rol en la señalización hepática de la respuesta inflamatoria aguda a participar en la patogénesis de la fibrosis hepática. (Toda K. et al., 2000).

TGF- β

El TGF- β es sintetizado por las CEH, estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que el TGF- β provoca en las CEH activadas un aumento en la síntesis de las fibras colágenas, que se depositan en el espacio intercelular y en el espacio de Disse, lo que altera la función y la homeostasis de las de las células hepáticas. Asimismo, estimula la síntesis de los componentes de la membrana basal, lo que conduce a la capilarización de los sinusoides.

(Max G. Bachem, 1993)

En ratas transgénicas, la sobreexpresión del TGF- β 1 puede inducir la fibrosis, mientras que la fibrosis experimental puede inhibirse con anticuerpos neutralizantes. En la actualidad

está ampliamente aceptado que la persistente estimulación autocrina de las CEH por el TGF- β es un mecanismo clave en el desarrollo de la fibrogénesis hepática.

(Sarem, R. Z. 2006)

Colágeno tipo1

Las CEH activadas incrementan la producción de diferentes proteínas de la matriz extracelular, entre ellas del colágeno tipo I, la cuál es la principal proteína fibrilar dentro del tejido en exceso de la MEC en la fibrosis hepática. (Rojkind M, Giambrone MA. 1979). Por lo tanto, los mecanismos que regulan los genes de la colágena tipo I en las CEH podrían ser la base para entender la fisiopatología de la cirrosis hepática, así como para el tratamiento de esta.

El colágeno tipo I pertenece a una familia de proteínas estructurales de la matriz extracelular. El colágeno tipo I fue la primera caracterizada, la cual consiste en una unidad estructural proteica fundamental de 300 nm de largo y 1.5 nm de diámetro. Dicha unidad está conformada por 3 sub-unidades enrolladas: dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una $\alpha 2(I)$; en donde ambas cadenas son codificadas por dos genes diferentes. Cada cadena tiene 1,050 aminoácidos por vuelta y se enrollan en una conformación de triple hélice con giros hacia la derecha. Esta triple hélice se da, gracias a una abundancia inusual de tres aminoácidos: glicina, prolina e hidroxiprolina. Las cadenas α son sintetizadas como pro-cadenas α precursoras con extensiones amino y carboxilo terminal conocidos como pro-péptido N y pro-péptido C, respectivamente. Posteriormente, sufren una serie de modificaciones post-traduccionales y las tres cadenas α se asocian a partir de su pro-péptido C y se pliegan hasta formar la triple hélice. La colágena madura se genera extracelularmente por hidrólisis proteolítica de los propéptidos N y C.

(Lodish H, Berk A, Zipursky SL, 2000)

Aunque la colágena tipo I está presente en la matriz extracelular de muchos órganos, normalmente, pocas células tienen la capacidad de sintetizarla; entre ellas se incluye fibroblastos, osteoblastos y odontoblastos, que la sintetizan en grandes cantidades. En todas estas células, los genes de col1a1 y col2a1 son regulados en forma coordinada, ya que sus productos deben ser sintetizados en una relación de 2:1, para posteriormente formar la

colágena tipo I. La expresión del gen de col1a1 es controlada dependiendo del tejido, de la etapa de desarrollo embrionario y de la inducción por ciertas citocinas.

(Gabele E, Brenner DA, 2003)

α -SMA

El marcador α SMA, es una isoforma de la actina, además de ser específico para la diferenciación celular de músculo liso. La expresión de α SMA, es usado para la identificación en la activación de CEH las cuales muestran un fenotipo de un miofibroblasto. Las CEH humanas pueden expresar actina alfa específica del músculo liso (α -SMA), que luego se consideran CEH similares a miofibroblastos "activadas". Un mayor número de las CEH que expresan α -SMA se han documentado en varias condiciones patológicas asociadas con la fibrosis. Por otro lado, se ha documentado una disminución del número de CEH tras el tratamiento con interferón asociado a una mejoría de las lesiones necroinflamatorias.

(Guido M, Rugge M, Leandro G. 1997)

Receptor X Retinoide alfa

La actividad de los receptores de ácido retinoico no solamente se modula por la unión a ligando, sino que otras vías de transducción de señales pueden afectar su actividad por medio de modificaciones post-traduccionales, de las que cabe destacar la fosforilación, la acetilación y la ubiquitinación (Fu et al., 2004).

Actualmente, los mecanismos de interferencia o cross-talk de los receptores de ácido retinoico con otros factores de transcripción o rutas de señalización no se han dilucidado en su totalidad. Los receptores para el ácido retinoico pueden interferir con otras vías de señalización directamente implicadas en el desarrollo del cáncer. Se ha descrito recientemente que los receptores de ácido retinoico modulan la respuesta a TGF- β de manera dependiente de ligando, así los agonistas para RAR reprimen la transcripción dirigida por Smad mientras que los antagonistas para RAR la potencian. Otro ejemplo de vía de señalización reprimida por los receptores de AR es la vía oncogénica de la β -catenina.

(Easwaran et al., 1999)

PPAR γ

PPAR γ es un factor de transcripción dependiente de ligando que se expresa predominantemente en el tejido adiposo y ejerce un papel central muy importante en la adipogénesis, el metabolismo de las grasas y la energía. La expresión y la actividad de PPAR γ se suprime en CEH activadas. De hecho, tres estudios independientes demostraron que la actividad de PPAR γ se redujo en CEH humanas y de rata activadas cultivadas.

(Galli A, Crab D. 2000)

Este factor ejerce una gran cantidad de funciones en vías de señalización básicas, esto para modular el metabolismo lipídico, la homeostasis de carbohidratos, la diferenciación celular, la inflamación, y participa de forma activa en la DM tipo II, la EHGNA, la aterosclerosis y el cáncer.

(Romeo S, Kozlitina et al., 2008)

Pero además se ha descrito las funciones específicas que realiza PPAR γ en los diversos tejidos: en el tejido adiposo PPAR γ actúa como regulador en el proceso de los tejidos, se ha descrito un papel inflamatorio en epitelio intestinal y en el cerebro, PPAR γ específicamente en el endotelio modula la hipertensión derivada de una dieta rica en grasa, PPAR γ expresado en los conductos de recogida del riñón controla la retención de fluidos, y finalmente PPAR γ presente en el tejido adiposo, hígado, músculo y expresado en macrófago trabaja conjuntamente para mantener el estado normal de sensibilidad a la insulina.

(Heikkinen S et al, BBA 2007; Barak Y et al, 2007)

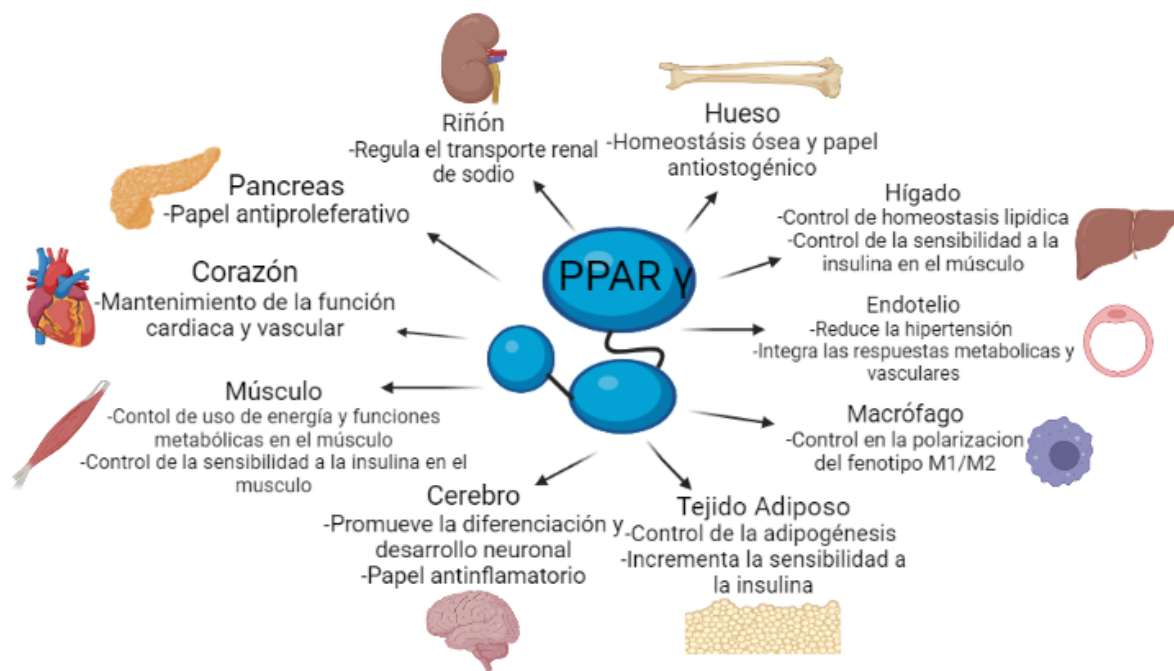


Figura 3. Funciones de PPAR γ en el organismo. Imagen realizada en Biorender.com

Norepinefrina (NE)

La norepinefrina es un neurotransmisor que se ha relacionado con la motivación, el estado de alerta y la percepción de los impulsos sensitivos. La disminución en la concentración de noradrenalina encontrada en los pacientes con trastornos de la conducta alimentaria parece ser la responsable de la hipotensión arterial, la bradicardia, la hipotermia y la depresión. Se ha informado que el Sistema Nervioso Simpático (SNS) hiperactivo contribuye al agravamiento inducido por el estrés de muchas enfermedades hepáticas a través de sus neurotransmisores de catecolaminas (incluida la NE). En muchos tipos de tumores, la NE, la epinefrina y la activación de los receptores adrenérgicos están implicados en la tumorigénesis, la supervivencia del cáncer, la proliferación, la angiogénesis, la progresión del tumor y la metástasis a través de las vías moleculares intracelulares acopladas a la señalización del receptor adrenérgico.

(Xia-Hui Lin, 2020)

La norepinefrina es el neurotransmisor de la mayor parte de las fibras simpáticas posganglionares y de muchas neuronas centrales. Esta catecolamina deriva del aminoácido tirosina y tiene como intermediarios de su síntesis a la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y a la dopamina. Las enzimas catalíticas responsables de este proceso son la tirosina hidroxilasa, la dopa-descarboxilasa y la dopamina β -hidroxilasa. La NE es almacenada en las

terminales nerviosas dentro de vesículas, y liberada en la hendidura sináptica por exocitosis. Algunas de las moléculas liberadas se difunden para unirse a receptores pos-sinápticos y activarlos, induciendo de esta manera una respuesta fisiológica.

(Vega-Rivera & López-Rubalcava, 2013)

El aumento del nivel de lípidos en la vena porta estimula la fibra aferente de los nervios vagales hepáticos, suprimiendo la ingesta de alimentos. La leptina secretada por los adipocitos activa los nervios simpáticos hepáticos a través del sistema nervioso central (SNC), disminuyendo el contenido de triglicéridos (TG) en el hígado. La inervación simpática hepática también afecta el metabolismo de los cuerpos cetónicos. La estimulación simpática promueve la producción de cuerpos cetónicos y su liberación del hígado.

(Kei Mizuno, 2017)

Receptores Adrenérgicos

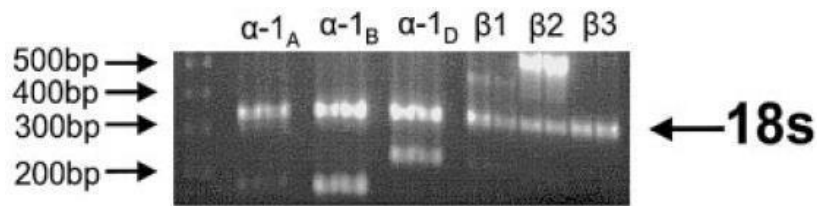
Los receptores adrenérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G o GPCR. Los receptores adrenérgicos responden a cambios en el ambiente y, por lo tanto, a una condición fisiológica determinada, como el incremento en la concentración de adrenalina y noradrenalina en la circulación sanguínea.

(Rocío Alcántara-Hernández y Aurelio Hernández-Méndez, 2018)

Los receptores alfa 1 adrenérgicos están localizados predominantemente en la post-sinapsis de la célula muscular lisa vascular, donde media la acción vasoconstrictora de la noradrenalina. Los receptores alfa 1B, predominan en corazón con efectos tróficos, y en el ojo donde producen midriasis. El 70% de los receptores presentes en la próstata son alfa 1 A con una afinidad 24 veces mayor que otros receptores α_{1B} , α_{1D} , β_1 y β_2 . El sistema nervioso autónomo es crucial para mantener el flujo sanguíneo en el hígado. Después de la estimulación del nervio autónomo hepático, se observa una reducción en el flujo sanguíneo arterial hepático. Esto está mediado por un mecanismo dependiente del receptor alfa adrenérgico a través de la constricción de la arteria hepática.

(Jorge H. Altamirano, s.f.)

Las CEH expresan múltiples subtipos de adrenergicos. Mediante el análisis de RT-PCR, se demostró que las CEH expresan α_{1B} , α_{1D} , β_1 y β_2 , se observó un perfil de expresión similar en Western Blot, como se observa en la figura 4.



<u>Product</u>	<u>Expected size (bp)</u>
$\alpha-1_A$	169
$\alpha-1_B$	158
$\alpha-1_D$	229
β_1	440
β_2	519
β_3	337

Figura 4.- Electroforesis la cual muestra como las Células Estelares Hepáticas expresan varios subtipos de adrenoreceptores tanto como alfa y beta. (Oben & Mae., 2004)

Impacto de los antagonistas adrenérgicos en la reducción de la fibrosis hepática

Los bloqueantes selectivos de los receptores adrenérgicos alfa 1 disminuyen la presión arterial por bloqueo post sináptico, anulando el efecto vasoconstrictor de la noradrenalina. Producen dilatación arterial y venosa, tendencia a disminuir la presión arterial, retención hidrosalina y relajación del trígono vesical, mejorando los síntomas obstructivos del tracto urinario inferior. El terazosina, doxazosina, tamsulosina y alfuzosina, son derivados de prazosina, desarrollados en la década del 80's y se diferencian del mismo, en la duración de la acción farmacológica. Estos dos últimos, tamsulosina y alfuzosina, se diferencian de los anteriores por presentar mayor afinidad al receptor alfa 1 A, con localización preferencial de estos receptores en la próstata, cápsula prostática, uretra prostática y cuello de la vejiga.

(Jorge H. Altamirano, s.f.)

Los adrenobloqueantes (doxazosina, un α_1 adrenérgico y carvedilol, un α y β adrenobloqueador) mejoraron el proceso de reversión de la cirrosis hepática y regeneración celular. Tienen la capacidad de potenciar la regeneración celular y también de revertir el daño histológico. Carvedilol (un α adrenobloqueante) se utiliza como fármaco antihipertensivo. Se utiliza clínicamente para reducir la hipertensión portal en pacientes con daño hepático y ejerce efectos antioxidantes y antifibróticos. La doxazosina (α_1

adrenobloqueante) tiene actividad hipotensora en las arterias a través de la inhibición del receptor α 1 adrenérgico. Además, la doxazosina se usa para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna y la hipertensión arterial. La doxazosina provoca una disminución de la fibrosis modulando la actividad de las células mesangiales renales y los fibroblastos miocárdicos productores de colágeno por un mecanismo aún desconocido.

(Serna-Salas, 2018)

Tamsulosina

Es un antagonista no selectivo del α 1-adrenoreceptor. Funciona al relajar los músculos de la próstata y de la vejiga para permitir que la orina fluya más fácilmente.

(Park & Kim, 2012)

Tamsulosina se absorbe en el intestino y su biodisponibilidad es casi completa. Tanto la velocidad como el grado de absorción de la tamsulosina se reducen cuando se toma dentro de los 30 minutos siguientes a la comida. La Tamsulosina muestra una exposición de plasma proporcional a la dosis.

(AEMPS, 2019)

Su acción farmacológica produce una apertura del cuello vesical y relajación del músculo liso prostático, con el consiguiente aumento del flujo promedio y el flujo máximo miccional, disminuyendo el residuo post miccional y, por lo tanto, mejorando los síntomas, particularmente los irritativos prostáticos, mejorando el componente dinámico miccional. La Tamsulosina tiene pocos efectos colaterales, fundamentalmente, se caracteriza por la ausencia de efecto de “primera dosis”.

(Jorge H. Altamirano, s.f.)

Justificación:

La cirrosis hepática es una enfermedad crónica que afecta a una quinta parte del mundo siendo en México la tercera causa de mortalidad. Se han intentado desarrollar tratamientos, que puedan llegar a revertir esta enfermedad, se ha puesto atención en los estímulos responsables de la activación de las células estelares hepáticas, como principal célula

fibrogénica del hígado, así mismo se ha demostrado la presencia de adrenorreceptores en las células estelares hepáticas, por lo que se ha planteado un posible tratamiento del efecto antagonista de receptores adrenérgicos que disminuya la capacidad fibrogénica sin alterar la viabilidad del hepatocito. Anteriormente se experimentó con doxazosina, donde se reportó una disminución de la actividad fibrogénica de la célula estelar hepática. Sin embargo, se observaron cambios morfológicos (balonización) en los hepatocitos, posibles efectos secundarios que afectan el proceso de regeneración. Las células estelares hepáticas tienden a estar en un estado quiescente, ante un daño hepático, la sobre estimulación de receptores de noradrenalina pueden ser activadas dando un incremento de fibrosis celular, por lo tanto, esta investigación tiene la finalidad de evaluar el efecto de la Tamsulosina un alfa-1 bloqueador adrenérgico sobre la actividad de las células estelares. Inicialmente, se estandarizó *in vitro* el método para el desarrollo del cultivo primario de las células estelares activadas, y posteriormente se evaluó el efecto antifibrogénico y anti-proliferativo de la Tamsulosina sobre las células estelares.

Objetivo General:

- Evaluar *in vitro* el efecto antifibrógeno de la Tamsulosina sobre células estelares activadas, obtenidas desde el parénquima hepático de la Rata Wistar.

Objetivos Particulares:

- Estandarizar el método para el desarrollo del cultivo primario de células estelares desde el parénquima hepático de la Rata Wistar.
- Evaluar el efecto de la Noradrenalina sobre la activación de las células estelares hepáticas quiescentes.
- Analizar el posible efecto antifibrogénico de la tamsulosina en las células estelares activadas.
- Evaluar el efecto de la tamsulosina en la disminución de la proliferación de las células estelares activadas con noradrenalina.

Metodología

Cultivo celular primario de CEH de Rata Wistar

Se inicia con un grupo de ratas Wistar, con un peso aproximadamente 400 g, se coloca en la mesa de cirugía una vez anestesiada. El equipo de perfusión se conecta a la vena porta de la rata Wistar para perfundir las enzimas digestivas y permitir la disgregación enzimática

del hígado. Después de extraer el hígado, se macera en un medio enzimático de ADNasa, Pronasa y Colagenasa (concentraciones en apéndice A). Luego se corta para poder tamizarlo a través de una membrana de nylon. Posteriormente se centrifuga el filtrado para realizar una separación mediante un gradiente de densidad (apéndice A) con ayuda de Nycodenz. Posteriormente se extrae la población de las distintas células provenientes del hígado. Las células se colocaron en un Flask T-25 para su posible adaptación a 37°C con un medio de cultivo DMEM a una atmósfera de CO₂ al 5% durante 7 días. Se realizó sub-cultivo para la proliferación de las CEH (Protocolo apéndice A).

MTT para evaluar proliferación generada por el estímulo de la Norepinefrina

Después de la extracción celular se permitió su proliferación en una incubadora a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%, con medio DMEM para tener una confluencia del 80-90%.

Para llevar a cabo el experimento colocaron 5,000 células en cada pocillo de una placa de 96 pozos, con 100 µl de medio. Dejando en incubación durante 24h para su crecimiento y proliferación con medio al 20% de SFB (suero fetal bovino). Posteriormente a las 24h se colocaron las concentraciones de Norepinefrina las cuales fueron de 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM y 1 nM. Se mantuvieron en cultivo durante 24h, después de ello, se colocó MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) 5mg/10ml de PBS, incubando 4 horas después se reveló eliminando el medio y colocando DMSO para diluir los cristales de formazán formados. Las absorbancias se analizaron mediante el lector de placas a 550nm, estas se analizaron con respecto al control con el fin de obtener la viabilidad con relación al 100% de viabilidad. El revelado demuestra la viabilidad celular dado por la proliferación gracias a la diferencia de concentraciones de la Norepinefrina (Protocolo del MTT en el apéndice B).

MTT para evaluar la viabilidad generada por la interacción de la Tamsulosina

Para llevar a cabo el plaqueo en placas de 96 pozos se colocaron 1 millón de células en cada pocillo, con 100µl de medio suplementado, pasando 24h, se colocaron las diferentes concentraciones de la Tamsulosina, estas fueron 0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM, 10 µM, y 100 µM, se colocaron 100µl de las concentraciones y 100µl de medio DMED.

Estas placas se evaluaron a 24, 48 y 72 h, después de estos tiempos, se colocaron 20 µl de MTT (5mg/10ml) en PBS por cada pocillo con 200 µl del medio, 1 millón de células

aproximadamente, el MTT tiene una concentración de 5 mg por cada 10ml de PBS, la viabilidad se evalúa según lo descrito anteriormente (Apéndice B).

Las absorbancias se obtuvieron por el equipo lector de Elisa, estas se normalizaron con el grupo control con el fin de tener una concentración de 100 % con el grupo control, y comparar con los demás grupos, de acuerdo con las concentraciones de la Tamsulosina. Evaluando los porcentajes de daño mediante este fármaco a diferentes concentraciones.

Inmunofluorescencia

Las células extraídas fueron colocadas en una placa de 24 pocillos con unos discos confocales de 20 mm de diámetro en el fondo del pozo, las células se adhieren a la superficie de los discos. La evaluación se realizó del 1 al día 7, con 3 repeticiones para cada tratamiento (No tratado, Tamsulosina, Norepinefrina 1 uM y Tamsulosina 0.01 uM /Norepinefrina 1 uM), fijados con paraformaldehído al 2.5% en PBS.

Las membranas de las células son permeabilizadas con PBS-Tritón 0.2% en refrigeración por 15 min, se lavaron con PBS 1X y después se incubaron con un buffer de bloqueo para las uniones inespecíficas, luego se colocó el primer anticuerpo de ratón anti α -SMA 1:100 (Abcam, ab7817) dejando reposar toda la noche a 4°C. Después se lavaron con PBS y se colocó el segundo anticuerpo (Alexa-Fluor 647, Thermo Fhiser, A-21235) para reposar en una cámara húmeda a 4°C durante una hora. Después se lavaron con PBS para colocar Hoechst para la tinción de núcleos durante 10 min, posteriormente se fijó el disco con una gota de glicerol. Los datos se documentaron en un microscopio Zeiss Axioscope 40/40FL (Zeiss, Oberkochen, GE) y se analizaron con Image Pro-Plus Software 4.5.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EE. UU.).

Preparación del rojo oleoso:

Se pesaron 30 mg de Rojo Oleoso (Cat: CTR 162069) y se agregaron 10 ml de isopropanol 97%, se mezclaron 3 ml del stock con 2 ml de agua desionizada y se dejó en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente (la solución será estable por 2 horas), después se filtró en tubos Falcón de 15 ml.

Tinción de rojo oleoso:

Se retiró el medio con tratamiento de las placas de 24 pozos después de 24 horas y se lavaron las células con PBS 1x, posteriormente se fijó con PFA 4% por 15 min, se hicieron dos lavados con PBS 1x, se tiñó las células con Rojo Oleoso por 15 min a temperatura ambiente, se lavaron las células con agua destilada estéril y se colocó la contratinción hematoxilina

1:10 por 1 minuto, se lavó con agua destilada estéril y se observaron en microscopio de contraste de fases.

PCR en tiempo real

Extracción de ARN

Las células estelares tratadas con tamsulosina y norepinefrina después de 24 horas fueron procesadas con el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep®. Después de la tripsinización de las células se centrifugaron hasta la formación de una pastilla y se agregaron 250 µl de Trizol reagent® por cada 5×10^5 células, se utilizó el vortex por 30 segundos hasta que la pastilla celular se disolviera por completo. Posteriormente se agregaron 250 µl de etanol y se mezcló por inversión, se agregó la mezcla de trizol y etanol en un tubo con columna y se centrifugo por 30 segundos a 14,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se agregó el pre-lavado del kit y se centrifugo la columna por 30 segundos a 14,000 rpm y elimino el sobrenadante, después de agregaron 700 µl de buffer de lavado y se centrifugo por 1 minuto. Por último, se agregaron 30 µl de agua libre de nucleasas como eluyente y se centrifugo por 45 segundos a 14,000 rpm, la concentración y pureza del ARN se determinó en un biodrop (Isogen life Science) y se almaceno a -80°C en Ultracongelador vertical Thermo-Scientific TOUCH SCREEN -86°C .

Retrotranscripción de ARN

Se sintetizó cDNA a partir de 500 ng de RNA total utilizando el kit GoScript Reverse Transcription System de Promega® usando el protocolo del fabricante. Para la síntesis de cDNA se utilizó 1 µg/µl de ARN, 1 µl de Oligo dt y 10 µl de agua libre de nucleasas los cuales fueron colocados 5 min a 65°C en el termociclador (Techne Genius FGEN02TP), posteriormente el volumen de la muestra se ajustó a 20 µl al agregar 4 µl de 5X Reaction Buffer, 1 µl de RiboLock Rnase Inhibitor (20 U/µl), 2 µl de 10 mM dNTP Mix y 1 µl de RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase bajo las siguientes condiciones en el termociclador: 25°C durante 15 minutos, 42°C durante 60 minutos y 70°C durante 5 minutos.

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

El cDNA se ajustó a una concentración de 50 ng/µl para todas las muestras. Se realizaron mezclas en placas de 48 pocillos para qPCR (Applied Biosystems® MicroAmp® -N8010560), qPCR GreenMaster with UNG (Jena Bioscience GmbH Löbstedter Str. 71 | 07749 Jena,

Germany | PCR-303S) y los 5 oligonucleótidos correspondientes (IBT © 2018 Integrated DNA Technologies, Inc.) en dilución 1:20 (10 ng) que se observan en la tabla 1.

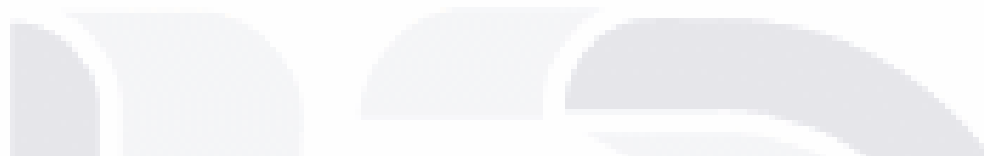
Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para qPCR.

Gen	Oligonucleótido Fw	Oligonucleótido Rv
Beta actina (β -actina)	GTCGTACCACTGGCATTGTG	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA
Colágeno I (Col 1)	TGGTGAACGTGGTGTACAAGGT	CAGTATCACCTTGGCACCAT
Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR γ)	CACAATGCCATCAGGTTTGG	GCTGGTCGATATCACTGGAGATC
α -SMA (ACTA 2)	GCCAGTCGCCATCAGGAAC	CACACCAGAGCTGTGCTGTCTT
factor de crecimiento transformador-beta (TGF- β)	GACTCTCCACCTGCAAGACCA	CGGGTGACTTCTTTGGCGTA

Las condiciones de la mezcla de reacción de qPCR fueron: 5 μ l de Master Mix, 1 μ l de oligonucleótido forward (50 ng/ μ l), 1 μ l de oligonucleótido reverse (50 ng/ μ l), 1 μ l de cDNA (50 ng/ μ l) y 2 μ l de agua libre de nucleasas, las placas se centrifugaron en microcentrífuga (MPS 1000 Mini PCR Plate Spinner- Labnet International®) y se analizaron en el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System para su análisis. Las condiciones de la PCR se describen a continuación: 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 3 minutos, posteriormente 40 ciclos bajo las siguientes condiciones: alineamiento: 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 40 segundos. Curva Melt: 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos. Los niveles de expresión relativa se normalizaron contra β -actina como un gen constitutivo y las diferencias se determinaron usando el método relativo de $\Delta\Delta$ Ct.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de esta investigación fue utilizado GraphPrism 8.0. Los datos son presentados como media con \pm error estándar de la media de cada grupo. Todos los experimentos fueron repetidos 3 veces. La diferencia estadística es entre valores evaluados usando dos vías de ANOVA y el t de student. Valor $P \leq 0.05$ son consideradas significantes.



CAPITULO 1

Cinética de Células estelares hepáticas de
quiescentes a activadas.



Resultados

Obtención de Células Estelares Hepáticas

Para la obtención de células estelares hepáticas se realizó la extracción a partir del hígado de ratas Wistar, utilizando enzimas digestivas para una disgregación enzimática. En los apartados A y B de la figura 5, se observa una morfología amorfa debido a que las células se encuentran en estado quiescente. En los apartados C-F, se muestra cambios en la proliferación según los días de cultivo, así como la morfología peculiar estrellada y la presencia de prolongaciones mediante las cuales forman conexiones entre células activadas.

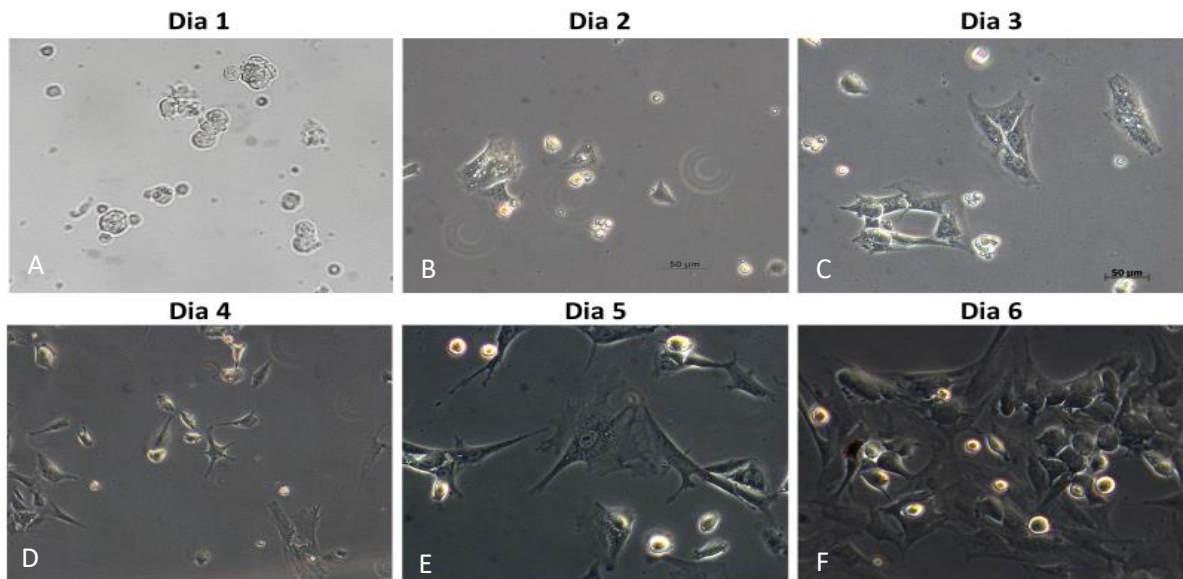


Figura 5-. Extracción de Células Hepáticas. Apartados A y B, referentes al día 1 y 2 de crecimiento células, mostrando morfología amorfa. Apartados C-F se presentan los días 3 al 6, donde se muestran las células en crecimiento y proliferación.

Caracterización de CEH por morfología.

La identificación de las células fue mediante microscopía de contraste de fases al séptimo día de establecer el cultivo primario, observándose en forma de estrella o fibroblástica (figura 6). Las células en estado quiescente contienen Vitamina A, la cual se va perdiendo debido a una activación, en la siguiente imagen (figura 6) se observa como las gotas de ácidos grasos de la Vitamina A están fuera de las células dado a su estado morfológico.

Día 7

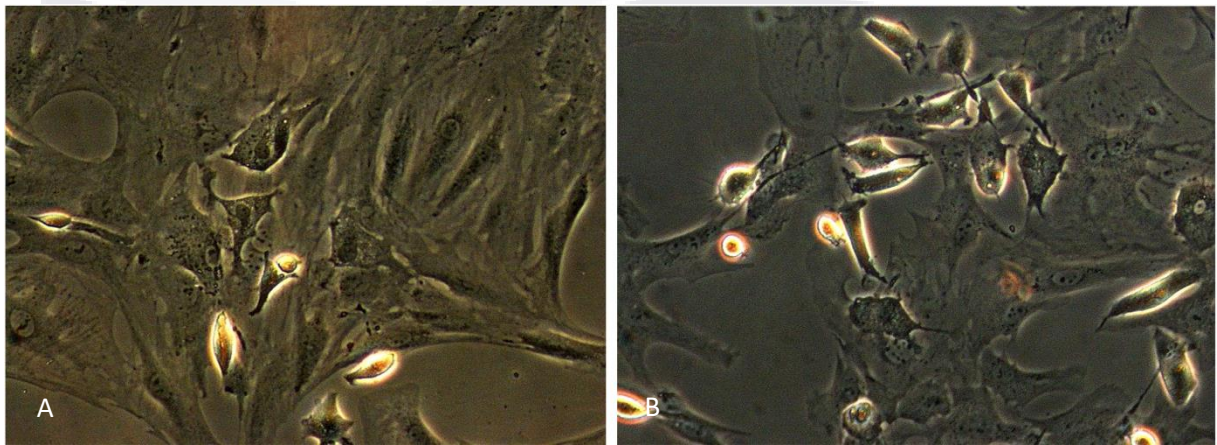


Figura 6.- Caracterización de CEH. Apartado A y B, referente al día 7 de la obtención de las células. Las células muestran su morfología óptima, se visualizan algunas gotas de vitamina A dentro de las CEH, pero la mayoría están en estado de activación debido a la proliferación celular. Aumento a 40x.



CAPITULO 2

Interacción de Células Estelares
Hepáticas quiescentes y activadas con
Agonista y Antagonista.



Norepinefrina aumenta la proliferación de las CEH activadas

Se presenta la proliferación de las CEH activadas a los 7 días de establecer el cultivo primario con el tratamiento de Norepinefrina. En la figura 7 se observa un incremento en la proliferación de las células debido a la interacción con norepinefrina en distintas concentraciones siendo estadísticamente significativa con las concentraciones de 1µM y 100 nM norepinefrina.

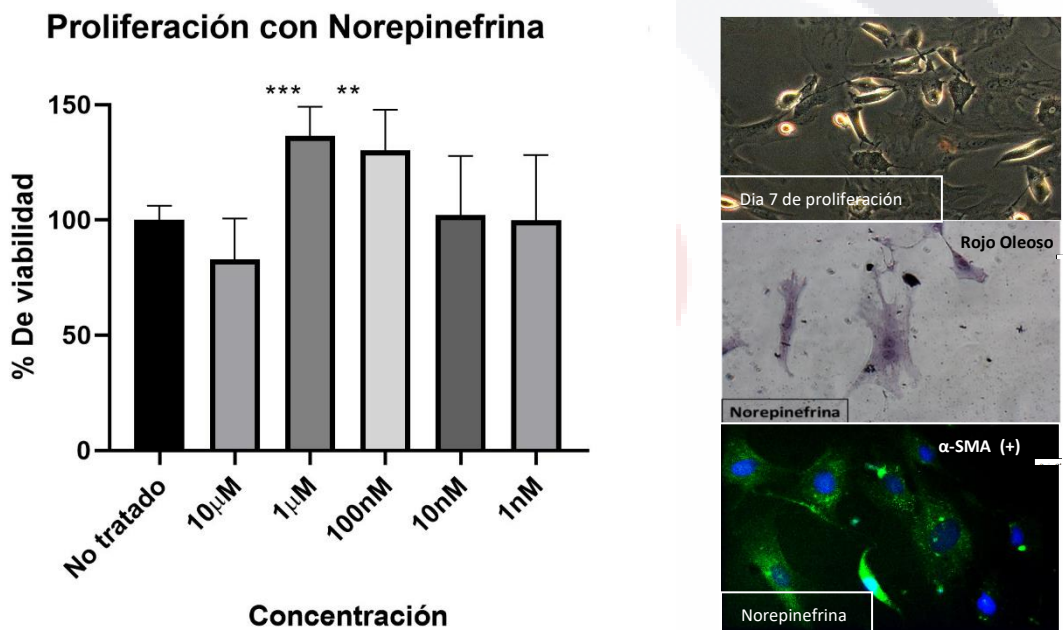


Figura 7.- Día 7, proliferación de las CEH con Norepinefrina. Se observa la interacción de la Norepinefrina con las CEH, las cuales muestran proliferación debido a la estimulación de este neurotransmisor. En la imagen fluorescente se observa de color verde el citoplasma y de color azul el núcleo. A concentración de 1µM y 100nM se mostró una mayor proliferación a diferencia del grupo No tratado, 10 µM, 10nM y 1nM.

La Tamsulosina no afecta la viabilidad de las CEH activadas

Como puede observarse en la siguiente figura 8 se puede observar que el tratamiento con Tamsulosina no afecto la viabilidad de las CEH en ninguna de las concentraciones probadas. La tamsulosina a concentraciones bajas no afecta la viabilidad de las células Estelares Hepáticas, mientras que a concentraciones altas genera un posible efecto proliferativo, la tamsulosina parece que no afecte la expresión de α -SMA, ya que no ve la expresión de α -SMA como con el tratamiento con la Norepinefrina, donde se observa que aumenta la proliferación celular, con base a las imágenes se trata de CEH activadas.

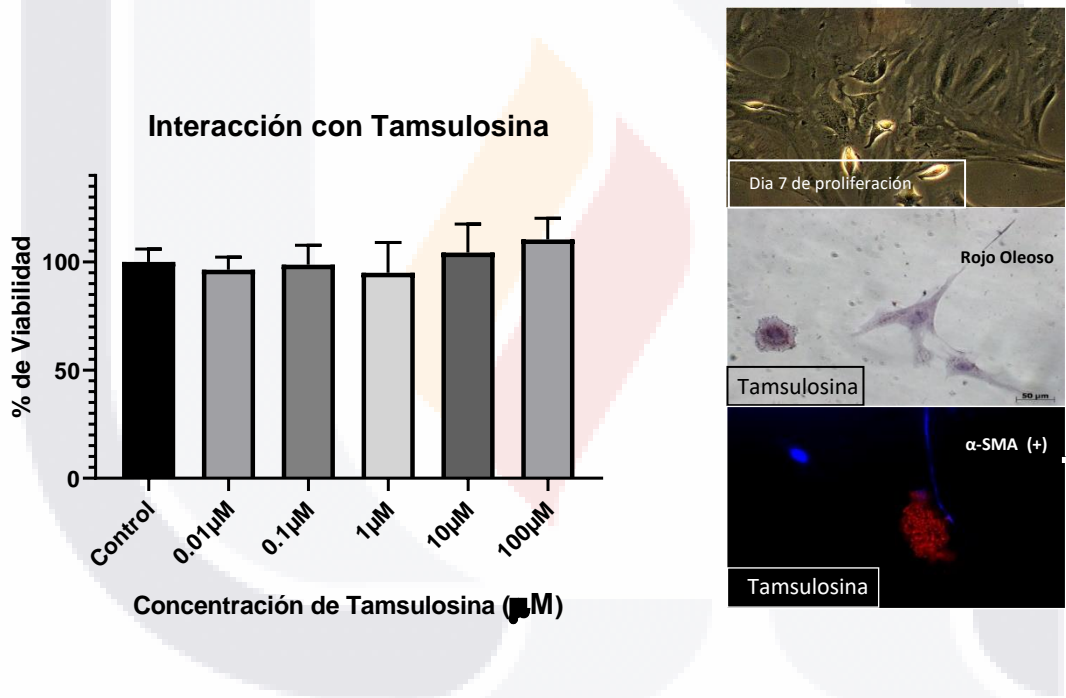


Figura 8.- Día 7, Tamsulosina con células activadas. De color rojo representa el núcleo y el color azul el citoplasma. Diferentes concentraciones de Tamsulosina en CEH en el día 7. Estabilidad de viabilidad celular a una concentración de .01 μ M y .1 μ M. En las imágenes se muestran las CEH en el día 7 de proliferación en un estado de activación, lo cual se puede ver su morfología en forma de estrella. En las imágenes de Tamsulosina se muestra como hay menos células y con una estructura de estrella como lo es a los 7 días.

El tratamiento con Tamsulosina bloquea la capacidad proliferativa generada por la Norepinefrina sobre las CEH

Las gráficas a continuación muestran el bloqueo de receptores adrenérgicos por Tamsulosina y la interacción con NE (1µM), la cual hay diferencia mayor de proliferación celular en las concentraciones de 100 µm y 1µm a diferencia del grupo no tratado de Norepinefrina.

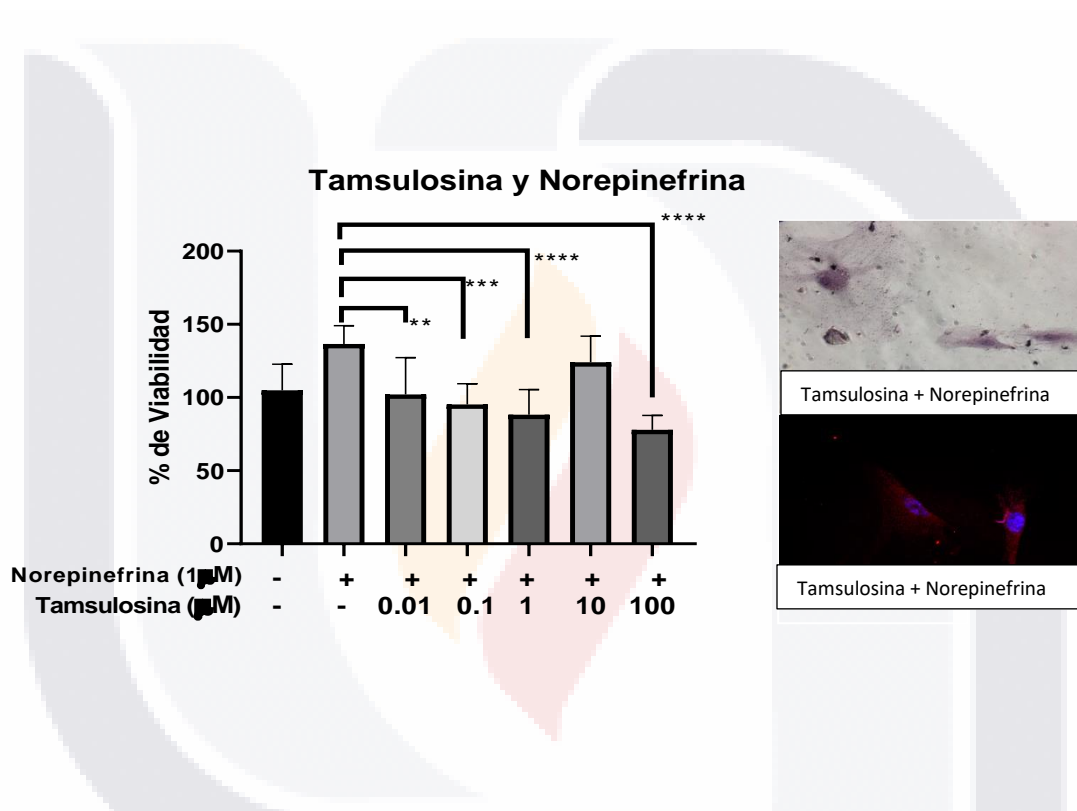


Figura 9.- Dia 7, Tamsulosina colocada 1hora antes de la Norepinefrina. De color rojo representa el núcleo y el color azul el citoplasma. Bloqueo de los receptores adrenérgicos por Tamsulosina. El color azul se muestra el núcleo y de color rojo se muestra el citoplasma. La interacción con NE realizada una hora después de la interacción con Tamsulosina. Se observa una diferencia con las concentraciones de 1µM y 100µM, teniendo una viabilidad baja. Con la concentración de .01µM se muestra una menor diferencia que con las demás concentraciones. La concentración de 10uM, muestra un porcentaje similar al no tratado de NE 1µM. Las imágenes son tomadas del día 7 con la interacción con Tamsulosina el cual muestra un estado quiescente y muerte celular.

Cinética de activación de las CEH: Inmunofluorescencia con Agonista (Norepinefrina).

Para una activación temprana de las CEH se realizó la técnica de inmunofluorescencia para evaluar el efecto en la activación causada por el agonista Norepinefrina. La expresión del marcador α -SMA nos indica la activación y proliferación de las CEH. La presencia en los primeros días del marcador α -SMA con relación a células no tratadas muestra la activación temprana de las células, debido a la morfología que está ocurriendo. El grupo de No tratado muestra una morfología redonda en donde la célula está en estado quiescente, en relación con el grupo con Norepinefrina se observa una leve expresión de este marcador.

Día 2

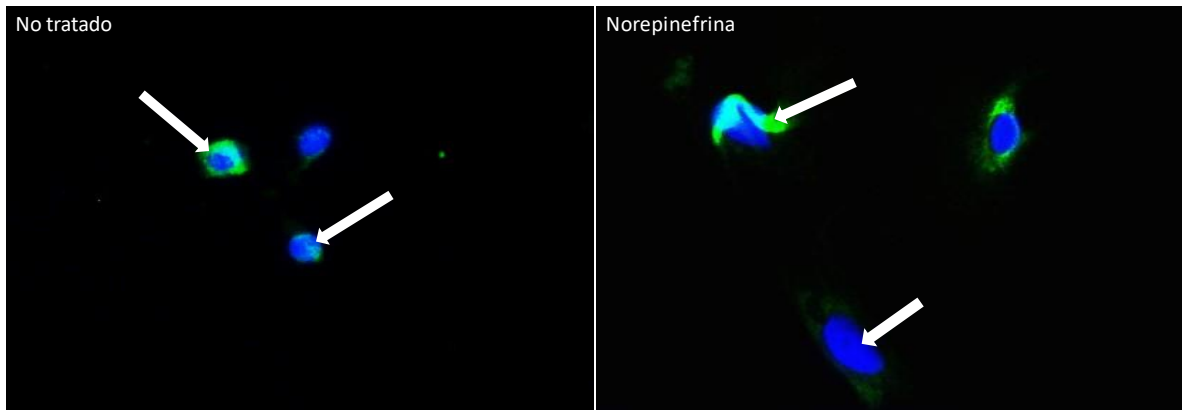


Figura 10.- Día 2 de interacción con el agonista, se muestra la expresión que se está presentando en las células con Norepinefrina, en ellas se empieza a expresar la proteína α -SMA, mientras que en el grupo no tratado se mantienen una morfología redonda.

Las imágenes con inmunofluorescencia en la figura 11, muestran la expresión del marcador α -SMA en las CEH (verde), mostrando un inicio en la activación de las células en el día 2, a partir del día 3 al día 6, las células expresan la proteína α -SMA más abundante en el interior, demostrando el proceso de activación. En el día 7 (figura 12) las CEH muestran una gran cantidad de actina y una alta proliferación.

Día 3

En el día 3 de la extracción, las células tienen características iniciales de activación en el grupo No tratado, la interacción con Norepinefrina provoco la activación temprana con relación al grupo no tratado.

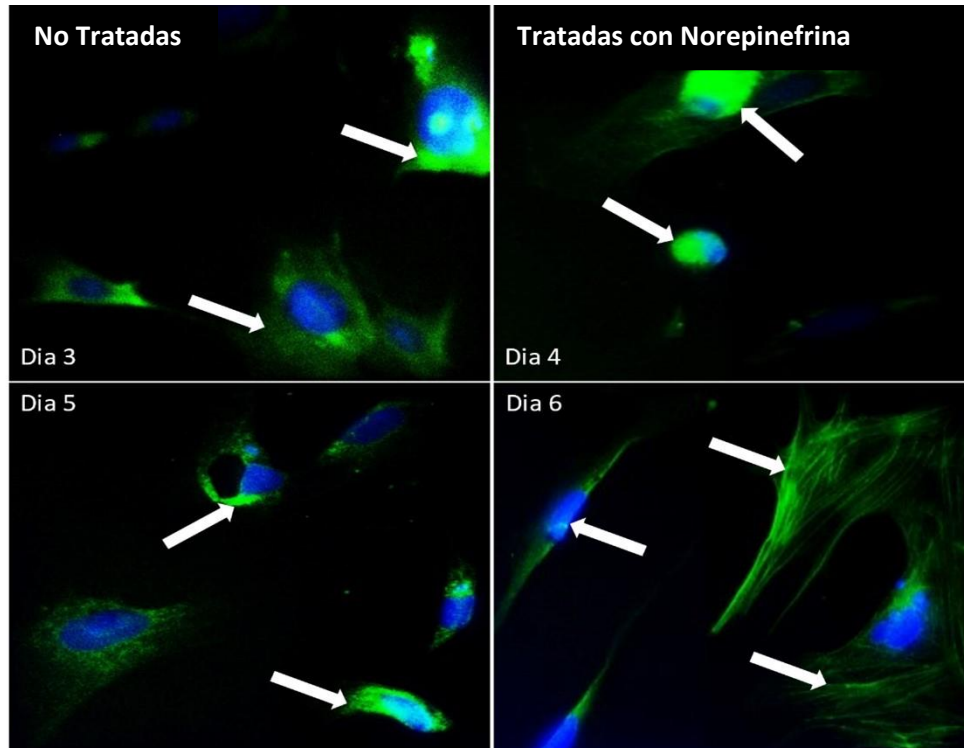


Figura 11.- Cinética de interacción con Norepinefrina. En el día 3 se empieza a expresar el α -SMA en las células, con largas prolongaciones como se observa en el día 6, dicho marcador muestra la activación de las CEH. Del día 4 al 6, las células proliferan y expresan su forma fibroblástica.

En el día 6, los grupos comparten muchas características, independientes del efecto activador de la Noradrenalina, se observa la expresión de la actina de musculo liso. En los dos grupos se puede observar las similitudes de la expresión de la proteína y permite ver la morfología de las células estelares hepáticas.

Día 7

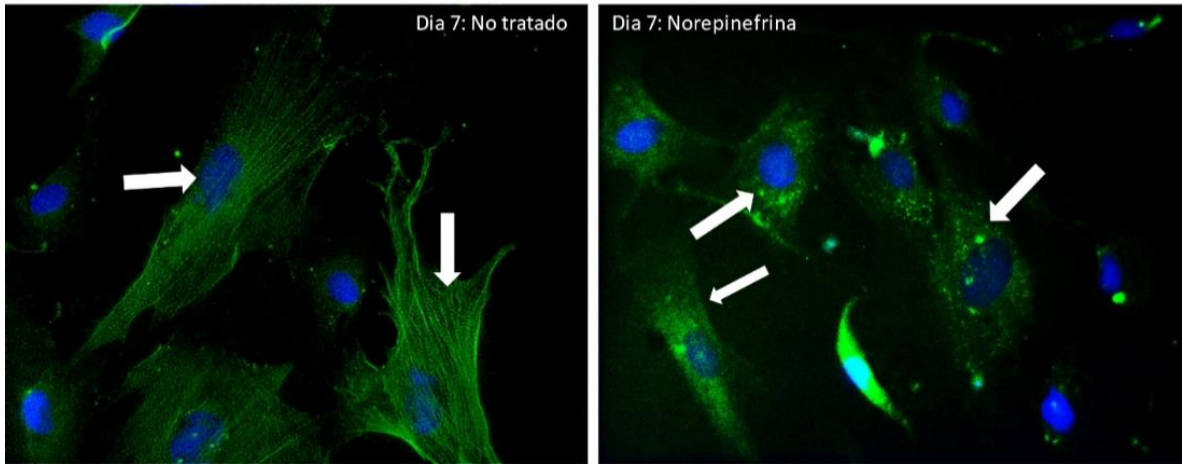


Figura 12.- En el día 7 de la extracción e interacción con norepinefrina, las células tienen su forma de estrella y hay una alta proliferación celular.

En el día 7 después de establecer el cultivo de CEH, los dos grupos comparten gran morfología y niveles de expresión de la proteína α -SMA son similares, el grupo con Norepinefrina solo se observó una estimulación temprana en los primeros 3 días, sin gran diferencia en el día 7 de su extracción.

La tamsulosina evita la activación de las células Estelares Hepáticas: Tinción Rojo Oleoso

A continuación, se muestra la tinción de Rojo Oleoso para ácidos grasos o retinol. Las CEH contienen Vitamina A, por ello en el día 1 de extracción se observa una alta cantidad de esta vitamina teñida con el rojo oleoso, así mismo se observa una morfología amorfa característica de las células estelares quiescentes. Tras la interacción con Norepinefrina se pierde la Vitamina A por la activación de las células y se presenta una morfología fibroblástica. El tratamiento con Tamsulosina antes de la interacción con Norepinefrina, las CEH presentan gotas de Vitamina A intracelular, debido al bloqueo de receptores adrenérgicos, inhibiendo por consiguiente la activación temprana de las CEH y por ende se mantiene la morfología amorfa en gran cantidad de estas células.

Día 1. Células No tratadas

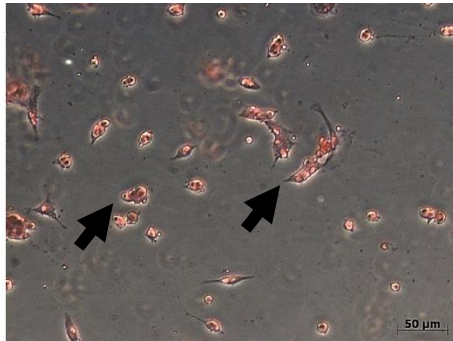


Figura 13.-Caracterización de CEH. Rojo Oleoso tiñe el retinol presente de las células en estado quiescente. Aumento a 20x. Muestran una morfología redonda y amorfa, al contrario de su morfología estrellada cuando está en estado de activación.

La técnica de rojo oleoso, el cual muestra la pérdida de retinol al pasar de los días por la activación de las CEH, las células al día 1 (figura 13) muestran células con morfología redonda y pequeña con retinol dentro.

Día 3

En el día 3 de la extracción es posible observar los cambios morfológicos, primera etapa de activación y bloqueo de receptores de las CEH.

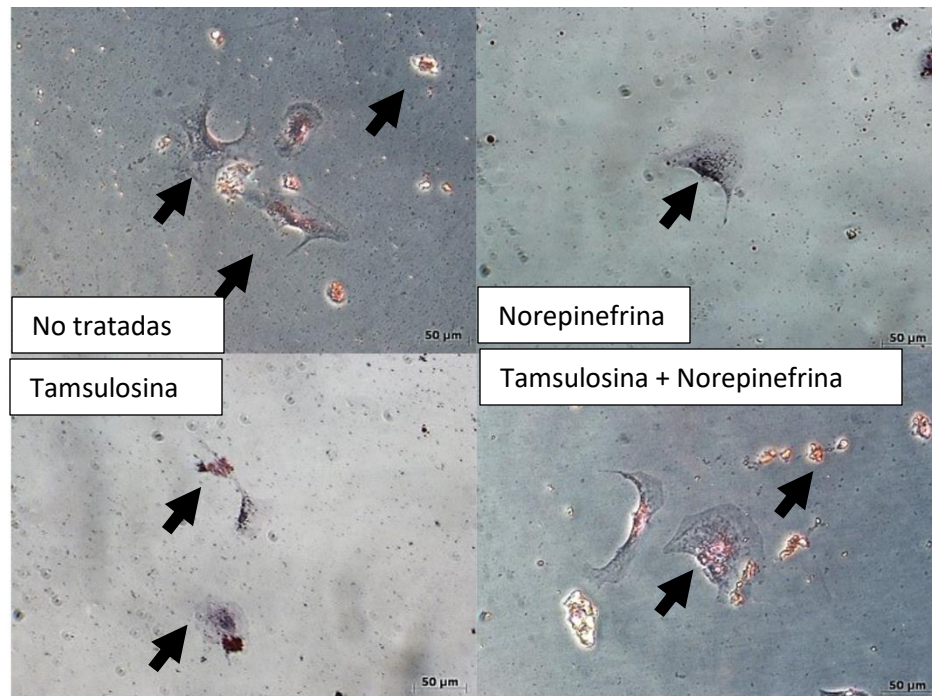


Figura 14.- Las células del grupo no tratado muestra la vitamina A o el retinol dentro de las células, de igual manera que el grupo de tamsulosina y Tamsu/NE, lo cual indica el estado quiescente de las células. en el grupo con Norepinefrina se muestra que las células no muestran el retinol intracelular, lo cual indica la activación de las CEH.

En el día 3 (figura 14), las células tuvieron diferentes comportamientos debido a los tratamientos, en el grupo con Norepinefrina la célula no presenta retinol en el interior, mostrando el proceso de activación, a comparación de los grupos de Tamsulosina y Tamsulosina + Norepinefrina, que muestran el bloqueo de la activación, estas células presentan retinol en su interior y una morfología redonda y amorfa.

Día 7

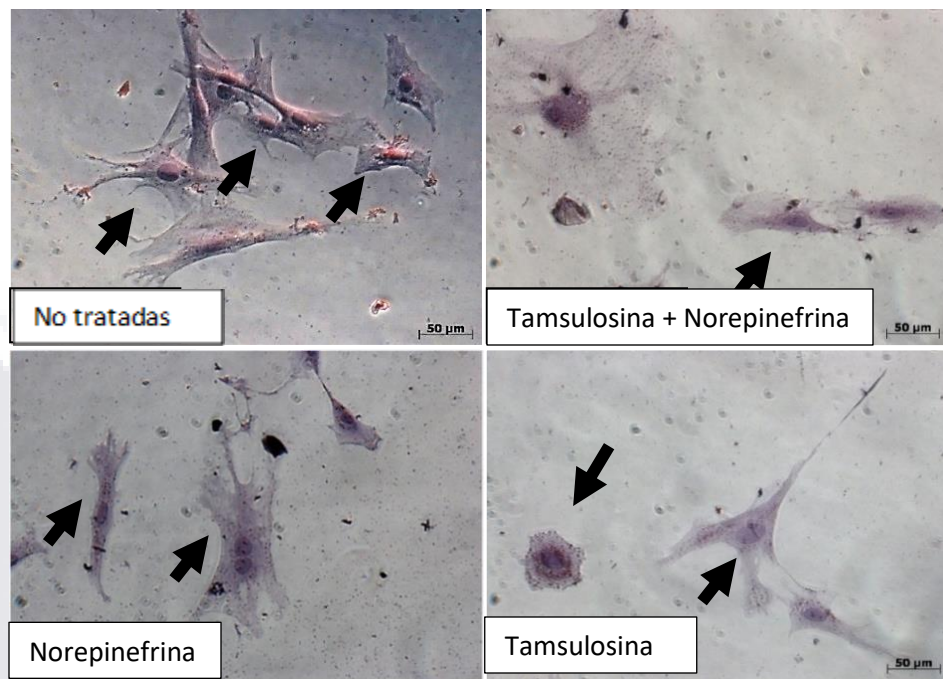


Figura 15.- En el día 7 del cultivo de CEH, las células se activan presentando una morfología de estrella. Los grupos de no tratado y Norepinefrina tiene morfología similar de fibroblasto. Los grupos de Tamsu/NE y Tamsulosina, algunas muestran una morfología redonda y unas células presentan la forma fioblástica.

En el día 7 (figura 15) las células CEH tratadas con Tamsulosina, NE o ambas muestran características similares a las células no tratadas. posiblemente algunas células llegan a tener una activación por sí mismas y empiezan a proliferar y entrar en proceso de activación.

La tamsulosina evita la activación de las células Estelares Hepáticas: Inmunofluorescencia

De igual manera se repitió la técnica de inmunofluorescencia con marcador α -SMA, pero con interacciones de los diferentes tratamientos, Norepinefrina, Tamsulosina y ambos medicamentos. La célula en el día 1 (figura 16) muestra una morfología totalmente redonda, indicando su estado quiescente, así como una expresión muy baja de α -SMA. En el día 3 (figura 17) se observan las diferencias en estos tratamientos, el grupo No tratado muestra una morfología quiescente, pero con mínima expresión de α -SMA. Por otra parte, señales de una activación temprana se observa en el grupo tratado con norepinefrina, se

encontró una morfología fibroblástica con más expresión de actina comparado al día 1, mientras tanto en los grupos de Tamsulosina y Tamsulosina + Norepinefrina, se muestra una morfología redonda dado en células quiescentes, donde se revela un bloqueo en la activación dado por el antagonista Tamsulosina.

La presencia del marcador α -SMA en las células, nos muestra la morfología de una CEH activada a comparación de la tinción Rojo Oleoso donde la coloración se pierde. El tratamiento con Tamsulosina logro bloquear la activación de las células en el día 3, donde se muestra una morfología similar al del día 1, por lo tanto, mantuvo el estado quiescente. El grupo con Norepinefrina aumento la expresión de α -SMA debido a que están diferenciando a un estado de activación en el día 3.

Día 1

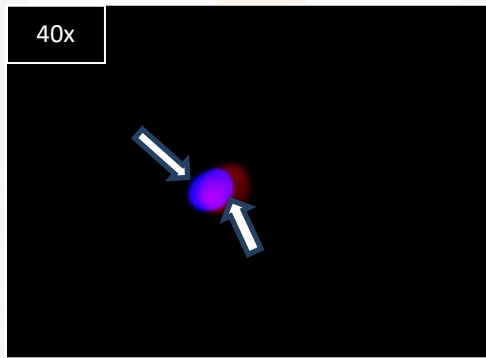


Figura 16.- Día 1. Célula no tratada en estado quiescente. Indica que no tiene una morfología optima, la presencia de actina de musculo liso de color rojo y núcleo de color azul. La célula no está en la etapa de activación al día 1 de su extracción.

Día 3

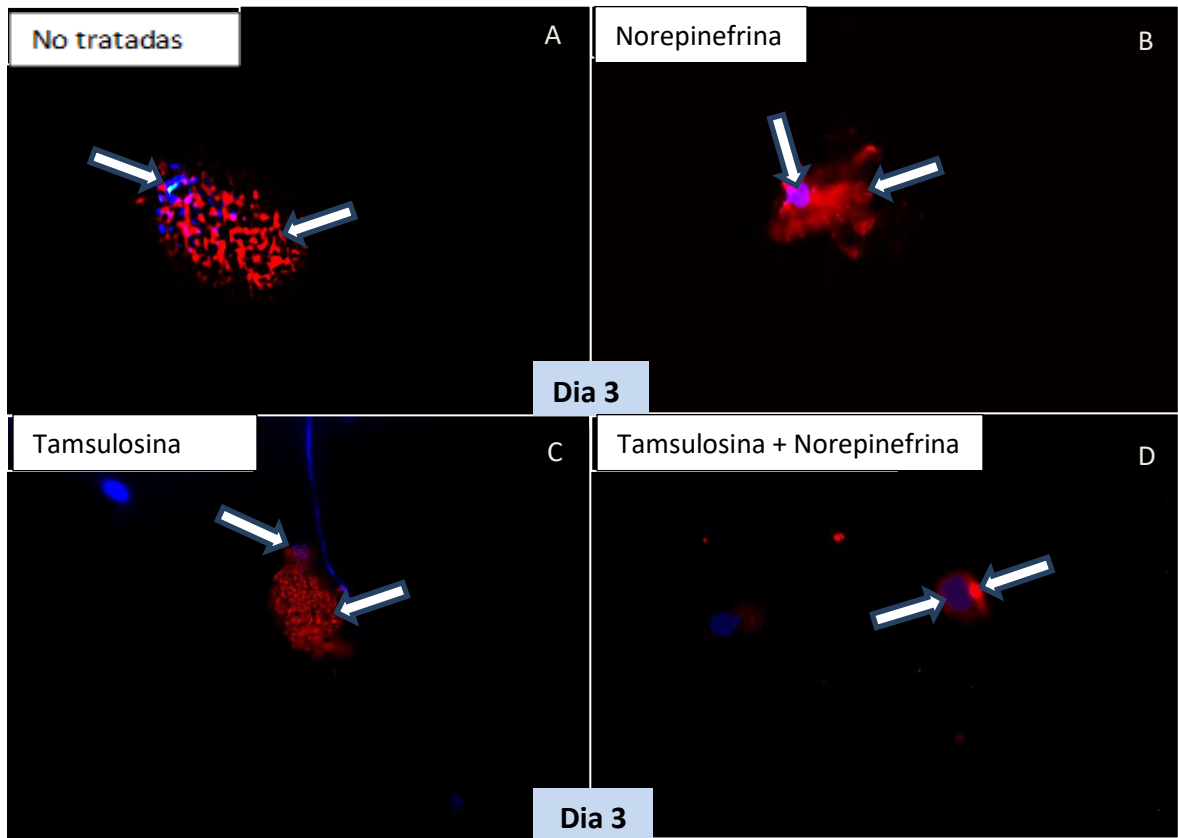


Figura 17.- Activación con Norepinefrina y bloqueo con Tamsulosina. Día 3 comparación de la interacción con Tamsulosina y NE. De color azul se muestra el núcleo y el color rojo es el citoplasma de la célula. El apartado A muestra la CEH en estado quiescente. El apartado B muestra el tratamiento con Norepinefrina observándose una morfología incompleta, pero a punto de proliferar. En el apartado C se observa la interacción con tamsulosina, donde no hay proliferación dada la falta de activación, igualmente sucede con el apartado D, interacción de tamsulosina con norepinefrina, por bloqueo de receptores adrenérgicos.

Día 7

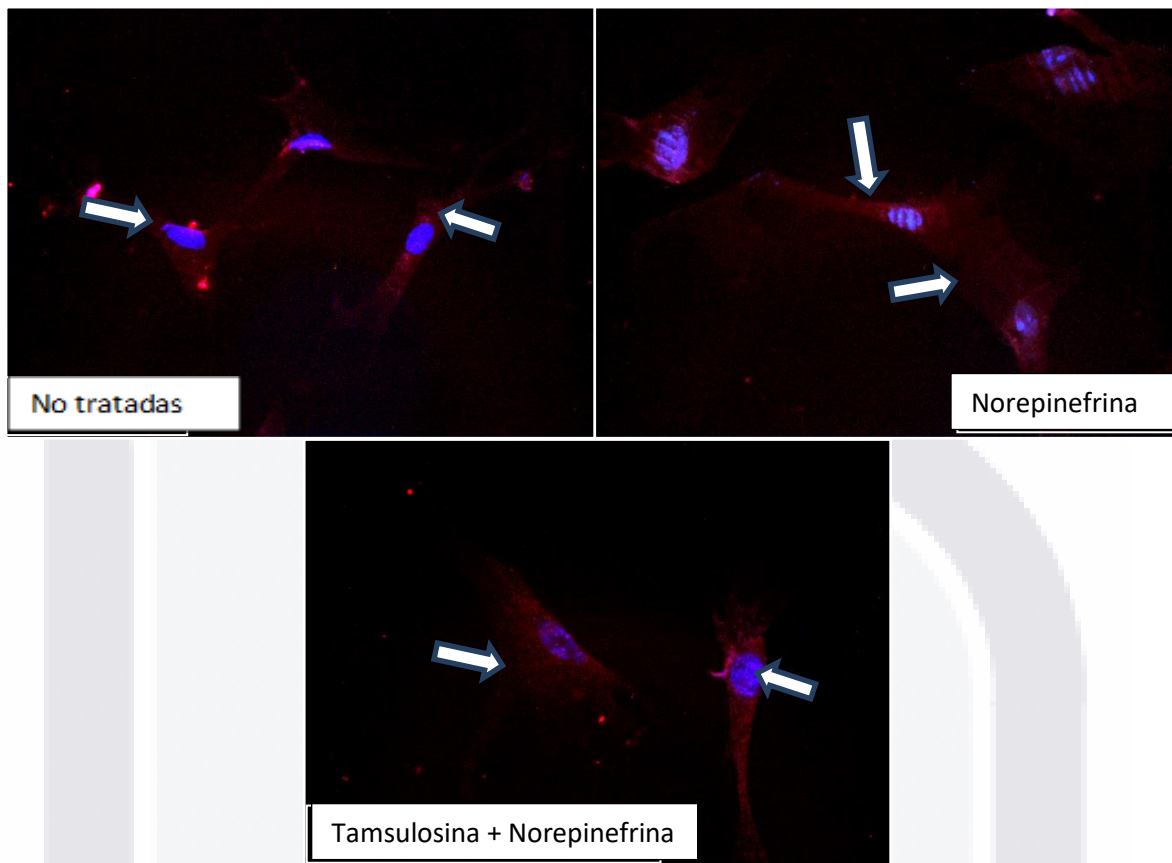


Figura 18.- Al día 7 de la extracción, las CEH en los diferentes grupos comparten características, ya que en este día no existe una diferencia en base a la estimulación o bloqueo por el agonista o antagonista (Norepinefrina y Tamsulosina respectivamente). De color azul se muestran los núcleos y de color rojo el citoplasma de la célula, señaladas con las flechas blancas.

En el día 7 de la interacción con los tratamientos, las células muestran una morfología de estrella, forma fibroblástica, lo cual indica la activación de las células además de una proliferación. El grupo con Tamsulosina + Norepinefrina, muestra activación desde la observación de la inmunofluorescencia y una disminución de la proliferación desde lo observado en el análisis de proliferación, debido al bloqueo o una activación tardía de las CEH.



CAPITULO 3

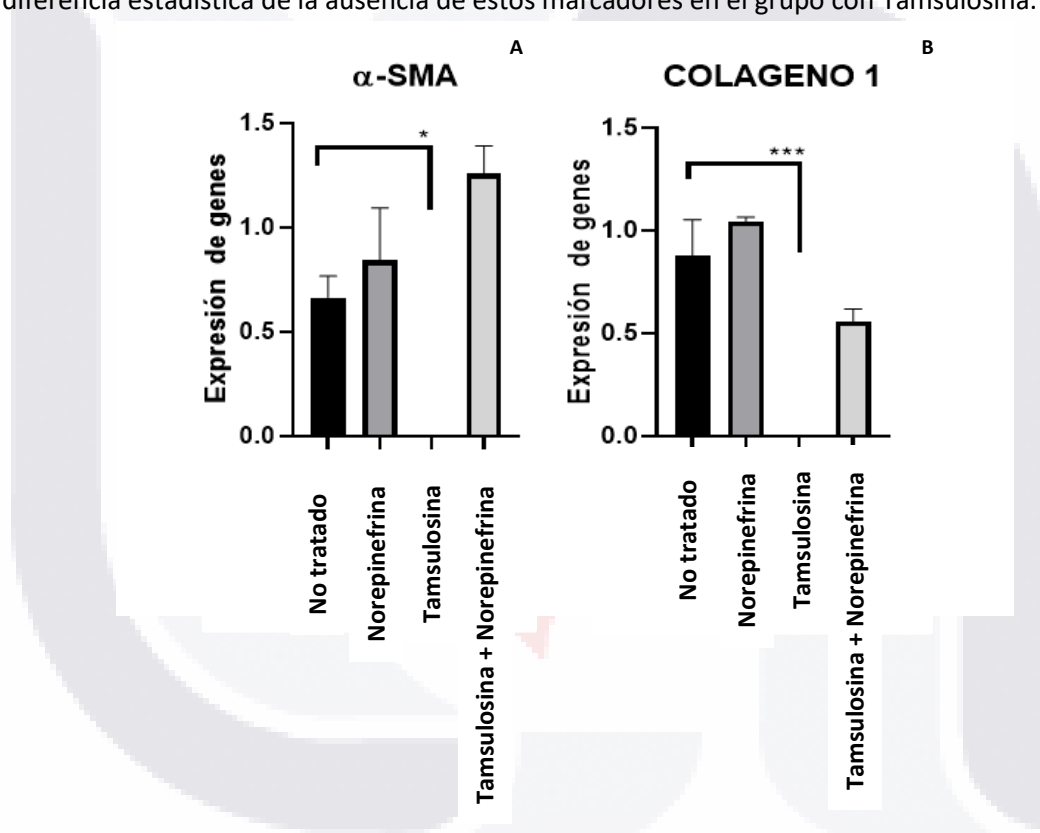
Evaluación de marcadores
moleculares en los días 3 y 7 de
activación.



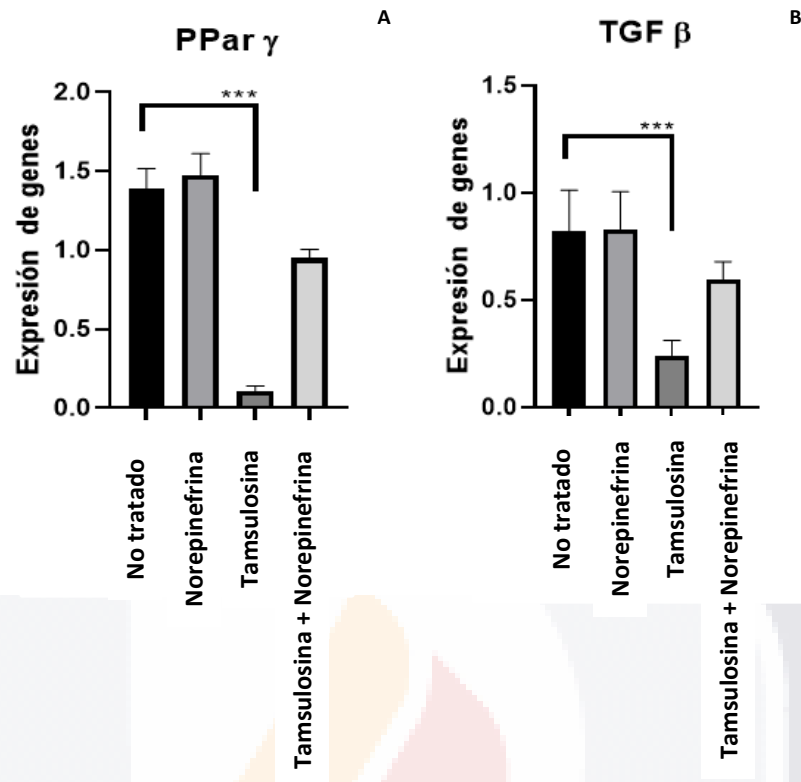
Expresión de genes fibrogénicos a los 3 días de extracción (qPCR), análisis en CEH en estado quiescente

Los análisis moleculares complementan las técnicas anteriormente mostradas, lo cual permite conocer el comportamiento de la expresión génica al pasar los días de extracción. En las gráficas siguientes se muestran los diferentes marcadores para α -SMA, colágeno, PPAR- γ y TGB- β los cuales son expresados por las CEH, los cambios de expresión de estos marcadores nos muestran el efecto de la norepinefrina en la activación, así como la Tamsulosina en la disminución de la activación.

En las gráficas 1 y 2 posteriores se observan los genes de α -SMA y Colágeno tipo 1, donde se observa la diferencia estadística de la ausencia de estos marcadores en el grupo con Tamsulosina.



Gráficas 1 y 2.- En el análisis de expresión a los 3 días de la extracción, las células presentan un leve aumento de α -SMA en el grupo Norepinefrina comparado al grupo no tratado, lo cual indica una activación de las CEH. En el grupo con Tamsulosina no se observa expresión del gen debido al bloqueo de los receptores. En el grupo de tamsulosina + Norepinefrina se puede observar una sobreexpresión del gen, debido a que se mantiene la activación generada por la Norepinefrina cuando fue colocada 1 hora después de la tamsulosina. Se puede observar la diferencia estadística en el grupo de no tratado con el grupo Tamsulosina, el cual no muestra expresión del gen, (gráficas A). En la expresión de Colágeno tipo I en el día 3. Se observa la diferencia que hay entre el grupo de No tratado con el grupo Tamsulosina, ya que no hay células que están expresando el gen, lo cual indica que no hay demasiadas células presentes o que las células están siendo bloqueadas por el fármaco, lo cual no permite la producción de colágeno (gráficas B).



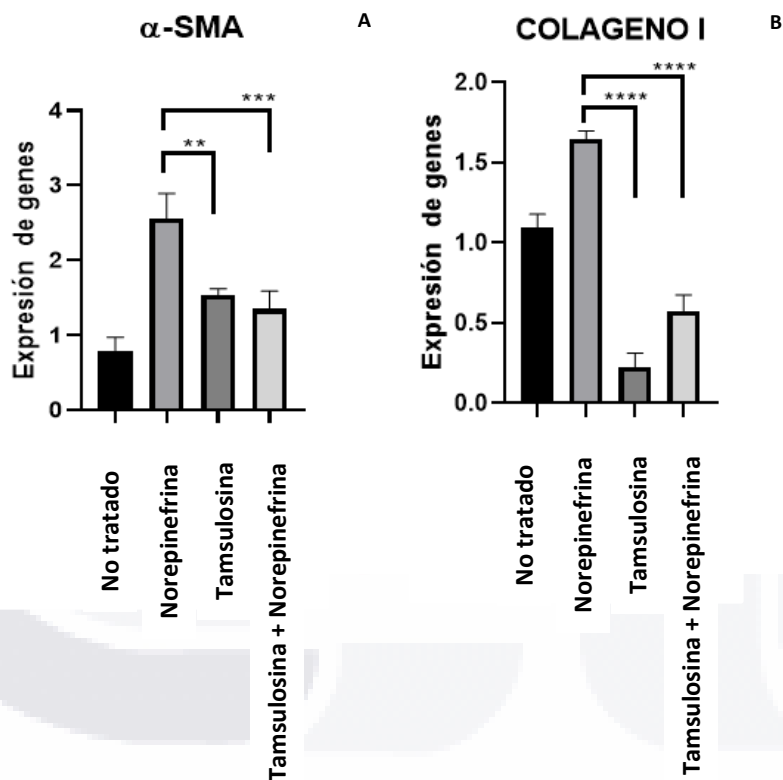
Gráficas 3 y 4.- En la expresión de PPAR γ y se presenta una disminución cuando están en estado activo, se observa una diferencia en el grupo de tamsulosina, donde hay una leve expresión en este grupo (gráficas A). La expresión del gen TGF β , es responsable de la producción de colágeno tipo I, por ello la relación con la gráfica 3, el cual muestra una disminución de producción de colágeno, relacionado con la leve expresión de TGF β (gráficas B).

Las gráficas 3 y 4, siguientes muestran los datos sobre la expresión de genes de PPAR γ y TGF- β , donde se observa en el grupo de Tamsulosina, la disminución de la expresión a comparación con el grupo No tratado, mientras que en el grupo de Tamsulosina y Norepinefrina también se ve afectado la expresión de estos genes ya que se observa una tendencia a disminuir la expresión.

La expresión de PPAR γ representa la diferenciación entre el estado quiescente y activado de las CEH. Dado que no hay tantas células presentes en el grupo de tamsulosina, este gen tiende a tener una baja expresión, no necesariamente por el estado activado de las CEH, sino por el bloqueo que existe de estos receptores provocando disminución en proliferación celular. La expresión de TGF- β está relacionado con fibrogenesis (gráficas 2: Colágeno tipo 1) lo cual se puede observar que en el grupo de Tamsulosina hay una disminución y de igual manera la expresión de colágeno, por lo cual se corrobora con el bloqueo de activación de las CEH.

Expresión de genes a los 7 días de extracción (qPCR) análisis en CEH activadas

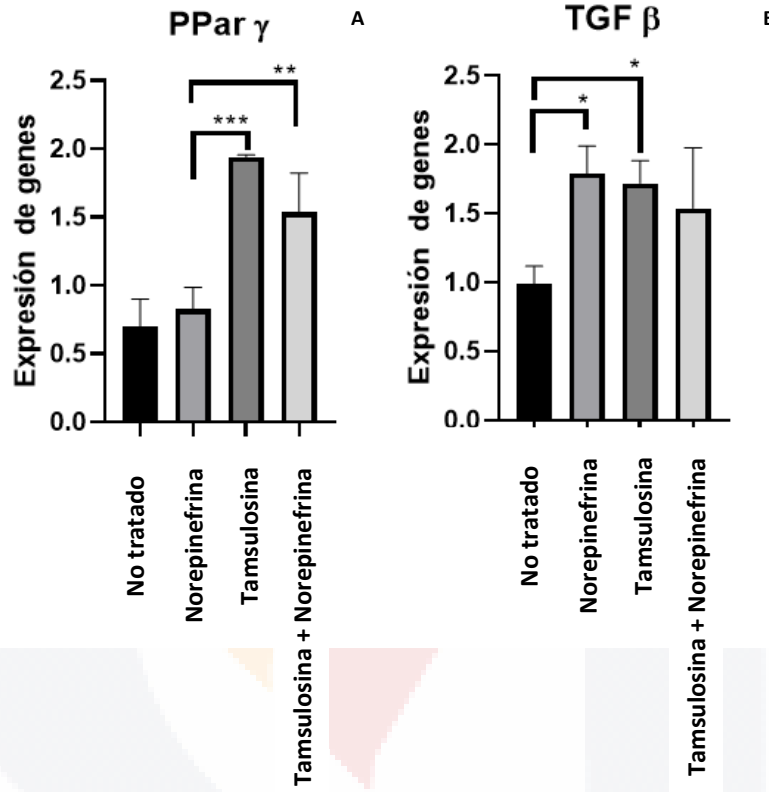
Las CEH en el día 7 de la extracción presentan un estado de activación, los genes fueron evaluados en esta etapa para conocer su nivel de expresión, así como su comportamiento. Como se observan en los siguientes diagramas, el gen de α -SMA muestra un gran incremento en su expresión, en el grupo de Norepinefrina lo cual podría indicar la activación célula. En la expresión de Colágeno tipo 1, se observa el aumento en el nivel de expresión en el grupo de Norepinefrina, al igual que lo que ocurre con el marcador α -SMA por lo tanto se deduce que es una célula activada y con alta capacidad fibrogenica. Por otro lado, en los grupos de Tamsulosina y Norepinefrina + Tamsulosina, se observa una disminución de la expresión de estos genes relacionados con la capacidad fibrogenica de la CEH.



Gráficas 5 y 6.- La expresión de α -SMA en las células, muestra el crecimiento de las células, las cuales cuando entran en activación en el día 7, generan en su citoplasma este marcador. El grupo con Norepinefrina, nos indica la gran cantidad de α -SMA presentes en las células en diferencia con el grupo no tratado (gráficas A). La expresión de Colágeno de tipo I en las CEH en el día 7, muestra una sobreexpresión de fibras colágenas dado por el grupo de Norepinefrina, a comparación con el grupo con Tamsulosina donde se observa la disminución de este marcador debido a que estas células no entrarían en un estado de activación por el bloqueo de receptores $\alpha 1$ adrenérgicos y no provoca la producción de fibras colágenas (gráficas B).

Dado a los 7 días de extracción de las CEH, se observa la expresión de α -SMA en los todos los grupos ya que son células activadas, teniendo diferencias significativas en los grupos de Tamsulosina y

Norepinefrina + Tamsulosina, ya que en estos grupos se bloqueó los receptores adrenérgicos los cuales no tuvieron una activación al mismo momento que los otros dos grupos (No tratado y Norepinefrina). De igual manera la gráfica b, representando la expresión de colágeno tipo 1 donde se observa una disminución de la fibrogenesis dada por las CEH, debido al bloqueo provocado por Tamsulosina.

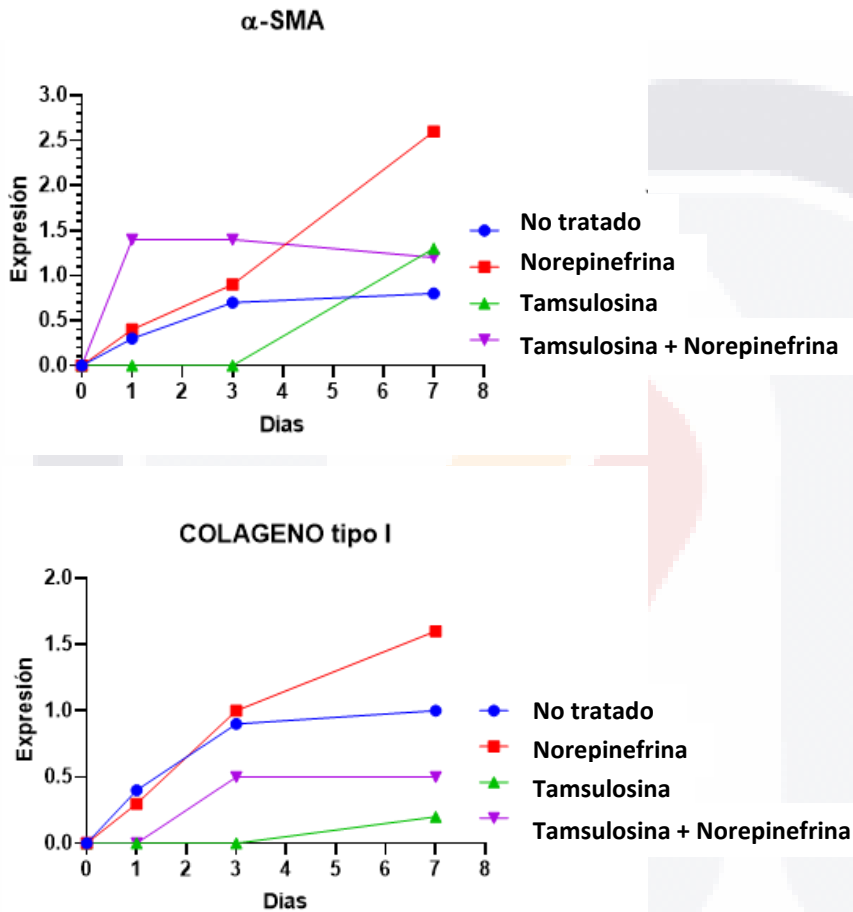


Gráficas 7 y 8.- Expresión de genes PPAR γ y TGF- β . PPAR γ es utilizado para determinar el estado de las células en estudio, este es expresado en células quiescentes. Por lo que se observa en el grupo con Noradrenalina es que no hay expresión como en el grupo no tratado (gráficas A). TGF β es una citocina profibrogénica. El marcador TGF- β es expresado en el grupo con Norepinefrina de las CEH en estado de activación en el día 7, indica una sobre expresión de este marcador, teniendo diferencias significativas por los demás grupos (gráficas B).

La expresión de PPAR γ en el día 7 de extracción se observa una relación directa con la actina de musculo liso α -SMA, cuando en el grupo de Tamsulosina y Tamsulosina + Norepinefrina se da un aumento significativo en la expresión de PPAR se trata de células quiescentes, por lo tanto, concuerda con la expresión de α -SMA en la cual hay una expresión baja en relación con el grupo de NE (gráficas A) donde la expresión de PPAR γ disminuye y aumenta la expresión de α -SMA. La expresión de TGF- β se relaciona con la expresión de colágeno tipo I. En el grupo tratado con Norepinefrina se aumenta la expresión de ambos marcadores, mientras que las células tratadas con

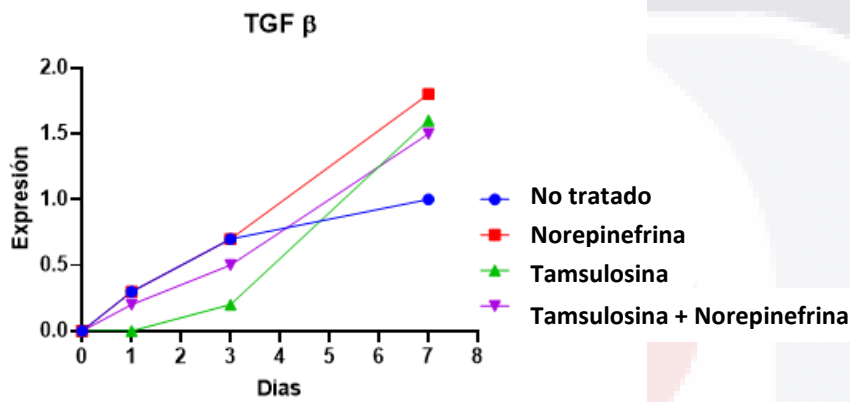
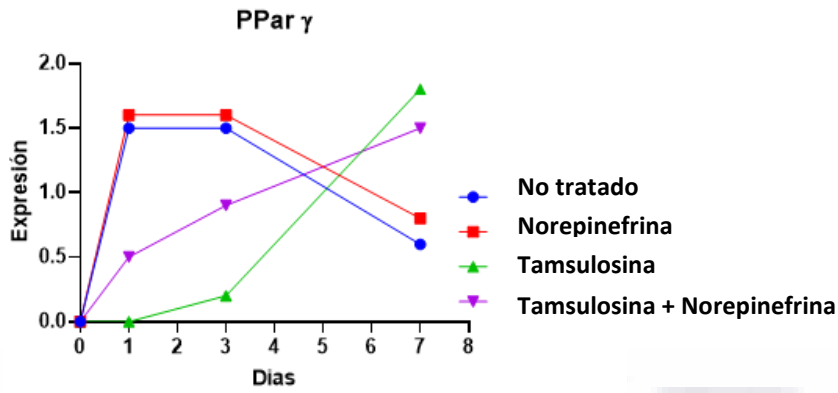
Tamsulosina se disminuye la expresión de colágeno, en la gráfica 8 se observa que no hay una suficiente expresión de este marcador fibrogenico para los grupos tratados con tamsulosina (gráficas B).

Cinética de cambios en la expresión de α -SMA, colágeno tipo 1, PPAR γ y TGF β desde un estado quiescente a un estado activado.



Gráficas 9 y 10.- Las gráficas anteriores se observa el crecimiento o disminución de los genes en los grupos al pasar de los días, donde es notorio el grupo de Norepinefrina en ambos genes tiene un aumento en el día 7, a comparación del grupo no tratado o el grupo con Tamsulosina donde tienen una expresión disminuida a los demás grupos.

Las observaciones obtenidas a partir de estas gráficas 9 y 10, es para la identificación del aumento o disminución en la expresión de los genes evaluados de las CEH evaluados durante los días posteriores de extracción, donde los cambios fueron entre el día 3 y 7, la presencia de estos marcadores en las CEH nos ayuda al monitoreo del comportamiento sobre el nivel de activación en las CEH después de la interacción con tamsulosina.



Gráficas 11 y 12.- Los genes PPAR γ y TGF- β , expresados al pasar de los días 1-7 tuvo diferentes niveles de expresión, el grupo de Norepinefrina en el día 3 aumenta PPAR y decrece al día 7, al contrario, lo que pasa en TGF- β , el cual tiene un gran aumento en el día 7. al CONTRARIO, lo que pasa en el grupo de Tamsulosina y Tamsulosina + Norepinefrina, el cual PPAR γ tiene una leve expresión en el día 3 y al día 7 presenta una alta expresión al día 7, y la expresión de TGF β se comparta de igual manera en todos los grupos.

Discusión

Las células estrelladas hepáticas (CEH) y las células ovaladas hepáticas (OC) son tipos de células importantes en la reparación del hígado. Las células ovaladas hepáticas CD90+ son células madre hepáticas encargadas de reparar el parénquima hepático ante agresiones principalmente agudas o subagudas. Por otra parte, las CEH son las principales células fibrogénicas del hígado, se activan por una lesión hepática de cualquier causa para pasar de un fenotipo miofibroblástico inactivo a uno activado. Este fenotipo miofibroblástico es proliferativo, expresa alfa actina de músculo liso (α -SMA) y sintetiza proteínas de matriz fibrogénica que se acumulan durante la cirrosis (Friedman, 2000). Las CEH miofibroblásticas activadas también son contráctiles y, por lo tanto, pueden contribuir a la patogénesis de la hipertensión portal (Reynaert et al., 2002).

Con base a lo anterior, se ha puesto principal atención en las CEH, ya que mediante su estudio *in vitro* genera conocimiento tanto de su fisiología como de posibles terapias para disminuir su actividad durante la fibrosis hepática. Para esto inicialmente se trabajó en la extracción y purificación de las células estelares hepáticas, para estandarizar un protocolo de cultivo primario de células hepáticas modificado de *Moran E. Salvador 2008*, el cual fue desarrollado como objetivo de obtener específicamente CEH. Estas células se encuentran de un 6 a un 8% de la población hepática, tienen una morfología amorfa y al pasar los días post-extracción sufren una activación espontánea caracterizada por una morfología típica de estrella, aumenta su capacidad proliferativa, así mismo aumenta la expresión de alfa actina de músculo liso, citosinas quimiotácticas y la producción de fibras colágenas (*Serna-Salas et al, 2022*)

Algunas características significativas de las CEH son su tamaño y forma en los primeros días de extracción, en la se encuentra en estado quiescente, la célula posee una gran cantidad de Vitamina A, (*M. Sarem et al, en 2006*), lo cual comprobamos mediante análisis por técnica de Rojo Oleoso, el cual nos reveló la pérdida de Vitamina A al pasar de los días de establecer el cultivo primario de CEH, indicando el proceso de activación espontánea. Debido a un estímulo exógenos, principalmente relacionado con daño al parénquima hepático las CEH entran en estado de activación donde pierden el contenido de vitamina A y desarrollan otras características y funciones (Friedman SL, 1999)

Las características morfológicas relacionadas a un estado quiescente fueron observadas en los primeros 3 días de la extracción (figuras 6, día 1-3), las características más detalladas de estas células fueron al día 7 (figuras 7, día 4-6), en donde se identificaron sus cambios relacionados a la activación espontánea que sufren estas células, "todas estas alteraciones provocan en las CEH importantes cambios en la expresión genética que generan una serie de modificaciones fenotípicas que les permiten responder a los crecientes estímulos patológicos" (*Sarem et al, en 2006*), mismas modificaciones fenotípicas mostradas en esta

investigación. En la cinética de microscopia de contraste de fases, se pueden observar el seguimiento de cambios morfológicos y proliferación durante la activación de las células.

La membrana celular de las CEH posee varios tipos de receptores, los cuales son estimulados para activarse en diferentes procesos, un ejemplo de estos receptores son los adrenérgicos ya que se conoce que esta célula es de naturaleza neuroendocrina, por lo tanto, su activación mediante catecolaminas propicia a un aumento en la proliferación celular y a la fibrogénesis. “La fibrogénesis hepática se define como un complejo y dinámico proceso fisiopatológico caracterizado por el depósito de tejido fibroso en el hígado como consecuencia de un desequilibrio entre la producción y la degradación de los componentes de la MEC en respuesta a varias agresiones repetitivas o crónicas de intensidades suficientes para conducir a este proceso de cicatrización” (*M. Sarem et al, en 2006*), acerca de esta patología y su causa debido a un desequilibrio y una desregularización de matriz extracelular dado por la sobre activación de las CEH.

Los receptores adrenérgicos específicamente los α_1 , identificados por *Oben & Mae., en 2004*, son activados cuando existen estímulos por neurotransmisores del tipo adrenérgico. Estos receptores pueden ser bloqueados por adrenobloqueantes, los cuales pueden inhibir vías de señalización, “los adrenobloqueantes (doxazosina y carvedilol) mejoraron el proceso de reversión de la cirrosis hepática y regeneración celular” (*Serna Salas en 2018*), además resalta de que los adrenobloqueadores mejoraron la función hepática y redujeron la cantidad de tejido fibrótico.

“La tamsulosina es un fármaco antagonista potente y selectivo α_1 de los receptores adrenérgicos”, (*Hiroshi Matsushima en 1999*), por lo que podría generar bloqueo en receptores para inhibir la activación de las CEH. En nuestros experimentos el estímulo adrenérgico que se utilizó fue Norepinefrina donde se observó un incremento en la proliferación de las CEH. “El efecto de la Norepinefrina en la proliferación de CEH estuvo mediado principalmente por α -adrenoceptores, ya que se ha reportado que la prazosina (antagonista de receptores α -adrenoceptor) inhibió significativamente la proliferación de las CEH” (*Sigala B. en 2013*). Norepinefrina indujo una mejora bifásica dependiente de la dosis ya que genero la proliferación y activación de las CEH con un efecto máximo a 10 nM inducida por Norepinefrina”.

Por otra parte, el tratamiento con Tamsulosina en las CEH al tercer día no se detectó la expresión de α -SMA, a comparación del tratamiento con Norepinefrina que tienen una expresión más alta que el grupo no tratado, demostrando con esto que la vía adrenérgica posiblemente tiene un papel importante en la activación temprana de las CEH.

Las CEH en estado quiescente contienen gran cantidad de Vitamina A en su interior cuando se activan la pierden, en las imágenes de la tinción de Rojo Oleoso se puede observar la pérdida de Vitamina A, se puede ver en el día 3 como hay pérdida de Vitamina A por la Norepinefrina la cual causa activación temprana de las CEH, en el día 7 podemos ver una activación completa ya que no se encuentra reacción citoquímica para el rojo oleoso (figura 13).

La Norepinefrina aumentó significativamente el colágeno 1 en expresión génica, a concentraciones superiores a 10 nM. La expresión inducida por Norepinefrina es similar a la generada por TGF- β , el cual es una citosina pro-fibrogénica por excelencia donde a una concentración de 2.5 ng/ml aumento la expresión de colágeno (*Sigala B en 2013*), mostrando similitud en nuestros resultados obtenidos ya que, en el grupo de Norepinefrina, muestra una mayor expresión de colágeno tipo 1 como se observa en la gráfica 2 en el día 3 y en la gráfica 6 en el día 7. La expresión de colágeno tipo 1 en el día 7 es similar a la expresión de α -SMA, cuando las CEH fueron tratadas con Norepinefrina. En comparación con el grupo Tamsulosina + Norepinefrina que tiene una tendencia a la baja en la expresión de α -SMA y colágeno corroborando lo observado en la disminución en la proliferación (*gráficas 7*).

En la gráfica de TGF- β al día 7 (*gráfica 8*), podemos observar como el grupo de Tamsulosina, tiene un incremento, las células están presentando una expresión, pero como se observa en la gráfica de colágeno tipo 1 (*gráficas 6*), la expresión no es afectada y tiene una leve presencia de este gen. A su vez la expresión del grupo Tamsulosina + Norepinefrina se ve debajo del grupo no tratado y Norepinefrina. Esto es confirmado en las gráficas de cinética de tiempo donde se observa la activación temprana al día 3 en el grupo no tratado, y una sobre expresión del grupo con Norepinefrina (*gráficas 12*).

Se observó mediante inmunofluorescencia la expresión de SMA, por la activación con Norepinefrina, lo cual se obtuvo una activación temprana de las CEH (figura 17-18). “La Norepinefrina es capaz de activar CEH a través de receptores α_1 , mediante la evaluación de la línea celular LX2” *Xia-Hui Lin en 2020*. Pudimos comprobar con la técnica de inmunofluorescencia donde se ve la expresión de la proteína α -SMA, de igual manera como lo menciona el autor. “El tratamiento con NE activó las CEH, como lo indica el aumento de la expresión de ARNm y proteínas de α -SMA y Colágeno tipo 1 (signos primarios de activación de las CEH), y una mayor proliferación celular”.

Conclusión:

Dado al conocimiento de saber cómo es la estimulación de las células mediante estos receptores y como la CEH es la principal célula responsable de la fibrogenesis. El bloqueo de estos receptores mediante la Tamsulosina fue importante para darle una pausa a la activación celular y a la fibrogenesis.

En los resultados e imágenes de la técnica de rojo oleoso, se pudo observar cómo existe el bloqueo de los receptores adrenérgicos ya que con ayuda del fármaco Tamsulosina no se presentan cambios morfológicos, es decir que no hay pérdida de Vitamina A y por ende las células se encuentran en estado quiescente. A comparación de las imágenes donde se presenta la activación temprana de las células debido al estímulo dado por Norepinefrina.

El efecto de la Tamsulosina como antagonista de los receptores adrenérgicos se observó que las CEH no tuvieron una activación por la Norepinefrina. En la técnica de Rojo Oleoso y de inmunofluorescencia donde hubo esa interacción con agonista y antagonista, se observó el bloqueo que existe, provocando una lenta o nula activación propia de las células.

Dado al bloqueo de los receptores adrenérgicos de las CEH se detuvieron procesos de activación los cuales promueven vías moleculares los cuales generan procesos de fibrogénesis, el cual es un proceso precursor de cirrosis hepática. La Tamsulosina bloquea los receptores $\alpha 1$ de las CEH, para pausar o retrasar procesos moleculares de síntesis de fibras colágenas provocando cirrosis hepática, gracias al antagonista alfa-adrenérgico.

Bibliografía

- Agencia española con medicamentos y productos sanitarios (AEMPS). (2019) Ficha Técnica Tamsulosina. Aurovitas Spain, S.A.U. 28036 Madrid, España.
- Alejandra G. Miranda-Díaz, et al. (2010) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 levels among patients suffering a bile duct injury during cholecystectomy. *Rev Med Chile* 2010; 138: 1259-1263. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872010001100008>.
- Batista, A. J. (2018). *La multifuncional célula estrellada del hígado y su papel en la fibrosis hepática. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas [Internet]. Disponible en: <http://www.revibiomedica.sld.cu/index.php/ibi/article/view/138>*
- Calzada, B. C., & Artiñano, A. A. (2003). *Distribución y función de los receptores alfaadrenérgicos del músculo liso vascular*. Madrid, España: Hipertensión.
- Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. (1996) Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*; 274:1379–1383. [PubMed: 8910279]
- Friedman SL. 2000. Regulación molecular de la fibrosis hepática, una respuesta celular rallada a la lesión tisular. *J Biol Chem* 275: 2247-2250.
- Fu, M., Wang, C., Zhang, X., and Pestell, R. G. (2004). Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 68, 1199-1208.
- Gabele E, Brenner DA, Rippe RA. (2003) Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci*;8:D69-77.
- Galli A, Crab D, Price D, Ceni E, Salzano R, Surrenti C, (2000) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Transcriptional Regulation Is Involved in Platelet-Derived Growth Factor-Induced Proliferation of Human Hepatic Stellate Cells. *Hepatology*, 31:101-108.
- George K. Michalopoulos. (2007) Liver Regeneration. Department of Pathology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania.
- Guido M, Rugge M, Leandro G. (1997). Hepatic stellate cell immunodetection and cirrhotic evolution of viral hepatitis in liver allografts. *Hepatology* vol. 26, no. 2
- Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. (2007) PPARgamma in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta* 1771: 999-1013.
- Hernández Nazar, Z. H., Martínez López, E., & Domínguez Rosales, J. A. (2005). *Mecanismos moleculares de la regulación transcripcional de colágena (I) por las células estelares hepáticas*. Guadalajara, México: Centro Universitario de Ciencias de la Salud.
- Jiménez-Andrade G y Espinosa C. (2011). Inflamación y angiogénesis: el papel facilitador de las células cebadas en el desarrollo del melanoma. *Medigraphic*;6 (235): 111- 9.4.

- Jorge H. Altamirano, Jose L. Cacharrón, Guillermo Hernandez, Virginia Altamirano. (s.f.) Antagonistas de los receptores alfa adrenérgicos bloqueantes selectivos alfa 1 adrenérgicos. Cap. 114.
- Kei Mizuno. 2017. Autonomic Nervous System and the Liver. Doi: 10.1111. Depart of Gastroenterology, Yamagata University Faculty of Medicine and Crest, Yamagata, Japan.
- Krishna, M. (2013). *Anatomía microscópica del hígado*. Jacksonville, FL, EE. UU: Clinical Liver Disease. La Habana, Cuba.: Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.
- Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 618-33.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Integrating cells into tissues. In: Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. eds. (2000) *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman and company publishers, New York, USA. 968-1002.
- M.J. Czaja. (2001). TNF toxicity-death from caspase or cathepsin, that is the question. *Hepatology*, 34 pp. 844-846.
- Max G. Bachem, K.-M. S. (1993). *Tumor necrosis factor alpha (TNF) and transforming growth factor B1 (TGFB1) stimulate fibronectin synthesis and the transdifferentiation of fat-storing cells in the rat liver into myofibroblasts*. Marburg, Germany: Philipps-University.
- Moran E. Salvador; 2008, Papel Del Receptor Nuclear PPARγ En La Inflamación Y La Esteatosis Hepática. Programa de Doctorado en Biomedicina, Facultad de Medicina. Madrid, España.
- Northemann W, Hattori M, Baffet G, Braciak TA, Fletcher RG, Abraham LJ, Gauldie J, Baumann M, Fey GH. (1990) Production of interleukin 6 by hepatoma cells. *Mol Biol Med*; 7:273–285. [PubMed: 1699111]
- Oben, J. A., & Mae., D. A. (2004). *Sympathetic Nervous System Regulation of Liver Repair*. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004 Sep;280(1):874-83. doi: 10.1002/ar.a.20081. PMID: 15382023.
- P. Angulo. (2002) Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*, 346pp. 1221-1231.
- Park, C.-W., & Kim, J.-Y. (2012). *Preparación y en vivo evaluación de micropartículas de liberación controlada de tipo matriz secadas por aspersión de clorhidrato de tamsulosina para tabletas de desintegración oral*. Republica de Corea: Informa Healthcare USA.
- Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. 2002. Hepático células estrelladas: papel en la microcirculación y fisiopatología de la hipertensión portal. *Gut* 50: 571–581.
- Rjkind M, Giambone MA, Biempica L. (1979) Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology*,76:710-719.
- Rocío Alcántara-Hernández y Aurelio Hernández-Méndez, (2018). "Complejos moleculares de la señalización adrenérgica" *Gac. Med. Mex.* 154:223-235. DOI://dx.doi.org/10.24875/GMM.18002390

- Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. (2008) Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 40: 1461-5.
- Sarem M, et al. (2006). *Las células estrelladas del hígado: su importancia en condiciones normales y patológicas*. Buenos Aires. Argentina. Gastroenterol Hepatol.
- Serna-Salas, S. A.-G.-O. (2018). *El tratamiento con doxazosina y carvedilol mejora la regeneración hepática en un modelo de cirrosis de hámster*. Aguascalientes, Mexico. BioMed Research International.
- Sigala B, McKee C, Soeda J, Pazienza V, Morgan M, et al. (2013) Las catecolaminas del sistema nervioso simpático y los neurotransmisores del neuropéptido Y están regulados al alza en NAFLD humano y modulan la función fibrogénica de las células estrelladas hepáticas. *PLoS ONE* 8(9): e72928. doi:10.1371/journal.pone.0072928
- Soeishi, H. M. (1999). *Plasma protein binding of tamsulosin hydrochloride in renal disease: role of α 1-acid glycoprotein and possibility of binding interactions*. Hitachinaka, Japon: Eur J Clin Pharmacol.
- Toda K, Kumagai N, Tsuchimoto K, Inagaki H, Suzuki T, Oishi T, et al. (2000) Induction of hepatic stellate cell proliferation by LPS-stimulated peripheral blood mononuclear cells from patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol.*; 35: 214-20.
- Vega-Rivera, N. M., & López-Rubalcava, C. (2013). *Interacción estrógenos-noradrenalina en la depresión*. Mexico: Salud Mental.
- Xia-Hui Lin, H.-H. L. (2020). *Las HSC estimuladas con norepinefrina secretan sFRP1 para promover la progresión del HCC después del estrés crónico mediante el aumento de un circuito de retroalimentación positiva de Wnt16B / β -catenina*. Shanghai, China: Revista de investigación clínica y experimental del cáncer.

Apéndice A

Protocolo para Obtención de Células Estelares Hepáticas.

Preparación

- 1.- Preparación de todos los buffers en tiempo. Usar autoclave para los botes y filtros para todos los buffers.
- 2.- Pesar todo para la Pronasa (40mg), Colagenasa (30mg), DNAsa (8mg), digestión y Solución de Nycodenz.
- 3.- Usar el Autoclave para las siguientes cosas: Tijeras, pinzas. Mantener a 70°C.
- 4.- Baño de agua de 37°C.
- 5.- Poner el medio, suero y el antibiótico en el baño de agua.
- 6.- Preparar el SC-1 (NaCl 137mM, KCl 5.4mM, Hepes 10mM, NaHCO₃ 4.2mM, EGTA 0.5mM, Glucosa 5mM, NaH₂PO₄ 0.6mM, Na₂HPO₄ 0.8mM), Colagenasa, Pronasa, DNAsa I, SC-2 (NaCl 137mM, KCl 5.4mM, Hepes 10mM, NaHCO₃ 4.2mM, CaCl₂ 3.8mM, Glucosa 5mM, NaH₂PO₄ 0.6mM, Na₂HPO₄ 0.8mM), y un vaso de precipitado con barra de agitación.
- 7.- Calentar todos los buffers en el baño de agua.
- 8.- Esterilizar los aparatos 3 veces con alcohol desnaturalizado 70°C
- 9.- Limpiar los aparatos 3 veces con agua desionizada.
- 10.- Tener listo el equipo de cirugía incluyendo cinta, etanol y jeringa con ketamina/medetomidina o pentobarbital y aguja con heparina.
- 11.- Llenar el sistema de tuberías con SC-1.

Aislamiento de células estelares de Hígado

- 1.- Anestesiarse la rata con Pentobarbital. Estar seguro sobre la anestesia de la rata, pesándola y anestesiarse acorde la concentración.
- 2.- Inmovilizar rata en la tabla.

- 3.- Lavar el abdomen de la rata con Etanol.
- 4.- Abrir la cavidad abdominal.
- 5.- Inyectar solución recién preparada de heparina en el bazo.
- 6.- Exponer la vena porta
- 7.- Canular la vena porta y preparar la jeringa
- 8.- Cortar la vena cava inferior y empezar a bombear.
- 9.- Irrigar el hígado con 150ml SC-1 para limpiar la sangre.
- 10.- Mientras tanto preparar la pronasa, colagenasa en solución de digestión.
- 11.- Irrigar el hígado con 150ml de solución de pronasa.
- 12.- Irrigar el hígado con 150ml de solución de colagenasa.
- 13.- Apagar la bomba
- 14.- Remover el hígado del animal
- 15.- Transferir el hígado a un vaso estéril con 100ml SC-2 y una barra de agitación estéril.
- 16.- Añadir 20ml de solución de digestión.
- 17.- Limpiar el sistema de perfusión con agua desionizada.
- 18.- Homogenizar el hígado con las pinzas
- 19.- Incubar el hígado a 37°C durante 20min y durante esto agregar 1 gota de 1M NaOH cada 2 minutos (6 veces), después cada 5 min (2 veces)
- 20.- Filtrar la suspensión sobre 100 filtro Mesh dentro de 4 tubos de 50ml y llenar hasta 50ml con SC-2 y agregar .2ml ADNasa a cada tubo.
- 21.- Centrifugar las células en suspensión en 63rev durante 2min en 4°C.
- 22.- Recolectar el sobrenadante y agregar 20ml con SC-2 y re suspender el pelet.
- 23.- Centrifugar el pelet 63rev por 2minutos a 4°C

24.- Recolectar el sobrenadante

25.- Centrifugar el sobrenadante del paso 22 y 24 con 500rev por 10min a 4°C

26.- Remover el sobrenadante, re suspender el pelet en 5ml GBSS-b (Solución B) y añadir .1ml de solución de ADNasa para cada tubo.

27.- Mezclar la suspensión de células en un vaso de precipitado. 28.- Filtrar la solución de Nycodenz y agregarla.

29.- Agregar el GBSS-B (Solución B) para un volumen total de 100ml. Obteniendo 13% w/v de solución Nycodenz

30.- Dividir la solución de las células en 8 tubos de 15ml. ($100/8=12.5$ ml por tubo)

31.- Con cuidado agregar 1ml de GBSS-B (Solución B) en la parte superior de cada suspensión de células sin dejar que las capas se mezclen.

32.- Centrifugar la suspensión de células con 1500rev por 15min a 4°C sin frenar.

33.- Recolectar las capas blancas de la interface entre las soluciones Nycodenz y GBSS-B (Solución B) usando una pipeta pasteur. (2ml por 15ml de los tubos)

34.- Reunir las capas blancas en 1 tubo de 50ml.

35.- Agregar GBSS-B (Solución B) para tener un volumen total de 40ml.

36.- Centrifugar la suspensión de células con 500rev por 10minutos a 4°C.

37.- Remover el sobrenadante y re suspender el pelet en 1ml de medio de cultivo.

38.- Se colocó el 1ml en un flask T75 para dejarlo en la incubadora a 37°C para su proliferación y crecimiento.

Apéndice B

Protocolo MTT

Basado en el protocolo de Mosmann 1983, La Fontaine et al 1998, Southon et al 2004.

Considerar antes:

- Preparar stock de 5 mg/10mL de MTT con PBS 1X estéril (pH 7.4).
- Preparar medio de cultivo suplementado con 0.5 mg/mL de MTT a partir del stock anterior (1:10).
- La solución con alcohol ácido se prepara inmediatamente antes de usar.

En placas de 96 pozos

1. Terminados los tiempos con los tratamientos a evaluar, se retira el medio de cultivo con micropipeta inclinando para absorber la mayor cantidad posible.
2. Se agregan 200 μ L de medio de cultivo con MTT y se incuba (37°C) por 4 horas.
3. Se retira el medio de cultivo como en el paso 1 procurando que no le dé la luz del sol.
4. Se agregan 150 μ L de alcohol ácido y reposa por 30 min aproximadamente en agitador orbital a 200 rpm.
5. Una vez que se disolvieron totalmente los cristales, leer a una longitud de onda de 595 nm con un filtro de referencia de 655 nm.

Notas

- MTT es estable en PBS a -20°C alrededor de 6 meses en obscuridad (Envolver en papel aluminio). No se recomienda almacenar a 4°C más de 1 mes. Se prepara disolviendo con 1 mL de PBS 1X por cada 5 mg de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT; Sigma, M5655).
- Cristales de formazán son inestables con la luz del sol, por lo que debe protegerse la microplaca con papel aluminio.
- Para preparar el alcohol ácido se utilizó una solución de isopropanol 0.01 N de HCl (puede ser de 0.004 a 0.1) a partir de 1 N de HCl.

30 mL Solución = 0.3 mL HCl 1 N + 29.7 mL Isopropanol

- Si los cristales tardan mucho en disolverse puede reducir el tiempo de incubación con MTT.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Puede disolver cristales con protocolo de Tada et al 1986: Usa solución de SDS 10% w/v y HCl 0.01 N o DMSO.

Cultivo en placas de 96 pozos

Con los primeros pases celulares (el 3° o 4°) se inocula cada pozo con una cantidad de 10,000 células/pozo contadas previamente con el método de Neubauer y se dejan crecer 24 hrs para que formen la monocapa.

Posteriormente se intercambia el medio de cultivo por el que tiene el fármaco y empieza a contar el tiempo de la cinética.

Con pases celulares más viejos se deben dejar más tiempo las células para que formen la monocapa en toda la base.

Apéndice C

Inmunofluorescencia:

- Retirar el medio DMEM de la placa con mucho cuidado
- Lavar 2 veces con PBS 1x hasta que cubra el pozo
- Fijar las células con PFA 4% por 15 min - Ya se puede hacer fuera de la campana
- Lavar 2 veces con PBS 1x
- Permeabilizar las células con PBS 1X-Tritón X-100 0.1% por 15 min en hielo (refrigerador)
- Lavar 3 veces con PBS
- OPCIONAL: incubar con 300 µl de glicina 100 mM por 20 minutos a temperatura ambiente para eliminar la autofluorescencia.

- Incubar con buffer de bloqueo 1 hr (300 μ l de suero fetal bovino al 10% en PBS 1X-Tritón X-100 0.1%)

- Agregar anticuerpo primario α -SMA de ratón (Numero de catalogo: A5228-200UL) diluido en solución de bloqueo (PBS 1X-Tritón X-100 0.1%- BSA 1% e incubar durante toda la noche a 4°C)

- Lavar con PBS 1x por 5 min (3 veces)

- Incubar con el segundo anticuerpo Alexa Dylight 633 (Numero de catalogo: NBP1-75964) en oscuridad por 1 hora en la cámara húmeda a 4°C

- Lavar con PBS 1x por 5 min (3 veces)

- Contratinción con solución de Hoechst 33342 (Numero de catalogo: 62249) por 10 min (1:1000 en PBS1x)

- Lavar con PBS 1x por 5 min (3 veces)

- Colocar 1 gota de glicerol y sellar los bordes con esmalte transparente.

