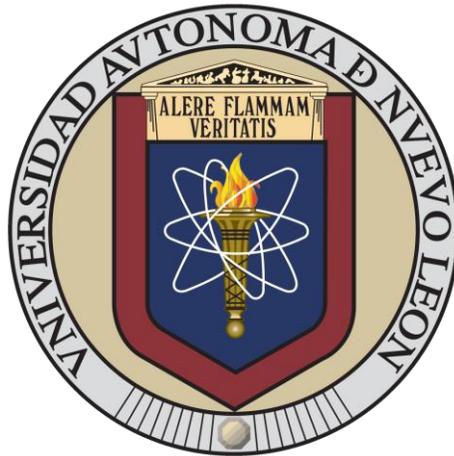


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DE ALFA Y BETA ADRENOBLOQUEADORES COMO AGENTES
ANTIFIBRÓTICOS Y HEPATOPROTECTORES EN UN MODELO DE CIRROSIS
EN RATA WISTAR**

Por

M. C. MARIANA YAZMIN MEDINA PIZAÑO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

Julio, 2025

**ANÁLISIS DE ALFA Y BETA ADRENOBLOQUEADORES COMO AGENTES
ANTIFIBRÓTICOS Y HEPATOPROTECTORES EN UN MODELO DE CIRROSIS EN
RATA WISTAR**

Comité de Tesis



Dra. C. María de Jesús Loera Arias
Directora de tesis



Dr. C. Martin Humberto Muñoz Ortega
Co-director de tesis



Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna
Miembro de la comisión



Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas
Miembro de la comisión



Dr. C. José Juan Pérez Trujillo
Miembro de la comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Sub-director de estudios de posgrado

Monterrey, Nuevo León

Julio 2025

LUGAR DE TRABAJO Y DIRECCIÓN DE TESIS

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. María de Jesús Loera Arias y en el Departamento de Morfología y Química de la Universidad Autónoma de Aguascalientes bajo la co-dirección del Dr. Martin Humberto Muñoz Ortega.



Dra. María de Jesús Loera Arias
Director de tesis



Dr. Martin Humberto Muñoz Ortega
Co-director de tesis

Monterrey, Nuevo León

Julio 2025

Por medio de la presente, me permito expresarle mi más sincero agradecimiento al **Dr. Javier Ventura Juárez** por su invaluable apoyo como asesor externo en el desarrollo de esta tesis doctoral, dentro del programa de Doctorado en Ciencias con Orientación en Morfología de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

La mayoría del trabajo experimental de esta tesis fue realizado en sus instalaciones, haciendo uso de los reactivos y equipos de su laboratorio, lo cual fue clave para la realización y el éxito del proyecto. Su guía experta, la generosa disposición de sus recursos, así como sus oportunas observaciones científicas, fueron determinantes para fortalecer la calidad del trabajo.

Apreciamos profundamente el tiempo, la dedicación y el compromiso que brindó durante todo el proceso. Su colaboración representa un valioso ejemplo de vinculación académica entre instituciones y contribuye significativamente al avance de la investigación científica en nuestra universidad.

Esperamos continuar fortaleciendo esta relación académica en futuras oportunidades. Reciba nuestro más sincero reconocimiento y gratitud.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora y codirector de tesis, Dra. María de Jesús Loera Arias y Dr. Martin Humberto Muñoz Ortega, por su invaluable apoyo y guía a lo largo de este proceso de investigación. Al doctor Dr. Javier Ventura Juárez, por su dedicación, paciencia y conocimiento me han permitido crecer tanto académica como profesionalmente.

También quiero agradecer a mi comisión de tesis la Dra. Odila Saucedo Cárdenas, Dr. Roberto Montes de Oca Luna y a la Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña, Dr. Andrés Quintanar Stephano y Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino gracias por brindarme su tiempo, laboratorio y su orientación me han sido fundamentales para la culminación de este proyecto.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a mis amigos y compañeros de laboratorio Dany, Niccy Bety, Ana, Leonel, Farah, Ulises, Gloria, Piña, Iván, Leyva, Sandra, Roberto, Alicia, Fany, Chuma, cuyo apoyo, colaboración y amistad fueron esenciales durante el desarrollo de mi tesis doctoral. Gracias por estar presentes en cada experimento, cada discusión y cada momento de duda, transformándolos en oportunidades de crecimiento personal y profesional. Esta tesis es también un reflejo de nuestra labor en conjunto, y por ello les estaré siempre profundamente agradecida.

A mis padres, por su amor incondicional, guía y apoyo constante, que me inspiraron a perseverar siempre. A mi hermano Mauricio, por su cercanía y ánimo, que hizo más llevadero cada paso de este camino.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el invaluable apoyo económico otorgado a lo largo de mis estudios de doctorado.

DEDICATORIA

A mis padres, por su amor, su ejemplo y su incansable apoyo en cada etapa de mi vida. Gracias por enseñarme a soñar y a luchar con determinación.

A Raúl, por su paciencia, comprensión y compañía incondicional. Tu amor fue mi refugio y mi fuerza en los momentos más desafiantes.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. CIRROSIS HEPÁTICA	3
2.2. CIRROSIS COMPENSADA Y DESCOMPENSADA	4
2.3. HIPERTENSIÓN PORTAL	5
2.4. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA.....	7
2.5. ETIOLOGÍA	8
2.8. RECEPTORES ADRENÉRGICOS EN CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS	11
2.9. TRATAMIENTOS CON ADRENOBLOQUEADORES EN LA CIRROSIS HEPÁTICA	12
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS	19
6. METODOLOGÍA	20
6.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
6.2. CULTIVO CELULAR	21
6.3. TRATAMIENTO CON CARVEDILOL Y TAMSULOSINA EN CÉLULAS HEPG2 Y LX-2.....	22
6.4. TINCIÓN DE SYTOX GREEN	22
6.5. ENSAYO DE VIABILIDAD CON CALCEÍNA	22
6.6. ESTIMULACIÓN DE LAS CÉLULAS LX-2 CON NOREPINEFRINA Y TGF-B1	23
6.7. ENSAYO DE VIABILIDAD MTT.....	23
6.8. TINCIÓN DE ROJO OLEOSO.....	23
6.9. INMUNOCITOFLUORESCENCIA	24
6.10. ENSAYO DE CICATRIZACIÓN DE HERIDA	24
6.11. ENSAYO DE INVASIÓN.....	25
6.12. EXPERIMENTOS CON ANIMALES	25
6.13. PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS.....	27
6.14. TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA.....	28
6.15. TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON	28
6.16. TINCIÓN ROJO SIRIO.....	28
6.17. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE MARCADORES DE FUNCIÓN HEPÁTICA	29

6.18.	EXTRACCIÓN DE ARN	29
6.19.	CUANTIFICACIÓN DE ARN TOTAL	30
6.20.	EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ARN	30
6.21.	RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN	30
6.22.	ANÁLISIS POR PCR EN TIEMPO REAL	31
6.23.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	32
6.24.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	33
6.25.	IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	33
6.27.	ACTIVIDAD LOCOMOTORA	35
6.28.	CAMPO ABIERTO.....	36
6.29.	RECONOCIMIENTO DE OBJETOS	36
6.30.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	37
7.	RESULTADOS	38
7.1.	EVALUACIÓN DE LOS A Y B ADRENOBLOQUEADORES EN LA VIABILIDAD CELULAR DE HEPG2 Y LX-2.....	38
7.2.	ESTABLECIMIENTO DEL MODELO DE ACTIVACIÓN CON NOREPINEFRINA EN LA LÍNEA CELULAR LX-2 Y EL EFECTO DE TAMSULOSINA Y CARVEDILOL	39
7.3.	LA TAMSULOSINA Y EL CARVEDILOL CONTROLAN LA ACTIVIDAD FIBROGÉNICA INDUCIDA POR NOREPINEFRINA EN LAS CÉLULAS LX-2	41
7.4.	EFECTO DE CARVEDILOL Y TAMSULOSINA SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN DE CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS.....	43
7.5.	ESTABLECIMIENTO DEL MODELO PROFILÁCTICO EN RATA WISTAR CON CO-TRATAMIENTO DE CARVEDILOL Y TAMSULOSINA	44
7.6.	ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE MODELO PROFILÁCTICO CON CO-TRATAMIENTO DE CARVEDILOL Y TAMSULOSINA	46
7.7.	MARCADORES BIOQUÍMICOS DE FUNCIÓN HEPÁTICA EN MODELO CONCOMITANTE	48
7.8.	EXPRESIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MARCADORES FIBROGÉNICOS Y HEPATOPROTECTORES.....	49
7.9.	LA TAMSULOSINA Y EL CARVEDILOL REGULAN LA PRESIÓN PORTAL Y ARTERIAL EN UN MODELO CONCOMITANTE DE FIBROSIS HEPÁTICA.	51
7.10.	REGULACIÓN DEL COMPORTAMIENTO EN RATAS FIBRÓTICAS TRATADAS CON TAMSULOSINA: ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA ASOCIADA A HIPERAMONEMIA	52
7.11.	ESTABLECIMIENTO DEL MODELO TERAPÉUTICO EN RATA WISTAR CON CARVEDILOL Y TAMSULOSINA.....	55
7.12.	ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE MODELO TERAPÉUTICO CON CARVEDILOL Y TAMSULOSINA.....	57
7.13.	MARCADORES BIOQUÍMICOS DE FUNCIÓN HEPÁTICA EN MODELO TERAPÉUTICO	59

8.	DISCUSIÓN	60
9.	CONCLUSIÓN	65
10.	REFERENCIAS	66
11.	ARTICULOS PUBLICADOS	75
12.	APÉNDICE	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dosificación y uso de betabloqueantes no selectivos (BBNS) en la práctica clínica.	6
Tabla 2. Condiciones de la mezcla de reacción para síntesis de cDNA	30
Tabla 3. Condiciones de la mezcla de reacción para síntesis de cDNA	31
Tabla 4. Protocolo del termociclador para síntesis de cDNA	31
Tabla 5. Condiciones de la mezcla de reacción de PCR en tiempo real.....	31
Tabla 6. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para RT-PCR.....	32
Tabla 7. Estándares para preparar curva de cuantificación	33
Tabla 8. Preparación de geles para SDS-PAGE	34
Tabla 9. Marcadores bioquímicos de función hepática en modelo concomitante.	49
Tabla 10. Marcadores bioquímicos de función hepática en modelo terapéutico.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución clínica de la cirrosis.	4
Figura 2. Activación de las células estelares hepáticas.	10
Figura 3. Comparación estructural de doxazosina, naftopidilo y tamsulosina.	14
Figura 4. Estrategia experimental general del proyecto.	21
Figura 5. Modelo concomitante de cirrosis hepática con tioacetamida.	26
Figura 6. Modelo terapéutico de cirrosis hepática con tioacetamida.	27
Figura 7. Efecto de carvedilol y tamsulosina sobre la citotoxicidad y viabilidad de células HepG2 y LX-2.	38
Figura 8. Tamsulosina y carvedilol redujeron la proliferación de las células LX-2 inducida por noradrenalina.	40
Figura 9. Carvedilol y tamsulosina modularon la actividad fibrogénica de las células estelares hepáticas.	42
Figura 10. Efecto de los ensayos de cicatrización y migración de LX-2 con carvedilol y tamsulosina.	44
Figura 11. Modelo animal y características generales.	45
Figura 12. Análisis histopatológico del modelo concomitante de cirrosis hepática.	47
Figura 13. Análisis morfométrico del área proporcional de colágeno en modelo concomitante.	48
Figura 14. Expresión de marcadores fibrogénicos tras el tratamiento con carvedilol y tamsulosina en ratas con fibrosis inducida por TAA.	50
Figura 15. Efecto de tamsulosina y el carvedilol en la regulación de la presión portal y arterial. ...	51
Figura 16. Actividad locomotora voluntaria y niveles de amonio sérico en los grupos experimentales durante 4 semanas.	52
Figura 17. Efecto de carvedilol y tamsulosina en la prueba de campo abierto.	54
Figura 18. Efecto de carvedilol y tamsulosina en la prueba de reconocimiento de objetos.	55
Figura 19. Peso y tamaño de hígados de ratas con tratamiento con carvedilol y tamsulosina.	56
Figura 20. Análisis histopatológico de modelo terapéutico de cirrosis hepática con carvedilol y tamsulosina.	57
Figura 21. Análisis morfométrico del área proporcional de colágeno en modelo terapéutico.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa
α -SMA	Actina de músculo liso alfa
β	Beta
γ	Gama
PPAR- γ	Receptor Gama Activado por el Proliferador de Peroxisomas
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
18SrRNA	Ácido ribonucleico ribosómico 18S
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alanina transaminasa
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Aspartato transaminasa
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
CEH	Célula estelar hepática
c-MYC	Gen involucrado en la proliferación celular
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
CYP	Citocromo
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
HPB	Hiperplasia prostática benigna
kDa	Kilodaltones
MEC	Matriz extracelular
MTT	Bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo
MMP	Metaloproteinasas
NO	Óxido nítrico
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
qPCR	PCR cuantitativa
TAA	Tioacetamida
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
WB	Western blot
SDS	Dodecil sulfato de sodio

RESUMEN

M.C. Mariana Yazmin Medina Pizaño
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Julio 2025

Título del estudio: Análisis de alfa y beta adrenobloqueadores como agentes antifibróticos y hepatoprotectores en un modelo de cirrosis en rata Wistar.

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Morfología.

Área de estudio: Morfología

Introducción: Las células estelares hepáticas (CEH) participan en la síntesis de colágeno en el hígado durante la enfermedad hepática crónica. Las investigaciones sugieren que los factores que inician un proceso de activación fibrogénica en estas células puede ser la existencia de adrenoreceptores (AR). Un tratamiento para controlar la actividad de las CEH debe generar la menor cantidad de efectos secundarios en los hepatocitos. Este estudio tuvo como objetivo investigar el efecto de la tamsulosina, un bloqueador de los receptores α 1-adrenérgicos, y compararlo con el del carvedilol, un β -bloqueador no específico, sobre la capacidad fibrogénica de las células estelares *in vitro* y sobre la fibrosis hepática y la recuperación de la hipertensión portal en un modelo *in vivo*.

Metodología: Para evaluar el efecto de los α y β adrenobloqueadores *in vitro*, células estelares hepáticas (LX-2) fueron activadas con norepinefrina (NE) y posteriormente tratadas con tamsulosina o carvedilol. Se analizó el efecto de los tratamientos sobre la proliferación celular, el almacenamiento intracelular de retinol, la expresión de colágeno- α 1, α -SMA y PPAR- γ ; así como la migración y la invasión celular. Para evaluar el efecto de los α y β adrenobloqueadores *in vivo*, se realizó un modelo concomitante donde se administró tioacetamida (TAA) a ratas Wistar macho mientras eran tratadas con carvedilol y tamsulosina durante 4 semanas. Por otro lado, se realizó un modelo terapéutico de 6 semanas de administración de TAA y el posterior tratamiento por 2 y 4 semanas con los medicamentos. A las ratas tratadas se les realizó una evaluación histológica, molecular, de la función hepática y conductual. Se utilizó una perfusión *in situ* para evaluar la presión portal y la presión arterial.

Resultados: La noradrenalina (NE) inició la activación fibrogénica de las células estelares hepáticas y aumentó a la expresión de colágeno- α 1, α -SMA y disminuyó la expresión de PPAR- γ . La tamsulosina, suprimió la proliferación y activación de las CEH inducidas por NE, mientras que el carvedilol, mitigó parcialmente estos efectos en las células LX-2. *In vivo*, el tratamiento con tamsulosina mostró una importante recuperación de la fibrosis, una cantidad decreciente de colágeno I y una función hepática normal. Las ratas inducidas con tioacetamida desarrollaron síndrome de hipertensión portal e hiperamonemia en las ratas, el grupo tratado no mostró signos de hipertensión portal ni hipotensión sistémica o cambios en la conducta debido a una reducción en la concentración de amonio sérico.

Conclusión: La NE promueve la activación de las CEH y la fibrosis, mientras que la tamsulosina y el carvedilol reducen eficazmente estos efectos *in vitro* e *in vivo*. Los tratamientos reducen la hipertensión portal, hiperamonemia y previenen la fibrosis hepática al inhibir la proliferación, migración y activación de las CEH.

Director de tesis



Dra. María de Jesús Loera Arias

1. INTRODUCCIÓN

La fibrosis hepática, la hipertensión portal (HP) y la encefalopatía hepática (EH) se identificaron como complicaciones de la enfermedad hepática crónica que pueden conducir a cirrosis descompensada. Se ha demostrado que la HP se desarrolla principalmente por un aumento de la resistencia vascular intrahepática (RVH) y por vasodilatación esplácnica con incremento del flujo sanguíneo portal (Ginès et al., 2021). En hígados fibróticos, la RVH resulta tanto del remodelado estructural por acumulación de matriz extracelular y alteración de la arquitectura hepática como del aumento del tono vascular, mediado por la activación de las células estelares hepáticas (CEH) y el deterioro de las células endoteliales sinusoidales hepáticas (CESH) (Asada et al., 2024; McConnell & Iwakiri, 2018).

Se describió que la cirrosis inducida por tioacetamida (TAA) se debe a la inhibición del metabolismo respiratorio y de la actividad enzimática en los núcleos de las células hepáticas. Además, las ratas intoxicadas con TAA presentaron una circulación esplácnica hiperdinámica, caracterizada por un aumento del flujo venoso portal y una disminución de la resistencia arterial esplácnica (Nascimento et al., 2018). Aunque el papel de las CEH en la hipertensión portal se ha investigado con menor profundidad, se vinculó la fibrosis con la rigidez hepática, la angiogénesis y la contractilidad, relacionando así la activación de las CEH con el desarrollo de HP (Iwakiri & Trebicka, 2021).

La contracción de las CEH se ha identificado como un factor clave en el desarrollo de la hipertensión portal. Se confirmó la presencia de glutamina sintetasa en estas células (Bode et al., 1998), y en modelos roedores de cirrosis se observó que elevadas concentraciones de amoníaco intensificaban tanto la contracción de las CEH como la presión portal. Por el contrario, al reducir los niveles de amoníaco, se atenuó la activación de las CEH y se reguló la hipertensión portal (Jalan et al., 2016).

La encefalopatía hepática (EH) es un trastorno neuropsiquiátrico grave, caracterizado clínicamente por déficits cognitivos y alteraciones del nivel de conciencia. Debido a sus efectos hepatotóxicos y neurotóxicos, la TAA se emplea habitualmente para inducir EH en modelos experimentales. Su fisiopatología es compleja y aún no se ha dilucidado por completo; no obstante, se reconoce de forma general que la hiperamonemia, el estrés oxidativo y la neuroinflamación—que dañan el ADN celular y diversas enzimas—son responsables de los cambios clínicos, patológicos y neuroquímicos asociados a esta enfermedad (X. Sun et al., 2020).

La tamsulosina se identificó como un antagonista selectivo de los receptores α_1 adrenérgicos, subtipo perteneciente a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Su mecanismo principal consistió en bloquear los receptores α_1A , reduciendo la contracción del músculo liso (Cotecchia, 2010; Dunn et al., 2002). Se evaluó el potencial antifibrótico de antagonistas α_1 y β adrenérgicos en modelos de cirrosis inducida por tetracloruro de carbono (CCl_4) en hámsteres. Se demostró que carvedilol y doxazosina disminuyeron la fibrosis y la cirrosis al reducir la deposición de colágeno I mediante el bloqueo de receptores α_1 y β , atenuando las actividades profibróticas de la TGF- β 1. Sin embargo, se asoció doxazosina con alteraciones morfológicas de los hepatocitos, como agrandamiento de los hepatocitos, con un aspecto redondeado, lo que pudo comprometer la viabilidad celular y la capacidad regenerativa (Muñoz-Ortega et al., 2016). Por el contrario, se comprobó que la tamsulosina inhibió la expresión de factores fibrogénicos en daño glomerular inducido por alto contenido de glucosa y redujo la expresión de MMP-2 y MMP-9 en tejido renal (L. Sun et al., 2021); no obstante, sus efectos antifibróticos hepáticos no se han elucidado completamente.

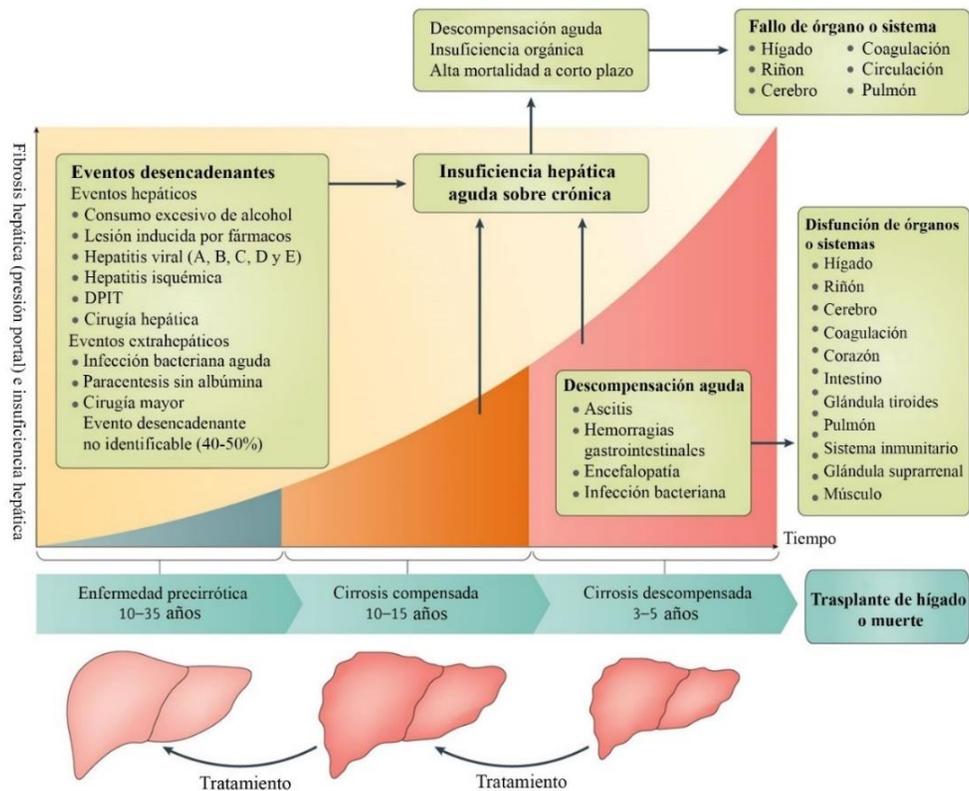
El objetivo de este estudio consistió en demostrar que carvedilol y tamsulosina pudieron mejorar la hipertensión portal, hiperamonemia e inducir la regresión de la fibrosis hepática al inhibir la proliferación, migración y activación de las CEH, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

2. ANTECEDENTES

La fibrosis hepática consiste en la sustitución del tejido dañado por cicatriz de colágeno, resultado de una respuesta de curación de heridas que se perpetúa de forma anómala. Su progresión varía según la etiología, factores ambientales y del huésped (Ginès et al., 2021). Cuando avanza, la fibrosis distorsiona la vasculatura hepática dando lugar a la cirrosis, en la que los tabiques fibróticos vascularizados conectan los tractos portales con las venas centrales y aumentan el colágeno. Esto desvía la sangre portal y arterial, deteriora el intercambio con los hepatocitos y provoca hipertensión portal, alteraciones circulatorias sistémicas (vasodilatación esplácnica, retención de agua, aumento del gasto cardíaco) y riesgo de carcinoma hepatocelular. Aunque el trasplante hepático permanece como la única terapia para un grupo de pacientes, actualmente se desarrollan nuevos fármacos capaces de frenar la progresión hacia la cirrosis descompensada e incluso revertir el proceso (Schuppan & Afdhal, 2008). Tradicionalmente se consideraba irreversible; estudios recientes indican que la regresión de la cirrosis es factible (Desmet & Roskams, 2004).

2.1. Cirrosis Hepática

La cirrosis causa aproximadamente el 2.4 % de las muertes globales (Sepanlou et al., 2020; Tham et al., 2025), en México es la cuarta causa de muerte con 19 mil 819 defunciones en 2023 (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2024). Esta enfermedad progresa desde una fase compensada, relativamente estable, hasta una etapa descompensada caracterizada por un deterioro significativo de la función hepática. La hipertensión portal (HP) es el motor principal de complicaciones como várices, ascitis, disfunción renal, encefalopatía hepática, circulación hiperdinámica y miocardiopatía (Kulkarni et al., 2022). Además del curso tradicional por etapas, en la última década se ha reconocido un síndrome distinto, la insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF), en el cual la función hepática empeora de forma abrupta, con o sin disfunción de otros órganos, replanteando el entendimiento de la HP en la cirrosis avanzada (Jagdish et al., 2023).



Nature Reviews | Disease Primers

Figura 1. Evolución clínica de la cirrosis.

La insuficiencia hepática aguda sobre crónica puede surgir en cualquier fase de la cirrosis, ya sea compensada o descompensada, y suele precipitarse por episodios hepáticos o extrahepáticos, aunque en muchos casos no se identifica un desencadenante. Se considera descompensación aguda de la cirrosis cuando aparecen síntomas de forma rápida y clínica como ascitis, encefalopatía hepática, hemorragia gastrointestinal o su conjunto, independientemente de si el paciente los había tenido antes. Aunque las infecciones bacterianas no son clasificaciones exclusivas de la cirrosis, se incluyen entre sus complicaciones en quienes presentan ascitis, hemorragias o encefalopatía debido a su alta frecuencia y a mecanismos como la migración bacteriana desde el intestino y la función leucocitaria comprometida. La figura se adaptó a partir de una imagen de Nature Reviews, (Arroyo et al., 2016).

2.2. Cirrosis compensada y descompensada

En la cirrosis compensada, los pacientes suelen permanecer asintomáticos, detectándose la enfermedad de forma incidental al encontrar elevaciones leves de aminotransferasas o γ -GT, y

ocasionalmente hepatomegalia o esplenomegalia en la exploración. En cambio, la cirrosis descompensada se caracteriza por síntomas y complicaciones derivados de la disfunción hepática e hipertensión portal, como ascitis, ictericia, encefalopatía, hemorragia por varices y carcinoma hepatocelular (Fig. 1). Además, en presencia de ascitis pueden desarrollarse peritonitis bacteriana espontánea y síndrome hepatorenal, marcando el paso de la fase compensada a la descompensada (Jagdish et al., 2023). La cirrosis descompensada se presenta en el 30 % de los pacientes y estos progresan a insuficiencia hepática aguda sobre crónica, con una mortalidad a los 90 días que oscila entre el 14 % en la descompensación aislada y 50% con insuficiencia aguda, reflejo de la falta de terapias capaces de frenar su avance. Los análisis fisiopatológicos clásicos sitúan la hipertensión portal, la vasodilatación esplácnica y sistémica y el estado hiperdinámico como los mecanismos fundamentales en la descompensación (Gustot et al., 2015; Moreau et al., 2013).

2.3. Hipertensión portal

La hipertensión portal surge por un aumento de la resistencia vascular intrahepática al flujo portal, que se explica en un 70 % por cambios estructurales fijos y en un 30 % por alteraciones funcionales dinámicas (Turco & Garcia-Tsao, 2019). La resistencia elevada en la circulación hepática incrementa el gradiente de presión entre el sistema portal y la vena cava inferior, medido como gradiente de presión venosa hepática (GPVH). Un GPVH inferior a 5 mmHg se considera normal; cuando supera los 6 mmHg se diagnostica hipertensión portal. Si el GPVH excede los 10 mmHg, comienzan a aparecer complicaciones clínicas, como varices esofágicas, y descompensación, que incluye hemorragia varicosa, ascitis o encefalopatía hepática (Ripoll et al., 2007).

El incremento de la resistencia hepática desvía el flujo portal hacia vasos colaterales de menor resistencia, como las anastomosis porto-sistémicas y, especialmente, las varices gastroesofágicas (Nardelli et al., 2021). A medida que la hipertensión portal progresa, el aumento del esfuerzo cortante en la pared vascular estimula la liberación endotelial de vasodilatadores, dando lugar a vasodilatación predominantemente esplácnica. Este fenómeno incrementa el flujo sanguíneo en los vasos colaterales

y favorece la neoangiogénesis, lo que a su vez agrava tanto la vasodilatación esplácnica como la hipertensión portal (Fernández et al., 2009).

Durante los últimos cuarenta años, se han utilizado betabloqueadores no selectivos (NSBB) para tratar la hipertensión portal, tras el estudio pionero realizado en el año 1980 por (Lebrec et al.,) que demostraron una reducción significativa de esta condición en pacientes con cirrosis al administrar propranolol. Las terapias actuales actúan principalmente disminuyendo el flujo portal, utilizando NSBB, octreótido (análogo de la somatostatina) y terlipresina (análogo de la vasopresina). Además, los nitratos pueden ayudar a disminuir la resistencia intrahepática.

Aunque los betabloqueadores no selectivos son seguros, en raras ocasiones pueden afectar negativamente la calidad de vida del paciente debido a efectos adversos no específicos de la clase farmacológica. Entre estos se encuentran la fatiga, la disminución de la tolerancia al ejercicio, la disfunción eréctil, las náuseas, el estreñimiento, la hipotensión, los mareos y el aturdimiento. Sin embargo, es importante señalar que dichos síntomas también pueden deberse a la propia cirrosis o a cuadros de depresión concomitante. Los betabloqueadores más usados en la hipertensión portal son propranolol, nadolol y carvedilol (Tabla 1).

Tabla 1. Dosificación y uso de betabloqueantes no selectivos (BBNS) en la práctica clínica.

Betabloqueador no selectivo	Dosis inicial	Dosis máxima permitida
Propranolol	20-40 mg dos veces al día	160 mg dos veces al día
Nadolol	10-20 mg al día	160 mg al día
Carvedilol	6.25 mg al día	25 mg al día

El carvedilol es un betabloqueador no selectivo de tercera generación muy eficaz para reducir la presión portal. Bloquea receptores β_1 (disminuye la frecuencia cardíaca) y β_2 (provoca vasoconstricción esplácnica) con una potencia cuatro veces superior a la del propranolol, y ejerce un bloqueo moderado de receptores α_1 , lo que contribuye a disminuir la vasodilatación intrahepática

(Turco et al., 2023). Se administra por vía oral y actúa en aproximadamente 2 horas; sufre un extenso metabolismo hepático (CYP2D6, CYP1A2 y CYP2C9) y se elimina principalmente por bilis, por lo que no requiere ajuste en enfermedad renal. En cirrosis avanzada, la colestasis y la hipoalbuminemia pueden aumentar su biodisponibilidad (Dulin & Abraham, 2004). En un estudio, la dosis de carvedilol a 12.5 mg/día, se observó una tolerabilidad y seguridad superiores (sin descenso excesivo de la presión arterial, sin agravamiento de la ascitis ni deterioro de la función renal), manteniendo, además, una mayor eficacia en la reducción del GPVH en comparación con otros betabloqueadores no selectivos (Schwarzer et al., 2018).

2.4. Encefalopatía hepática

La encefalopatía hepática (EH) se define como disfunción cerebral debida a una insuficiencia hepática aguda, crónica o aguda sobre crónica y/o derivaciones porto-sistémicas (Ferenci et al., 2002). Se manifiesta con un amplio espectro de síntomas neuropsiquiátricos, que van desde alteraciones mentales subclínicas hasta estados de confusión grave y coma en fases avanzadas. La EH es probablemente la complicación más frecuente de la cirrosis: su prevalencia al momento del diagnóstico de cirrosis oscila entre el 10 y el 14 %, y alrededor del 30–40 % de estos pacientes desarrollan EH en algún momento de su evolución clínica (Amodio et al., 2001). El riesgo acumulado de episodios recurrentes de EH alcanza el 40 % al año. La mortalidad a un año en pacientes con EH de grado severo puede llegar al 42 % (Bajaj et al., 2011).

El amoníaco es clave en la fisiopatología de la encefalopatía hepática (EH) en cirrosis, aunque sus niveles en sangre no se asocian directamente con la gravedad clínica. Investigaciones recientes han demostrado que la inflamación sistémica en estos pacientes incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y activa astrocitos y microglía; este proceso sinérgico con la hiperamonemia intensifica la neuroinflamación y el edema cerebral, agravando el deterioro neurológico (Aldridge et al., 2015; Rodrigo et al., 2010).

En un estudio se validó un modelo murino al que se le indujo cirrosis hepática e hiperamonemia crónica mediante la administración de tioacetamida por 8 semanas, se analizaron las relaciones entre los resultados de las pruebas de función, psicométricas, los niveles séricos de amoníaco (NH_3) y el grado de inflamación, así como su vínculo con el desarrollo de la encefalopatía hepática. Los resultados mostraron que las ratas presentaron una elevación significativa de AST, ALT, fosfatasa alcalina y bilirrubina y un decremento en albumina, confirmando pérdida de función hepática. El comportamiento del murino en las pruebas como campo abierto, test de rotarod y reconocimiento de objetos mostró que las ratas intoxicadas aumentaron el tiempo de inmovilidad, déficit de memoria espacial y deterioro de la memoria no espacial junto con conducta agresiva y estados irritables asociados a la encefalopatía (Kawai et al., 2012). Por último, los niveles plasmáticos de amonio se duplicaron en comparación con los controles demostrando una hiperamonemia característica base de la enfermedad; (Iwasa et al., 2016; Khan et al., 2016) reportaron que pacientes en coma hepático presentan concentraciones séricas de amoníaco mayores a 200 $\mu\text{g}/\text{dl}$.

2.5. Etiología

Las enfermedades hepáticas crónicas suelen evolucionar hacia la cirrosis. En los países desarrollados, las principales etiologías son la infección por virus de la hepatitis C, el consumo excesivo de alcohol y la esteatohepatitis no alcohólica, mientras que en los países en vías de desarrollo predominan las infecciones por virus de las hepatitis B y C. Otras causas relevantes incluyen hepatitis autoinmune, colangitis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, déficit de α_1 -antitripsina, síndrome de Budd–Chiari, cirrosis inducida por fármacos e insuficiencia cardíaca derecha crónica. Cuando no se identifica un agente causal, se clasifica como cirrosis criptogénica (Naveau et al., 2005).

2.6. Fisiopatología

La cirrosis hepática involucra la interacción de diversas poblaciones celulares además de los hepatocitos, como las células estelares hepáticas, las células endoteliales sinusoidales (CES) y las células de Kupffer (CK). El proceso inicia cuando los hepatocitos dañados, células de Kupffer y endotelio sinusoidal liberan señales proinflamatorias y pro-fibrogénicas como especies reactivas de oxígeno, citocinas (TNF- α , IL-1 β), lipopolisacáridos (LPS) y factores de crecimiento como PDGF y TGF- β 1 que activan a las células estelares hepáticas. En respuesta, las CEH quiescentes pierden sus depósitos de vitamina A, expresan marcadores de activación (α -SMA, PDGFR- β) y reprograman su transcriptoma mediante vías MAPK y Smad (Bataller & Brenner, 2005).

Durante la fase de perpetuación, estas CEH activadas proliferan y migran hacia las zonas lesionadas, producen en exceso colágeno tipo I y III junto con inhibidores de metaloproteinasas (TIMP-1) y desarrollan contractilidad miofibrilar, elevando la resistencia sinusoidal y contribuyendo a la hipertensión portal. Además, establecen circuitos autocrinos de PDGF, TGF- β 1 y quimiocinas que refuerzan su fenotipo fibrogénico y sostienen la inflamación crónica (Wong et al., 1994). Las CEH activadas secretan PDGF, TGF β -1 y quimiocinas, factores que vuelven a estimular a la misma célula o a otras células cercanas en un circuito autocrino o paracrino, reforzando su supervivencia, proliferación y migración. PDGF es el mitógeno para estas células y activa la vía de PI3K/Akt, ERK/MAPK y JNK, favoreciendo la entrada en ciclo celular. Por otro lado, PDGF y MCP-1 conducen a las células hacia los sinusoides dañados donde secretan colágeno (Friedman, 2000).

(Friedman, 2008) también describe los mecanismos de resolución: una vez eliminado el estímulo, disminuyen las señales profibróticas y aumentan la actividad de metaloproteinasas, lo que, junto con apoptosis y senescencia de las CEH, permite la degradación del exceso de matriz extracelular y la recuperación parcial de la arquitectura hepática (Fig. 2).

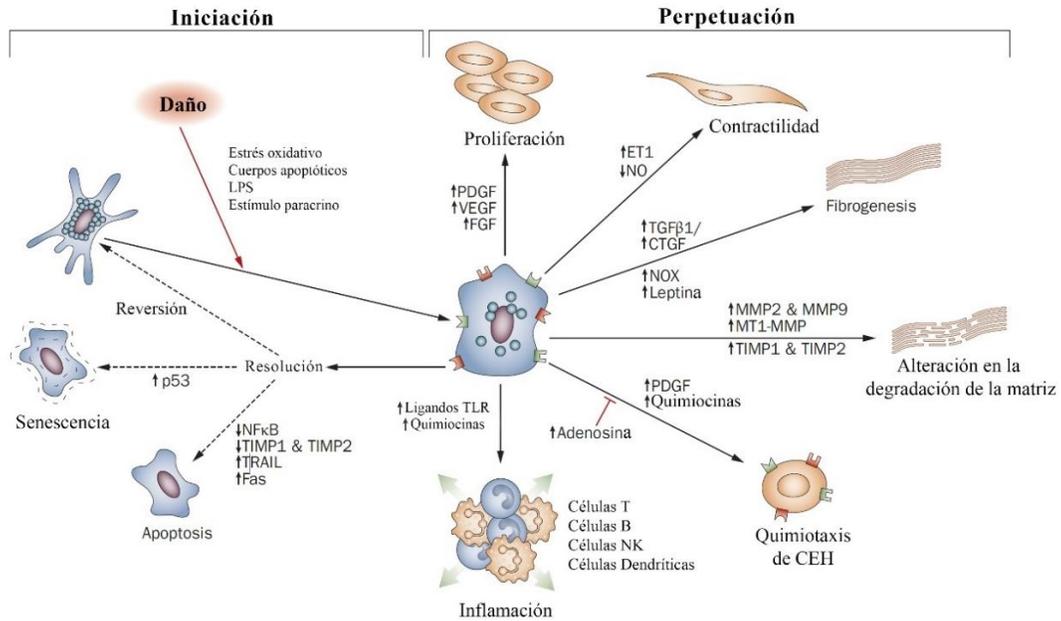


Figura 2. Activación de las células estelares hepáticas.

La activación de las CEH ocurre en dos etapas: iniciación y perpetuación. En la iniciación, señales solubles como estrés oxidativo, cuerpos apoptóticos, LPS y factores paracrinos de macrófagos, endotelio y hepatocitos disparan la activación. Durante la perpetuación, las CEH activadas exhiben cambios fenotípicos: proliferan, se contraen, producen matriz extracelular, alteran su degradación, se desplazan (quimiotaxis) y emiten señales inflamatorias. Cuando se resuelve la lesión hepática primaria, la fibrosis retrocede al eliminar las CEH activadas mediante apoptosis, senescencia o reconversión a un estado quiescente. Imagen modificada de (Friedman, 2000).

2.7. Histopatología

La cirrosis presenta tres patrones morfológicos: micronodular, macronodular y mixto. En la forma micronodular, los nódulos son uniformes y miden menos de 3 mm de diámetro, hallándose típicamente en cirrosis alcohólica, hemocromatosis, obstrucción del flujo venoso hepático, colestasis crónica, tras derivaciones yeyunoileales o en la llamada cirrosis infantil india. Por su parte, la cirrosis macronodular se caracteriza por nódulos irregulares que superan los 3 mm y suele asociarse con hepatitis B y C, déficit de α_1 -antitripsina y colangitis biliar primaria. La variante mixta combina ambos patrones y refleja la evolución de la fibrosis, pues con el tiempo muchas cirrosis

miconodulares tienden a adquirir nódulos de mayor tamaño, adoptando un aspecto macronodular (Arroyo et al., 2016).

De acuerdo con (Nagula et al., 2006) no basta con el diagnóstico histológico de cirrosis para valorar su gravedad clínica, sino que hay que correlacionarlo con la presión portal, medida por el gradiente de presión venosa hepática (GPVH). El análisis de biopsias de 43 pacientes con cirrosis y GPVH documentado en los seis meses previos, demostró de forma semicuantitativa parámetros como fibrosis sinusoidal, grosor de tabiques, tamaño de nódulos, pérdida de tractos portales, inflamación y esteatosis. Septos fibrosos más gruesos y nódulos pequeños (< 3 mm) se correlacionaron de forma independiente con $GPVH \geq 10$ mmHg (hipertensión portal clínicamente significativa) ($r = 0,658$; $p < 0,05$).

La subclasificación histológica de la cirrosis mediante el sistema de puntuación de Laennec, divide la fibrosis grado 4 en tres categorías (4A, 4B y 4C) según el grosor de los septos y el tamaño de los nódulos. Al correlacionar estas subetapas con la gravedad clínica y la hipertensión portal medida por GPVH, se observó que a medida que la enfermedad avanza de 4A a 4C aumenta el riesgo de descompensación (ascitis, varices o encefalopatía) y el GPVH se eleva de forma significativa (Kim et al., 2011).

2.8. Receptores adrenérgicos en células estelares hepáticas

Se ha demostrado que las CEH presentan receptores adrenérgicos α , aunque no se había determinado hasta ahora si también presentan receptores adrenérgicos β ni los subtipos específicos. Mediante RT-PCR se comprobó que CEH expresan receptores β , además de los subtipos α_1B , α_1D , β_1 y β_2 y un análisis por Western blot confirmó este mismo patrón de expresión (Athari, 1994). Estudios con inhibidores de dichos receptores aportan evidencia adicional de que las CEH sirven tanto como reservorio de noradrenalina como blanco directo de esta hormona. Asimismo, indican que

las acciones tróficas de la noradrenalina dependen de la activación de quinasas involucradas en la supervivencia y proliferación celular (J. A. Oben, 2004).

Se comprobó que diferentes tipos de líneas celulares, de carcinoma hepatocelular, línea inmortalizada y cultivo primario de células estelares hepáticas humanas (LX2, p-CEH) expresan receptores adrenérgicos. La expresión de ARNm y western blot del $\alpha 1A$ -receptor adrenérgico se elevó de manera notable en comparación con los subtipos $\alpha 1B$, $\alpha 1D$, $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ (Lin et al., 2020).

Al exponer las células a noradrenalina, se observó que las células de carcinoma hepatocelular no mostraron un aumento en su proliferación o de activación en comparación con las CEH que mostraron un incremento en la proliferación celular y en la expresión de colágeno I y α -SMA a nivel de ARNm y proteína, marcadores clave de la actividad de estas células. En cambio, tanto los α_1 -adrenobloqueadores selectivos como no selectivos (prazosina y 5-metilurapidilo) inhibieron de manera efectiva la activación de las CEH inducida por NE. Estos hallazgos sugieren que la NE, actuando a través de la señalización del receptor $\alpha 1A$ -adrenérgico, potencia la activación de las CEH (Lin et al., 2020).

2.9. Tratamientos con adrenobloqueadores en la cirrosis hepática

El hígado contiene un compartimento celular formado por células progenitoras y células estelares con propiedades neuroendocrinas, regulado por los sistemas nerviosos simpático y parasimpático (Roskams et al., 2004). La inhibición del sistema nervioso simpático en modelos murinos mediante bloqueo α_1 -adrenérgico con prazosina o simpatectomía química con 6-hidroxdopamina fomentó la activación de células progenitoras hepáticas y redujo el daño y la fibrosis inducidos por CCl_4 o galactosamina (J. Oben, 2003). En estos modelos, prazosina incrementó las células progenitoras y disminuyó las células estelares hepáticas marcadas por GFAP, desmina y α -SMA, traducándose en disminución de la fibrosis. Tanto las células progenitoras como las estelares

expresan receptores α -adrenérgicos, lo que sugiere que prazosina, bien tolerada, podría ser una opción terapéutica prometedora (Lin et al., 2020).

En un modelo *in vitro* de cultivo primario de CEH doxazosina reprimió la expresión de colágeno I y ACTA2 y aumentó la de PPAR- γ tanto en presencia como en ausencia de TGF- β , reduciendo la actividad fibrogénica de las CEH activadas al inducir su senescencia (Serna-Salas et al., 2022). El marcador PPAR- γ mantiene su expresión elevada en las CEH quiescentes. Su sobreexpresión inhibe la transición de las CEH a un fenotipo fibrogénico, reduciendo así la deposición de colágeno en el hígado lesionado (Wu et al., 2020). En modelos de fibrosis y cirrosis inducidas con CCl₄ en hámsteres, se demostró que los bloqueadores α y β adrenérgicos, como doxazosina y carvedilol, redujeron la deposición de colágeno tipo I al disminuir la expresión de TGF- β mediante el bloqueo de su receptor, y también promovieron la regeneración tisular (Muñoz-Ortega et al., 2016). Sin embargo carvedilol elevó marcadores de proliferación celular (α -FP, Ki-67, c-Myc) y ambos fármacos alteraron la morfología de los hepatocitos (Serna-Salas et al., 2018).

En un modelo de rata Wistar con CCl₄, el cotratamiento con carvedilol disminuyó la fibrosis del hígado confirmando su efecto antifibrótico por niveles de TGF- β 1 e hidroxiprolina cercanos al control y una deposición mínima de colágeno (El-Demerdash et al., 2017).

Aunque numerosos estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* han utilizado adrenobloqueadores α y β para tratar enfermedades hepáticas crónicas (fibrosis, cirrosis) dirigiéndose principalmente a las CEH, se ha observado que los antagonistas α más comunes como doxazosina, terazosina y prazosina presentan efectos citotóxicos en las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP (andrógeno-dependientes), DU145 y PC-3 (castración-resistentes) (Benning & Kyprianou, 2002; Bilbro et al., 2013; Kyprianou & Benning, 2000). De manera similar, naftopidil, compuesto estructuralmente similar, también provoca citotoxicidad en estas células (Hori et al., 2011). En cambio, la tamsulosina, cuya estructura se basa en una sulfonamida en lugar del anillo piperazina y quinazolina, no exhibe

tales efectos citotóxicos, lo que sugiere que la toxicidad de los derivados quinazolínicos está ligada a su núcleo estructural (Fig. 3) (Batty et al., 2016).

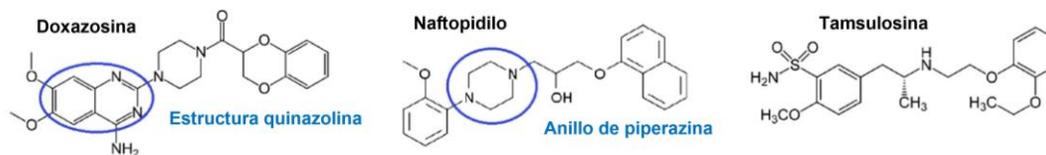


Figura 3. Comparación estructural de doxazosina, naftopidilo y tamsulosina.

Imagen modificada de (Batty et al., 2016).

Se ha demostrado que los antagonistas α_1 -adrenérgicos químicamente basados en quinazolina, como doxazosina y terazosina, han mostrado propiedades citotóxicas y pro-apoptóticas en distintos tipos de células tumorales, especialmente en el cáncer de próstata. Aunque su uso clínico original fue para tratar la hipertrofia prostática benigna e hipertensión, se ha descubierto que estos compuestos pueden inducir la muerte celular de manera independiente de su acción bloqueadora sobre los receptores α_1 (Patanè, 2015). Estos efectos citotóxicos están mediados por mecanismos moleculares complejos, como la activación de la vía de señalización FADD/caspasa-8, que lleva a una apoptosis tipo extrínseca, inducción de estrés en el retículo endoplásmico y disrupción del citoesqueleto, inhibición de la angiogénesis tumoral y supresión de factores de crecimiento que promueven la supervivencia celular. En algunos casos, también se ha documentado una interferencia con la vía PI3K/Akt, que es clave para la proliferación y resistencia a la apoptosis en células tumorales (Kyprianou et al., 2009).

Por el contrario, la tamsulosina, aunque también es un antagonista α_1 , no está basada en la estructura de quinazolina y es mucho más selectiva por el subtipo α_{1A} . Esto le otorga una alta afinidad por los receptores localizados, pero reduce significativamente su interacción con las vías intracelulares involucradas en la apoptosis. Debido a esta especificidad, la tamsulosina no activa de manera significativa las rutas pro-apoptóticas mencionadas, y su efecto sobre células tumorales es

mucho más limitado o indirecto. Su principal acción clínica sigue siendo el alivio de los síntomas urinarios, y aunque algunos estudios recientes sugieren que podría modular funciones como migración o invasión celular, carece del potente efecto citotóxico directo que sí presentan los α_1 -bloqueadores de tipo quinazolina (Batty et al., 2016; Forbes et al., 2016).

La tamsulosina es un antagonista competitivo de los receptores adrenérgicos α_1 con cierta selectividad por los subtipos α_{1A} y α_{1D} frente a α_{1B} . Se utiliza clínicamente para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna. Ha sido evaluada tanto *in vitro* como *in vivo* en diversas especies animales, principalmente en tejidos urogenitales y cardiovasculares, y su acción consiste en antagonizar la contracción del músculo liso (Sato et al., 2001). Su eficacia terapéutica es comparable a la de otros antagonistas α_1 empleados con esta indicación. Su tolerabilidad parece superior a la de la doxazosina o la terazosina, especialmente en lo que respecta a los efectos hemodinámicos (Wilde & McTavish, 1996).

En condiciones de dosificación repetida, la tamsulosina exhibe cinética lineal y alcanza concentraciones en estado estacionario tras 4 a 7 días de tratamiento diario, con una vida media plasmática de aproximadamente 9 a 13 horas, lo que justifica su indicación de 0.4 mg al día (Franco-Salinas et al., 2010). Después de su absorción y metabolismo hepático por el CYP3A4 y CYP2D6, la tamsulosina da lugar a varios metabolitos secundarios que facilitan su eliminación. El más destacado es el sulfóxido de tamsulosina, fruto de la oxidación del átomo de azufre en el grupo sulfonamida, que conserva afinidad por los receptores α_{1A} aunque con menor potencia que la molécula original. La N-desalquilación produce el metabolito desalquil-tamsulosina, que, pese a su actividad reducida, sirve como indicador de esta vía metabólica (Kamimura et al., 1998). Además, aparecen metabolitos hidroxilados tras la introducción de grupos -OH en el anillo aromático o en la cadena etoxi, cuya polaridad permite su excreción biliar. Finalmente, algunos de estos compuestos se conjugan con ácido glucurónico, formando glucurónidos que, aunque representan una pequeña fracción en el plasma y se eliminan rápidamente por bilis y orina (Sato et al., 2001). Se ha demostrado que los metabolitos, con

afinidad residual por los receptores adrenérgicos, contribuyen a la acción terapéutica y garantizan un perfil de eliminación seguro (Soeishi et al., 1996).

Actualmente, la tamsulosina se ha empleado como tratamiento adyuvante para facilitar la expulsión de cálculos tras litotricia extracorpórea (Parsons et al., 2007). Investigaciones anteriores han revelado que la estimulación de los receptores α_1 -adrenérgicos aumenta la producción de IL-1 β , una citocina proinflamatoria, y que este receptor contribuye a la fibrosis renal en modelos de ratón y en células HK-2 tratadas con TGF- β 1 y el tratamiento con tamsulosina disminuye la inflamación en esta enfermedad (L. Sun et al., 2021).

Las estrategias terapéuticas para la fibrosis y la cirrosis hepática podrían centrarse en modular los neurotransmisores y el sistema nervioso hepático. La estimulación del sistema nervioso simpático potencia la fibrosis al aumentar la activación y proliferación de las CEH y fortalecer la señalización de citocinas. Las CEH sintetizan catecolaminas, incluida la noradrenalina, gracias a enzimas específicas, y emplean estos compuestos para regular su propio crecimiento. Por tanto, interrumpir la señalización de catecolaminas en las CEH se perfila como una estrategia prometedora para frenar la respuesta fibrogénica tras el daño hepático.

3. JUSTIFICACIÓN

La cirrosis o fibrosis hepática sigue siendo una causa importante de muerte en todo el mundo. Aunque la mortalidad por cirrosis ha disminuido en varios países durante las últimas dos décadas, en México es la cuarta causa de mortalidad. La cirrosis es un estado patológico asociado con daño celular, diferenciación de las células hepáticas, cambios en el fenotipo y comportamiento celular, que produce un proceso inflamatorio que conduce a la fibrogenesis hepática. Las células estelares hepáticas quiescentes tienen un fenotipo inactivo de almacenamiento de retinoides; ante un daño crónico en el hígado se activan a un tipo de células proliferativas fibrogénicas que carecen de la capacidad de almacenamiento de retinoides y asemejan a un fenotipo de miofibroblastos caracterizado por la sobreproducción de proteínas de matriz extracelular, como α -SMA y colágeno. Por lo tanto, el tejido hepático parenquimatoso se reemplaza por tejido fibroso cicatricial acumulado, lo que lleva al deterioro de la función hepática.

Se ha demostrado que los adrenorreceptores pueden activar a las células fibrogénicas hepáticas. Por ello, se propone un tratamiento que disminuya la capacidad fibrogénica sin afectar la viabilidad de los hepatocitos restantes, encargados de repoblar el parénquima hepático. La administración de adrenobloqueadores alfa y beta como la tamsulosina y el carvedilol, en un modelo *in vitro* (utilizando las líneas celulares LX-2 y HepG2) como en un modelo *in vivo* de cirrosis en ratas Wistar, puede tener un efecto antifibrótico y hepatoprotector.

4. HIPÓTESIS

El tratamiento con el alfa adrenobloqueador tamsulosina reduce el proceso fibrótico reflejado en la mejora de la regeneración del parénquima hepático.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Analizar la capacidad antifibrogénica y hepatoprotectora de los adrenobloqueadores tamsulosina y el carvedilol en un modelo de cirrosis en rata Wistar.

5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de tamsulosina y carvedilol en la activación de células estelares hepáticas humanas *in vitro*.
2. Analizar el efecto modulador de tamsulosina y carvedilol sobre la expresión de marcadores fibrogénicos y hepatoprotectores de las células estelares hepáticas activadas.
3. Determinar si la tamsulosina y carvedilol disminuye el depósito de colágena en un modelo de cirrosis hepática en rata Wistar.
4. Demostrar el efecto de tamsulosina y carvedilol en la función hepática en un modelo de cirrosis en rata Wistar.

6. METODOLOGÍA

6.1. Estrategia experimental

La estrategia experimental consistió en tres modelos experimentales. 1) *in vitro* evaluamos la viabilidad celular con las dosis fisiológicas de los antagonistas de los receptores adrenérgicos carvedilol y tamsulosina por medio de los colorantes Calceína-AM y SYTOX Green en las líneas celulares HepG2 y LX-2 posterior se hizo la activación de las células LX-2 con NE y TGF- β luego de un pretratamiento con los α y β adrenobloqueadores carvedilol y tamsulosina, para analizar si los tratamientos evitan o retardan las fases de la perpetuación como la proliferación, la pérdida de vitamina A con la tinción de rojo oleoso, la fibrogénesis con marcadores por inmunofluorescencia y qPCR de α -SMA, colágeno I y PPAR- γ y quimiotaxis por medio del ensayo de herida y Transwell. El segundo modelo empleado, consistió en un modelo concomitante de cirrosis hepática en ratas Wistar, en el cual se intoxicó a los animales con tioacetamida (300 mg/kg, i.p.) durante cuatro semanas mientras recibían simultáneamente carvedilol (16 mg/kg) y tamsulosina (0,4 mg/kg) por vía oral. En el tercer modelo, modelo terapéutico, las ratas fueron tratadas con tioacetamida (250 mg/kg, i.p.) durante seis semanas y, tratadas con carvedilol y tamsulosina en las mismas dosis durante dos y cuatro semanas, respectivamente. Tras el sacrificio, se analizaron las pruebas de función hepática en suero; se realizó el análisis histológico de las fibras de colágeno mediante tinciones de tricrómica de Masson y rojo sirio; y se evaluó la expresión de ARNm y proteína de los marcadores fibrogénicos α -SMA, colágeno I y PPAR- γ . Además, se midieron parámetros asociados a la cirrosis descompensada, como los niveles de amonio y la presión arterial y portal. El diagrama de los experimentos realizados se muestra en la figura 4.

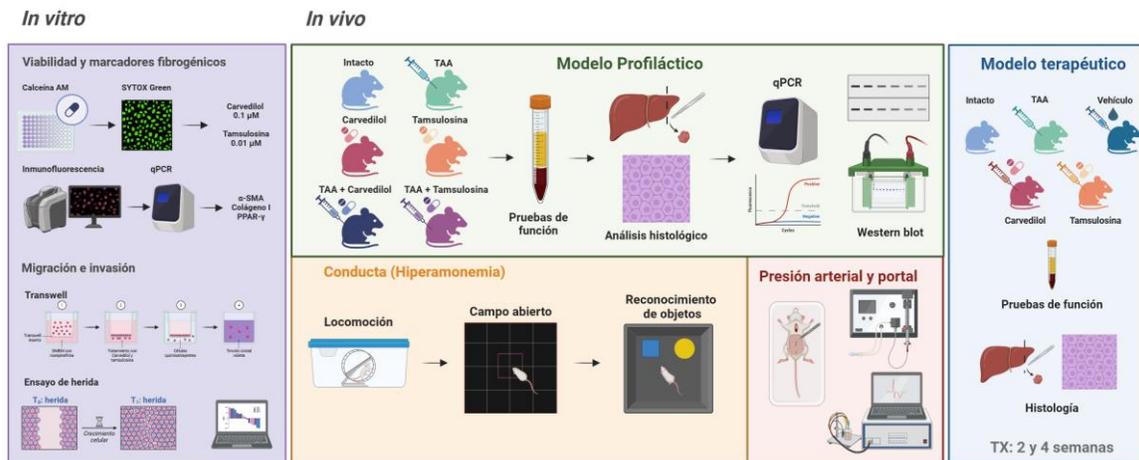


Figura 4. Estrategia experimental general del proyecto.

Esquema general del proyecto dividido en tres modelos experimentales. En la fase *in vitro* se empleó la línea celular LX-2 de células estrelladas hepáticas para evaluar viabilidad (ensayos con Calceína AM y SYTOX Green), cuantificar los marcadores fibrogénicos α -SMA, colágeno I y PPAR- γ , y analizar funciones migratorias e invasivas mediante ensayos de Transwell y cicatrización de herida. En el modelo concomitante *in vivo*, se administró tioacetamida junto con carvedilol o tamsulosina durante cuatro semanas; al finalizar, se midió la función hepática, se realizaron estudios histológicos con tricrómica de Masson y rojo Sirio, ensayos de qPCR y Western blot de marcadores fibrogénicos, pruebas conductuales indicadoras de hiperamonemia y determinaciones de presión arterial y portal. Finalmente, en el modelo terapéutico se aplicaron carvedilol o tamsulosina tras la inducción con tioacetamida, durante dos y cuatro semanas, y se evaluaron la función hepática y la histología (tricrómica de Masson y rojo Sirio) para valorar la regresión de la fibrosis.

6.2. Cultivo celular

Las células LX-2 (Xu, 2005) y HepG2 fueron cultivadas en medio DMEM (Sigma, D5546) suplementado con 2% de suero bovino fetal (SU-420, Microlab Monterrey, NL, México), 2% de L-glutamina (Corning, 25-005-CI) y 1% de penicilina/estreptomicina (100 U/ml) (30-001-CI; Corning), a 37°C en una atmósfera humidificada que con 5% de CO₂ y 95% de O₂. Después de la incubación, para realizar el subcultivo las células se lavaron con buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4), después se les añadió 1 ml de tripsina (EDTA al 0.02%, tripsina al 0.25%) durante 5 min para disgregar la monocapa celular. Todas las células se encontraban en la fase logarítmica de los experimentos.

6.3. Tratamiento con carvedilol y tamsulosina en células HepG2 y LX-2

Se diluyó el stock de carvedilol (PHR1265; Sigma) y de tamsulosina (T1330; Sigma) en DMSO hasta obtener una concentración de 50 mM. Con esta solución, se prepararon los tratamientos a concentraciones de 0.01, 0.1, 1 y 10 μ M empleando DMEM como diluyente.

6.4. Tinción de SYTOX Green

Al finalizar el tratamiento con los antagonistas α y β adrenérgicos, se fijaron las células LX-2 y HepG2 en los cubreobjetos en una placa de 24 pozos donde se cultivaron 25,000 células. A continuación, se lavaron con PBS 1 \times para eliminar el medio DMEM. Como control positivo de daño, se aplicó peróxido de hidrógeno al 30 % (250 μ M) durante 15 min. Después, se retiró el H₂O₂ y se preparó la solución de tinción SYTOX® Green diluyendo la solución madre 1:30 000 en PBS 1 \times . Seguidamente, se añadieron 500 μ l de dicha solución hasta cubrir las células y se incubaron 17 min a 37 °C en oscuridad. Finalmente, se lavaron con PBS 1 \times , se montó el cubreobjetos con glicerogel y se capturaron las imágenes en un microscopio de fluorescencia (504–523 nm).

6.5. Ensayo de viabilidad con calceína

Tras una incubación previa de 24 h, se trataron las células con tamsulosina (Sigma, T1330) y carvedilol (Sigma, PHR1265) a dosis de 0.01, 0.1, 1 y 10 μ M durante 24 h. La calceína se disolvió en dimetilsulfóxido anhidro (DMSO) a 1 mg/ml hasta alcanzar 1 μ M de concentración final. Se sembraron 1 \times 10⁴ células por pozo en placas de 96 pocillos y se trataron con las concentraciones establecidas de los fármacos, después de 24 h, se tomó 1 μ l de la solución de calceína, se diluyó en 3 ml de medio DMEM, se añadieron 100 μ l por pozo y se incubó durante 15 min a 37 °C. Finalmente, se retiró la tinción, se lavó con PBS 1 \times y se midió la absorbancia con el software Gen5™ en un lector de fluorescencia Agilent BioTek FLx800.

6.6. Estimulación de las células LX-2 con norepinefrina y TGF- β 1

Se cultivaron células en placas de 96 pocillos (1×10^4 células/pozo) durante 24 h. A continuación, se indujo la fibrogénesis tratando con norepinefrina a concentraciones crecientes (0.1, 1, 5 y 10 μ M) y con TGF- β (2.5 ng/ μ l) como control positivo, durante 24 h. Como pretratamiento se administraron carvedilol y tamsulosina en varias concentraciones para evaluar la disminución de la activación de las células LX-2; tras el análisis de los datos, se seleccionaron 0.1 μ M de carvedilol y 0.01 μ M de tamsulosina.

6.7. Ensayo de viabilidad MTT

Tras una incubación previa de 24 h, se trataron las células con dosis de 0.01, 0.1, 1 y 10 μ M de los antagonistas α y β adrenérgicos—tamsulosina (Sigma, T1330) y carvedilol (Sigma, PHR1265)—durante 24 h. Para evaluar la viabilidad de las líneas LX-2 y HepG2, se empleó el ensayo de MTT (Sigma, M2128): a partir de un stock de 5 mg/ml en PBS, se preparó una solución de 0.5 mg/ml en medio completo DMEM. Se sustituyó el medio de cultivo por el de MTT y se incubaron las placas 4 h a 37 °C. A continuación, se retiró el reactivo y los cristales formados se disolvieron añadiendo 100 μ l por pozo de isopropanol ácido (84 μ l de HCl al 25 % en 25 ml de isopropanol). Después de 10 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro Microplate reader, Bio-Rad® a 595 nm, con filtro de referencia a 655 nm.

6.8. Tinción de Rojo Oleoso

Después del tratamiento con los antagonistas de los adrenoreceptores, se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % durante 15 min para teñir las gotas de vitamina A. Se preparó un stock de Rojo Oleoso (Cat. CTR 162069) disolviendo 30 mg en 10 ml de isopropanol al 97 %; a continuación, se mezclaron 3 ml de este stock con 2 ml de agua desionizada y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente (la solución permaneció estable por 2 h), tras lo cual se filtró en tubos Falcon

de 15 ml, se tiñeron las células con la solución de Rojo Oleoso durante 15 min a temperatura ambiente, se aclararon con agua destilada estéril y se aplicó una contratinción con hematoxilina (1:10) durante 1 min. Finalmente, tras un último lavado con agua destilada estéril, se observaron las preparaciones al microscopio de contraste de fases.

6.9. Inmunocitofluorescencia

Se sembraron 15,000 células LX-2 por pozo en una placa de 24 pozos con cubreobjetos tratados con poli-L-lisina. A continuación, se aplicaron los tratamientos durante 24 h; seguidamente, se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS 1×. Se añadieron 300 µl de PFA al 4 % e incubó 10 min a temperatura ambiente. Después de eliminar el fijador, se realizaron dos lavados de 5 min con PBS 1× que contenía Tritón X-100 al 0.1 %. Para recuperar antígenos y reducir la autofluorescencia, se incubó con 300 µl de glicina 100 mM durante 20 min a temperatura ambiente y, a continuación, se retiró la solución de bloqueo. Se añadió el anticuerpo primario diluido en PBS 1× con Tritón X-100 al 0,1 % y BSA al 1 %, incubándose toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se descartó el anticuerpo primario y se realizaron dos lavados de 5 min con PBS 1× y Tritón X-100 al 0,1 %. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario durante 2 h a temperatura ambiente en oscuridad; tras retirar el anticuerpo secundario, se llevaron a cabo tres lavados de 5 min con PBS 1× protegiendo de la luz. Finalmente, se montaron los cubreobjetos con glicerol, se sellaron los bordes con esmalte y se analizaron en el microscopio de fluorescencia (504–523 nm).

6.10. Ensayo de cicatrización de herida

La placa se recubrió superficialmente con 400 µl/pozo de poli-L-lisina durante 4 h a 37 °C y 5 % CO₂; a continuación, se eliminó el exceso y se dejó secar al vacío durante 20 min. Se sembraron las células LX-2 a 45,000 células/pozo en placas de 24 pozos con medio DMEM hasta alcanzar el 80 % de confluencia. Tras la formación de la monocapa y sin retirar el medio, se practicó la herida *in vitro* con puntas estériles de 200 µl, efectuando el raspado de arriba hacia abajo en la mitad de cada

pozo y empleando una punta nueva por cada uno. Se retiró el medio, se lavó tres veces con PBS 1× y se administraron los tratamientos de norepinefrina y TGF-β con los antagonistas de los receptores α y β adrenérgicos en medio DMEM. Se capturaron cuatro imágenes por pozo en los tiempos 0, 12, 24 y 48 h, y las áreas de las heridas se cuantificaron con el software ImageJ.

6.11. Ensayo de invasión

Se sembraron 250,000 células en la cámara superior recubierta con Matrigel de insertos Transwell de 24 pocillos, con membrana de poro de 8 μm. En la cámara inferior se añadieron 600 μl de DMEM –pretratado con los medicamentos en las dosis indicadas– junto con SBF al 10 %, TGF-β (2,5 ng/μl) y norepinefrina (10 μM). Tras la incubación, las células invasoras adheridas al exterior de la membrana se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se tiñeron con cristal violeta 0.05% por 15 minutos, se lavaron con PBS 1x y se contaron mediante microscopía óptica.

6.12. Experimentos con animales

Todos los experimentos con animales fueron aprobados y manejados de acuerdo con las directrices del Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, que se basa en la guía de NHI para la investigación animal (Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, 2011), también se cuenta con el certificado del curso “Producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999)”. Se mantuvieron 66 ratas Wistar macho, de 10 a 12 semanas de edad de un peso entre 250–300 g, en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h en una habitación con temperatura controlada a 25 °C. La dieta consistió en LabDiet #5012 y Prolab® RMH 2500 (22 % de proteína, 4 % de grasa y 5 % de fibra) y agua *ad libitum* durante todo el experimento. Todos los animales recibieron tratamiento preventivo con sulfato de neomicina y sulfadimetilpirimidina durante 3 días para eliminar parásitos y bacterias.

En el modelo concomitante se distribuyeron las ratas en seis grupos y, durante 4 semanas el grupo control no recibió ningún tratamiento experimental. En el grupo de tioacetamida, se administró esta sustancia a 300 mg/kg por vía intraperitoneal, empleando solución salina como vehículo. El grupo de carvedilol recibió 16 mg/kg vía oral. En el grupo combinado de tioacetamida y carvedilol, se aplicaron ambos tratamientos de manera simultánea. Por su parte, el grupo de tamsulosina recibió una dosis de 0,4 mg/kg vía oral. Finalmente, el grupo de co-tratamiento de tioacetamida y tamsulosina fue sometido a la administración conjunta de ambas sustancias (Fig. 5).

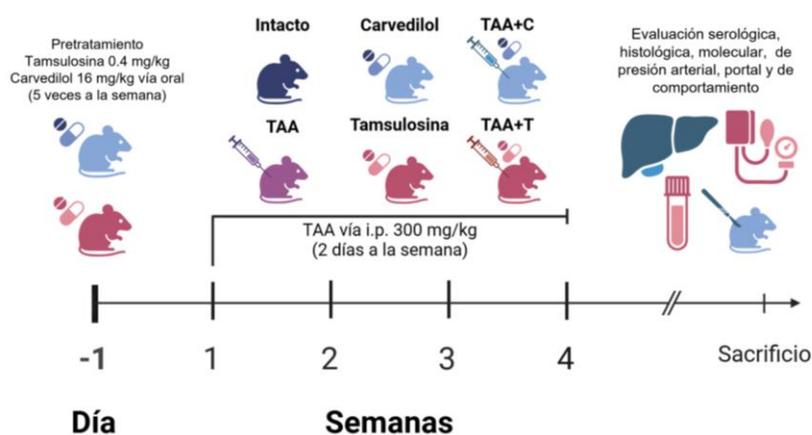


Figura 5. Modelo concomitante de cirrosis hepática con tioacetamida.

En el modelo terapéutico se indujo la cirrosis hepática de 24 ratas con tioacetamida con una dosis de 250 mg/kg vía intraperitoneal con solución salina por 6 semanas, excepto el grupo intacto que no se le administró ningún tratamiento. Una vez terminada la inducción se administraron los medicamentos carvedilol y tamsulosina en las dosis utilizadas en el modelo concomitante por 2 y 4 semanas, además se agregó el grupo vehículo al cual se le administró agua potable (diluyente de los medicamentos) para evaluar los cambios morfológicos y análisis de marcadores bioquímicos (Fig. 6).

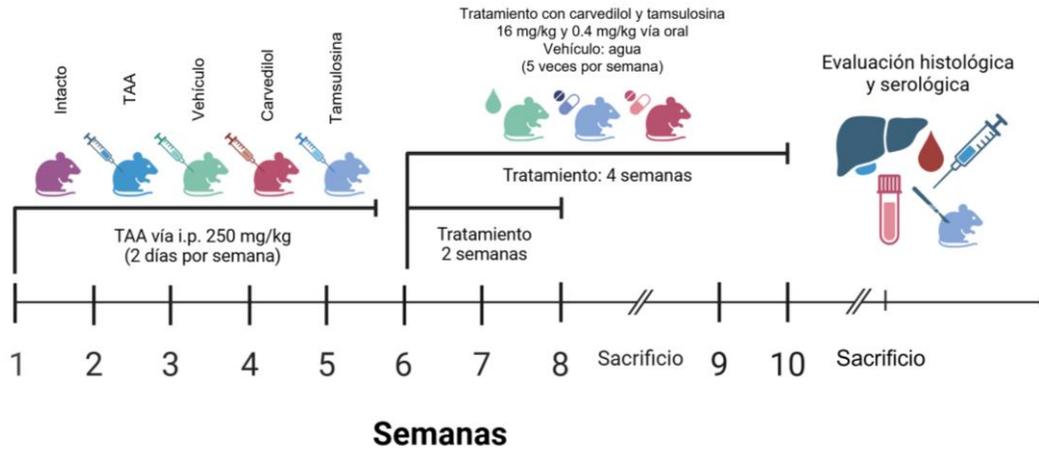


Figura 6. Modelo terapéutico de cirrosis hepática con tioacetamida.

Se usaron jeringas de 3 ml con agujas de calibre 21–23 G ($\frac{1}{2}$ –1 pulgada, bisel pequeño). Se sujetó e inmovilizó la pata izquierda de la rata, inclinándola hacia craneal para desplazar las vísceras y evitar lesiones. A continuación, se insertó la aguja en el cuadrante inferior izquierdo del abdomen y se avanzó cranealmente hacia la cavidad peritoneal, manteniéndola paralela a la columna vertebral y apoyándola contra la pared abdominal para prevenir la punción intestinal (Pérez-Cabeza de Vaca et al., 2018).

6.13. Procesamiento de los tejidos

Se lavó el tejido hepático con solución salina al 0.9 %; a continuación, se tomaron 2 g de cada lóbulo por sujeto y se fijaron en formalina neutra al 10 %. Para el análisis de proteínas, se pesaron 5 mg de tejido y se homogeneizaron en 300 μ l de buffer de lisis RIPA; para la extracción de ARN, se reservó 1 g de tejido en RNAlater. Las muestras se procesaron según la técnica histológica en el equipo Histoquinet Thermo Scientific Microm STP 120. Posteriormente, los tejidos se incluyeron en parafina con el Thermo Scientific Microm EC150-1 y, finalmente, se realizaron cortes histológicos de 5 μ m de espesor en el microtomo Leica RM 2125RT.

6.14. Tinción de Hematoxilina y Eosina

Se emplearon laminillas con cortes hepáticos de 5 μm , las cuales se deshidrataron en series crecientes de etanol, se tiñeron con hematoxilina durante 10 min y con eosina durante 1 min, después de deshidratar los cortes con xileno, finalmente se montaron con Entellan® para su observación al microscopio.

6.15. Tinción Tricrómica de Masson

Los cortes se desparafinaron 10 min en xilol y se hidrataron en agua destilada durante 10 min. A continuación, se mordentaron en solución de Bouin a 56 °C durante 1 h y se lavaron con 30 cambios de agua destilada. Seguidamente, se tiñeron con hematoxilina de Harris durante 1 min 30 s, se realizaron diez lavados y se incubaron en rojo escarlata por 11 min, seguido de un enjuague con agua destilada. Después, se sometieron a la solución ácida de fosfomolibdato y ácido fosfotúngstico durante 20 min y se tiñeron con azul de anilina por 3 min. Finalmente, los tejidos se deshidrataron en serie de alcohol al 96 % hasta xilol y se montaron en Entellan® para su observación por microscopía de luz.

6.16. Tinción Rojo Sirio

Se empleó la tinción de rojo sirio para distinguir y cuantificar las fibras de colágeno. Los cortes de tejido hepático se tiñeron con hematoxilina durante 10 min y, a continuación, con rojo sirio durante 1 h. Finalmente, se montaron en Entellan® para su visualización por microscopía de luz polarizada. Con esta técnica se identificó el colágeno tipo I y III y se cuantificó mediante análisis morfométrico con el programa ImageJ.

6.17. Determinación cuantitativa de marcadores de función hepática

Se recolectó sangre de las ratas Wistar tras los tratamientos para evaluar marcadores de lesión hepatocelular (ALT y AST), de colestasis (fosfatasa alcalina y urea), de síntesis hepática (albúmina y glucosa) y amonio. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro a 340 nm y se calculó el incremento promedio de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$). Los resultados se expresaron en unidades por litro (U/L) mediante un analizador semiautomático BTS-350 (Biosystems S.A.) y se sometieron a análisis estadístico.

6.18. Extracción de ARN

Los cultivos celulares y los tejidos, tras 24 h de tratamiento con carvedilol, tamsulosina y controles positivos de daño, se procesaron con el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep®, siguiendo el protocolo del fabricante. Primero, se recolectaron las células en tubos Eppendorf, los tejidos se maceraron en la solución RNA*later* y ambos se centrifugaron hasta obtener un pellet. A continuación, se añadieron 250 μl de TRIzol Reagent y se homogenizó con vórtex durante 30 segundos para dispersar completamente el pellet. Se incorporó un volumen igual de etanol, se mezcló por inversión y se transfirieron 500 μl de la mezcla a columnas de purificación. Tras centrifugar 30 segundos a 14 000 rpm y descartar el sobrenadante, se aplicaron 400 μl de pre-lavado, se centrifugó por 30 segundos a 14 000 rpm y se eliminó nuevamente el sobrenadante. Después, se añadieron 600 μl de buffer de lavado y se centrifugó 1 min a la misma velocidad. Finalmente, las columnas se colocaron en tubos nuevos, se eluyó el ARN con 30 μl de agua libre de nucleasas y se centrifugó 45 segundos a 14 000 rpm. El eluido se alicuotó y se mantuvo en hielo.

6.19. Cuantificación de ARN total

El ARN obtenido se cuantificó por absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro BioDrop μ LITE® y almacenó a -81°C hasta su uso. La pureza del ARN se determinó mediante la relación A_{260}/A_{280} —considerándose puros los valores > 1.8 — y la relación A_{260}/A_{230} , con valores > 1.5 .

6.20. Evaluación de la Integridad del ARN

Se evaluó la integridad por electroforesis en agarosa al 1.5 % en buffer SB 1 \times (100 mM de ácido bórico, 150 mM de NaCl, pH 8.5). Se cargaron 5 μl de ARN con 1 μl de Green Loading Buffer 6 \times y se sometieron a migración a 90 V durante 30 min en una cámara de electroforesis horizontal Gel Box MidiPlus (VWR®). Se empleó un marcador de peso molecular de 100 pb y se tiñó el gel con bromuro de etidio hasta visualizar el marcador bajo luz ultravioleta.

6.21. Retrotranscripción de ARN

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

Tabla 2. Condiciones de la mezcla de reacción para síntesis de cDNA

Reactivo	Cantidad
ARN	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Oligo dt	1 μl
Agua libre de nucleasas	10 μl
Total	12 μl

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

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

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

Tabla 4. Protocolo del termociclador para síntesis de cDNA

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

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

6.22. Análisis por PCR en tiempo real

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

Tabla 5. Condiciones de la mezcla de reacción de PCR en tiempo real

Reactivos	Cantidad
Master Mix	5 μ l
Oligonucleótido Forward 50 ng/ μ l	1 μ l
Oligonucleótido Reverse 50 ng/ μ l	1 μ l
Templado (cDNA) 50 ng/ μ l	1 μ l
Agua libre de nucleasas	2 μ l
Volumen total	10 μ l

Se utilizaron las reacciones para el análisis de los genes utilizando el termociclador Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, con las condiciones demostradas en la tabla 3.

Tabla 6. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para RT-PCR

Gen	Especie	Oligonucleótido Fw	Oligonucleótido Rv
18SARN ribosomal	Humano	AAACGGCTACCACATCCAAG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
β -actina	Rata	GGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAAT	TTGCCCTCCAATGGATCCT
α -SMA	Humano	TCATGGTCGGTATGGGTCAG	CCGTGCTCGATAGGGTACTT
	Rata	CAATGGCTCCGGGCTCTGTA	CTCTTGCTCTGCGCTTCGTC
Colágeno I	Humano	CACCAATCACCTGCGTACAG	GCAGTTCCTGGTCTCGTCAC
	Rata	ACCTCAGGGTATTGCTGGAC	GACCAGGGAAGCCTCTTTCT
PPAR γ	Humano	AGCAAACCCCTATTCCATGCT	CCAAAGTTGGTGGGCCAGAATG
	Rata	TAGGTGTGATCTTAAGTGTGTCG	GCATGGTGTAGATGATCTCA
Colágeno III	Rata	CTCCCACTACTCCTCTGGTAG	CACTTTTGTGCTTTGAGGTAGG
MMP-9	Rata	CACAACGTCTTTCACTACCAAG	AGAGATCACCAGTTTGTATCCG
MMP-13	Rata	AGGCCTTCAGAAAAGCCTTC	GAGCTGCTTGTCCAGGTTTC
TIMP1	Rata	ACCAGCGTTATGAGATCAAGAT	TTCTGGGACTTGTGGACATATC
TIMP2	Rata	CATCGAATTTATCTACACGGCC	TCTTCTTCTGGGTGATGCTAAG

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

- Expresión relativa = $2^{-\Delta\Delta C_t}$
- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t_{\text{tratamiento}} - Cq_{\text{gen constitutivo del tratamiento}}$
- $\Delta C_t_{\text{tratamiento}} = Cq_{\text{gen problema de tratamiento}} - Cq_{\text{gen constitutivo de tratamiento}}$
- $\Delta C_t_{\text{control}} = Cq_{\text{gen problema del control}} - Cq_{\text{gen constitutivo del control}}$

6.23. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas se lavaron las células con PBS 1 \times frío, se aspiró este y se añadieron 500 μ l de buffer de lisis RIPA en flask de 75 cm². Con un raspador, se desprendieron las células y se transfirieron a tubos, donde se agitaron durante 20 min a 4 °C. A continuación, se centrifugaron 20 min a 12 000 rpm, se recogió el sobrenadante y se descartó el pellet.

Para el tejido, por cada 5 mg se incorporaron 300 μ l de buffer de lisis RIPA, se homogenizó y se centrifugó 20 min a 12 000 rpm y 4 °C en microcentrífuga. El sobrenadante resultante se depositó en un tubo nuevo sobre hielo y se almacenó a -80 °C.

6.24. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó con el kit BCA Pierce™. Se dispusieron 3 µl de muestra (homogenizado celular o de tejido) y se añadieron 200 µl de la solución BCA, preparada con 25 ml de reactivo A y 0.5 ml de reactivo B (relación 50:1). La mezcla se incubó 1 h a 37 °C en cámara húmeda y se leyó la absorbancia a 595 nm.

Tabla 7. Estándares para preparar curva de cuantificación

(BSA) PIERCE µg/µl	BSA µg	BSA µl	µl H ₂ O Milli Q estéril	µl de RIPA 1x con inhibidores de proteasa
2	0	0	17	3
2	1	0.5	16.5	3
2	2.5	1.25	15.75	3
2	5	2.5	14.5	3
2	10	5	12	3
2	25	12.5	4.5	3
2	50	25	0	3
-	Muestra 3µl	0	17	0

La absorbancia de las muestras es graficada contra cada una de las concentraciones de los estándares para obtener la ecuación de la recta.

6.25. Identificación de proteínas por Western blot

Se realizó electroforesis de las muestras en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes con SDS (SDS-PAGE). Se prepararon geles separador y concentrador al 10 % y 4 %, respectivamente. Una vez polimerizados, se cuantificaron 50 µg de proteína por muestra y se mezclaron con buffer de carga. La desnaturalización se efectuó calentando las muestras a 95 °C durante 5 min. Se cargaron las proteínas después del marcador de peso molecular y se inició la electroforesis a 80 V durante 2 h.

Tabla 8. Preparación de geles para SDS-PAGE

Gel separador 10%		Gel concentrador 4% para dos geles	
H2O destilada	4 ml	H2O destilada	3 ml
Acrilamida	3.3 ml	Tris 0.5 pH 6.8	1.25 ml
Tris 1.5 M	2.5 ml	SDS 10%	50 μ l
SDS 10%	100 μ l	Acrilamida	650 μ l
PSA 10%	100 μl	PSA 10%	40 μl
TEMED	4 μl	TEMED	6 μl

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF. Primero, se recortó la membrana al tamaño del gel, se activó con metanol al 100 % y se montó el “sándwich” para la transferencia, que se realizó a 120 mA durante 2 h. Para la inmunodetección, se bloqueó la membrana con TBS-T 1 \times con 10 % de leche durante 1 h con agitación a temperatura ambiente. A continuación, se lavó y se incubó con los anticuerpos primarios monoclonales de ratón anti- α -SMA (Abcam #A5228) y anti- β -actina (Santa Cruz #J0421), ambos a 1:1000 en TBS-T 1 \times con 1 % de leche, durante 15 h a 4 °C con agitación. Tras tres lavados de 5 min con TBS-T 1 \times , se aplicó el anticuerpo secundario anti-ratón (Invitrogen #314330) a 1:5000. Después de otros tres lavados, se utilizó el kit SuperSignal™ West Pico PLUS según las indicaciones del fabricante y se reveló la señal con el escáner LI-COR C-DiGit. Para cuantificar la expresión relativa, se empleó β -actina como proteína endógena y la quimioluminiscencia se analizó por densitometría en ImageJ.

6.26. Medición de la hemodinámica hepática

Se preparó solución salina fisiológica estéril y se calentó a 37 °C para humedecer gases. A continuación, se registró el peso corporal de las ratas para ajustar la dosis de anestesia y normalizar los parámetros hemodinámicos. Se administró Zoletil (5 ml de diluyente + 0.6 ml de xilacina al 10 % + 1.4 ml de solución salina) por vía intraperitoneal a 0.0075 mg/kg, complementando con isoflurano por inhalación durante 5 min. Se intubó al animal con un tubo endotraqueal casero, derivado de un catéter venoso periférico modificado, y se fijó con cinta adhesiva a la mejilla para evitar desplazamientos. Seguidamente, se conectó el tubo al ventilador y se inició la respiración mecánica

(O₂ 1 L/min; frecuencia 90 rpm; presión inspiratoria 18 mmHg; PEEP 3 mmHg; relación I/E 1:2). Durante todo el procedimiento, se monitorizó la temperatura corporal de forma continua y se evaluó la profundidad anestésica mediante el reflejo palpebral.

Para medir la presión arterial, se realizó una incisión en la arteria carótida, exponiendo y disecando el complejo arteria-vena-nervio; la arteria se separó de la vena y el nervio con pinzas y se ligaron sus extremos distal y proximal. Se preparó un catéter PE-50 con punta inclinada que, tras perforar la pared arterial, permitió confirmar el flujo pulsátil y se conectó al transductor de presión para registrar la presión arterial. El área expuesta se cubrió con gasa humedecida. Para la medición de la presión portal, se verificó que el catéter estuviera libre de burbujas y se manipuló el intestino con guantes humedecidos para exponer los vasos mesentéricos principales. Se localizó la unión de la vena ileocólica, se introdujo el catéter perforando el peritoneo visceral y se avanzó cuidadosamente hasta la vena porta, evitando perforaciones. Finalmente, se conectó al transductor con solución salina estéril y se registraron la presión arterial y portal en un sistema BIOPAC MP150 con el software AcqKnowledge 4.1.

6.27. Actividad locomotora

Se alojaron ratas Wistar macho en grupos de tres en jaulas Ugo Basile Rat Cage 1800 con dimensiones de 48 cm (alto) × 32 cm (ancho) × 47 cm (fondo). Las jaulas contaban con acceso a una rueda de ejercicio (35 cm de diámetro), agua y alimento *ad libitum* durante todo el experimento. La actividad locomotora diaria se registró mediante un interruptor magnético y un contador LCD (Ugo Basile), cuantificándose el número de vueltas de la rueda. Cada día se calculó la distancia media recorrida por rata en cada jaula con la ecuación: $[(2\pi r) * (t)]/n$ donde t es el número de vueltas y n el número de ratas por jaula; de este modo, la eventual muerte de algún animal no altera la medición diaria por rata. Semanalmente se determinó la actividad locomotora media y se expresó como porcentaje de cambio respecto al valor basal (actividad registrada el día 1; no mostrada). Este

porcentaje relativizó las diferencias biológicas individuales, pues cada jaula sirvió como su propio control.

6.28. Campo abierto

Se empleó un laberinto de campo abierto consistente en una arena de plástico negro ($50 \times 50 \times 38$ cm), cada una con suelo texturizado para facilitar la tracción y paredes lisas. Antes de cada sesión, se limpió y desinfectó con etanol al 95 % y se dejó secar durante 5–10 min para homogeneizar posibles señales olfativas. Los ratones se trasladaron al cuarto de pruebas al menos una hora antes para aclimatarlos y, una vez dentro de la arena (colocados en el centro), su actividad locomotora se registró mediante un sistema de seguimiento por video o fotocélulas. La prueba fue por 10 min y durante esta, el operador se mantuvo fuera del campo visual de los animales. Al finalizar, se extrajeron las ratas, se volvió a desinfectar la arena, esperando a que el desinfectante se secase antes de introducir al siguiente sujeto. Los datos recogidos incluyeron distancia recorrida en cuadrantes interno, externo y total, tiempo en movimiento, tiempo inmóvil y frecuencia de exploración con el software ImageJ (Animal Tracker).

6.29. Reconocimiento de objetos

El protocolo de reconocimiento de objetos utilizado fue seguido de acuerdo a (Lueptow, 2017); durante la habituación, se retiró a la rata de su jaula y se colocó en el centro de la arena vacía, permitiéndole exploración libre durante 5 min. Una vez vaciada la jaula original, se reservó para servir de jaula de retención al día siguiente. Al cabo de 5 min, se retiró a la rata y se ubicó en la jaula de retención, evitando devolverla a su jaula de origen para no alterar el comportamiento de los siguientes sujetos. Entre cada rata, se limpió a fondo el equipo con etanol al 70 % (v/v).

Durante la habituación, se pudo evaluar el comportamiento ansioso calculando el tiempo en el centro de la arena (Prut & Belzung, 2003). Este parámetro resultó útil para ajustar la duración de

la fase de entrenamiento (T1), tomándose 10 min para alcanzar al menos 20 s de exploración de ambos objetos. En el entrenamiento (T1), se colocaron dos objetos idénticos en los cuadrantes noreste y suroeste de la arena. 24 h después de la habituación, se trasladó a la rata a la jaula de retención y, acto seguido, se colocó en el centro de la arena, equidistante de ambos objetos. Se permitió exploración libre durante 10 min para acumular 20 segundos de exploración de cada objeto. Al finalizar, se retiró al sujeto y se devolvió a la jaula de retención; a continuación, se limpió la arena y los objetos con etanol al 70 % entre cada sujeto.

En la prueba (T2), se situó el objeto familiar de T1 y un objeto nuevo en los mismos cuadrantes utilizados previamente. En el intervalo de retención elegido, se colocó a la rata en el centro de la arena, equidistante de ambos objetos, y se le permitió explorar libremente durante 10 min. Al término de los 10 min, se retiró al sujeto y se colocó en la jaula de retención. En ambas fases (T1 y T2), se puntuaron los 10 min, prolongando la observación más allá si el ratón no alcanzó 20 s de exploración en ese intervalo, hasta completar el tiempo mínimo requerido. Se evaluó el tiempo total de exploración, la medida de discriminación absoluta, índice de discriminación e índice de preferencia con el software Adobe Premiere Pro.

6.30. Análisis Estadístico

Los datos de todas las variables cuantitativas fueron capturados y ordenados en una hoja electrónica de Microsoft Excel® para facilitar su análisis. Los datos se expresaron como valores medios \pm desviación estándar (DE). Para la evaluación estadística se utilizó el software *Prism GraphPad*, primero se sometieron los datos a la prueba de normalidad. Según el resultado de dicha prueba, se realizaron comparaciones estadísticas empleando pruebas paramétricas (t de Student pareada o no pareada, ANOVA) o no paramétricas (Mann–Whitney o Kruskal–Wallis), según procedió. El nivel de significación se indicó con asteriscos (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001).

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación de los α y β adrenobloqueadores en la viabilidad celular de HepG2 y LX-2

Se evaluó la viabilidad celular de las líneas LX-2 y HepG2 mediante los ensayos de Calceína-AM y SYTOX Green para identificar las concentraciones de carvedilol y tamsulosina que resultaran citotóxicas. En el ensayo de Calceína-AM, este penetra exclusivamente en células con membrana intacta y, tras ser convertido por esterasas intracelulares en calceína fluorescente, emite señal verde (exc. 495 nm, em. 530 nm), permitiendo cuantificar las células viables mediante un lector de microplacas de fluorescencia. Por el contrario, SYTOX Green no atraviesa membranas intactas y solo tiñe el ADN de las células con membrana permeable, identificando de manera específica las células muertas o en etapas avanzadas de apoptosis.

Los resultados mostraron que, a dosis de 0.01 y 0.1 μ M, carvedilol no indujo efectos citotóxicos ni alteró la integridad de la membrana, mientras que concentraciones superiores incrementaron la proliferación. De igual modo, tamsulosina mantuvo la viabilidad celular en el rango de concentraciones estudiado (Fig. 7).

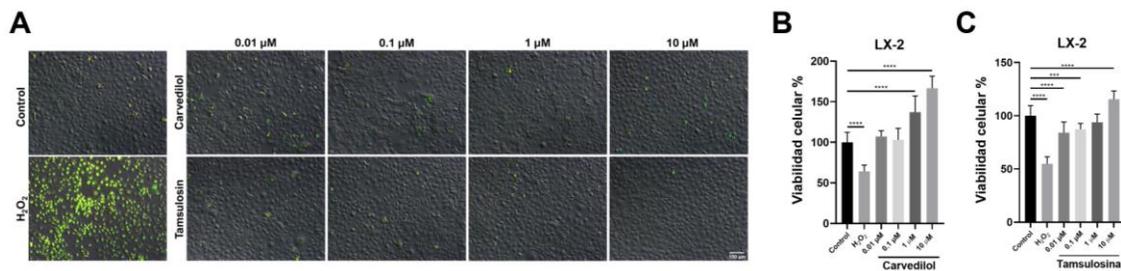


Figura 7. Carvedilol y tamsulosina no afectan la integridad de la membrana de las células LX-2.

(A) La tinción con SYTOX Green de las células LX-2 tratadas con tamsulosina y carvedilol durante 24 h en medio suplementado con suero no afectó la permeabilidad de la membrana celular en comparación con el control y el H₂O₂. (C) La tamsulosina inhibió la proliferación de células LX-2 a concentraciones de 0.01 y 0.1 μ M. En el ensayo de Calceína-AM, carvedilol no difirió del control; sin embargo, a concentraciones elevadas aumentó la proliferación de las células LX-2. Los datos se presentan como media \pm DE de tres experimentos (**P= 0.0025; ***P < 0.001; ****P < 0.0001).

Debido a que el objetivo principal de este trabajo fue el evaluar la capacidad antifibrogénica de tamsulosina y carvedilol, y considerando que las células estelares hepáticas (LX-2) están directamente implicadas en la fibrosis, se estimó innecesario utilizar una línea control adicional; en consecuencia, no se realizaron más ensayos en la línea HepG2.

7.2. Establecimiento del modelo de activación con norepinefrina en la línea celular LX-2 y el efecto de tamsulosina y carvedilol

Para el establecimiento del modelo de activación se utilizaron dos inductores de la transdiferenciación: TGF- β 1 y NE, en el grupo control, las células LX-2 presentaron grandes gotas lipídicas en el citoplasma con distribución perinuclear, asociadas a la morfología quiescente de las células estelares hepáticas. Estudios previos que identificaron al TGF- β 1 como activador de estas células, se observó que el tratamiento con esta citocina provocó en LX-2 un fenotipo posiblemente de miofibroblasto, mostrando cambios morfológicos como la pérdida de almacenamiento de gotas lipídicas y aumento de la proliferación, efectos similares a los inducidos por la noradrenalina, en los cuales las gotas lipídicas resultaron indetectables (Fig. 8A).

Se observó que las células pretratadas 1 h con adrenobloqueadores conservaron la tinción de retinol, lo que indicó que el tratamiento bloqueó la activación de las células estelares hepáticas. En el ensayo de proliferación MTT, no se detectaron cambios en la viabilidad de la línea HepG2 tras la administración de noradrenalina; lo que nos indica que no poseen los receptores adrenérgicos en cambio, en las células LX-2, las concentraciones elevadas de noradrenalina incrementaron la proliferación, la cual se moduló al aplicar los fármacos en comparación con el control intacto, que se confirmó con los cambios morfológicos observados en imágenes de microscopía óptica (Fig. 8 B-E).

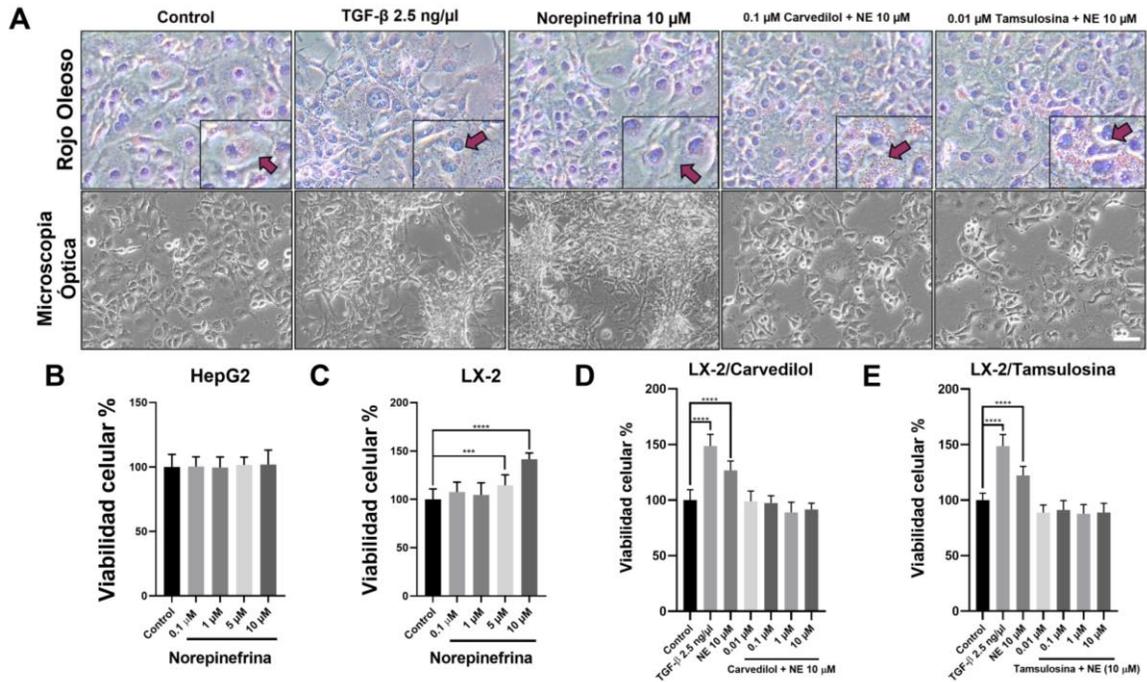
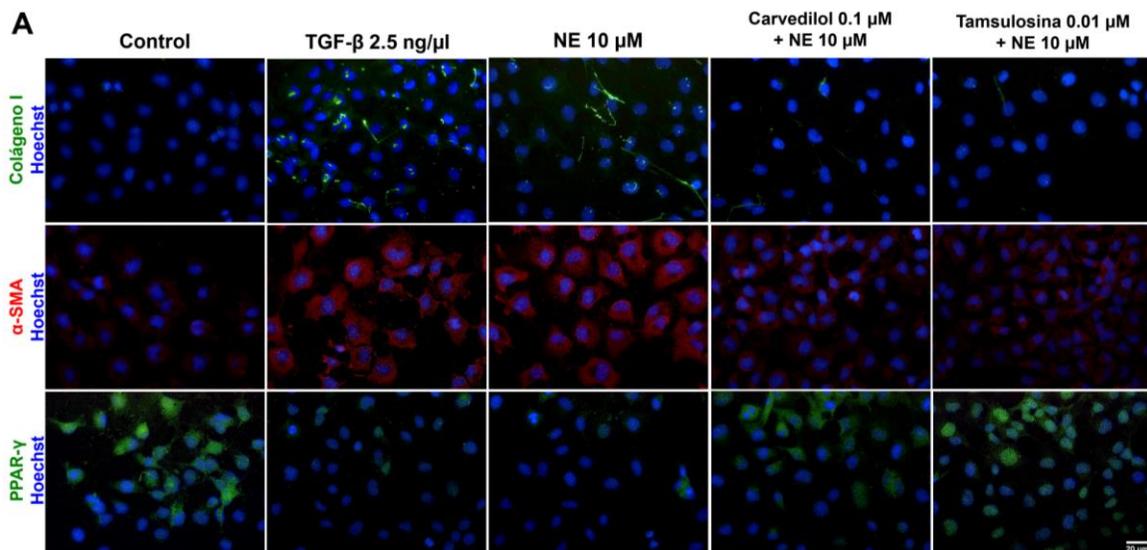


Figura 8. Tamsulosina y carvedilol redujeron la proliferación de las células LX-2 inducida por noradrenalina.

(A) En las células LX-2 se observó pérdida de gotas lipídicas (retinol) en los controles positivos de NE y TGF-β; este efecto fue revertido por los tratamientos con antagonistas de los receptores adrenérgicos (flecha). (B, C) Las mismas concentraciones de NE utilizadas en LX-2 no incrementaron la proliferación de las células HepG2. (D) Carvedilol y (E) tamsulosina regularon la proliferación de células LX-2. Los resultados se presentaron como media ± DE; (**P < 0.001; ***P < 0.0001).

7.3. La tamsulosina y el carvedilol controlan la actividad fibrogénica inducida por norepinefrina en las células LX-2

El tratamiento con norepinefrina activó el fenotipo fibrogénico de las células LX-2, como lo mostraron la tinción inmunofluorescente positiva para α -SMA y colágeno I y el aumento de la expresión de estos marcadores, junto con la reducción de PPAR- γ (Fig. 9 A, B), signos primarios de activación de las CEH además del incremento en la proliferación celular efectos comparables al control con TGF- β 1. Los antagonistas carvedilol y tamsulosina inhibieron eficazmente esta activación mediada por norepinefrina, reflejándose en la reducción de la proliferación celular en LX-2, similar al control. Asimismo, ambos fármacos suprimieron la activación dependiente de noradrenalina, al reducir la expresión de α -SMA y colágeno I e incrementar la expresión de PPAR- γ , tal como mostraron los ensayos de inmunofluorescencia y expresión génica (Fig. 9 C). Estos resultados indicaron que la norepinefrina podía promover la activación de las CEH a través de la vía α 1A-ADR y el bloqueo con tamsulosina antagonista de estos receptores inhibe este proceso.



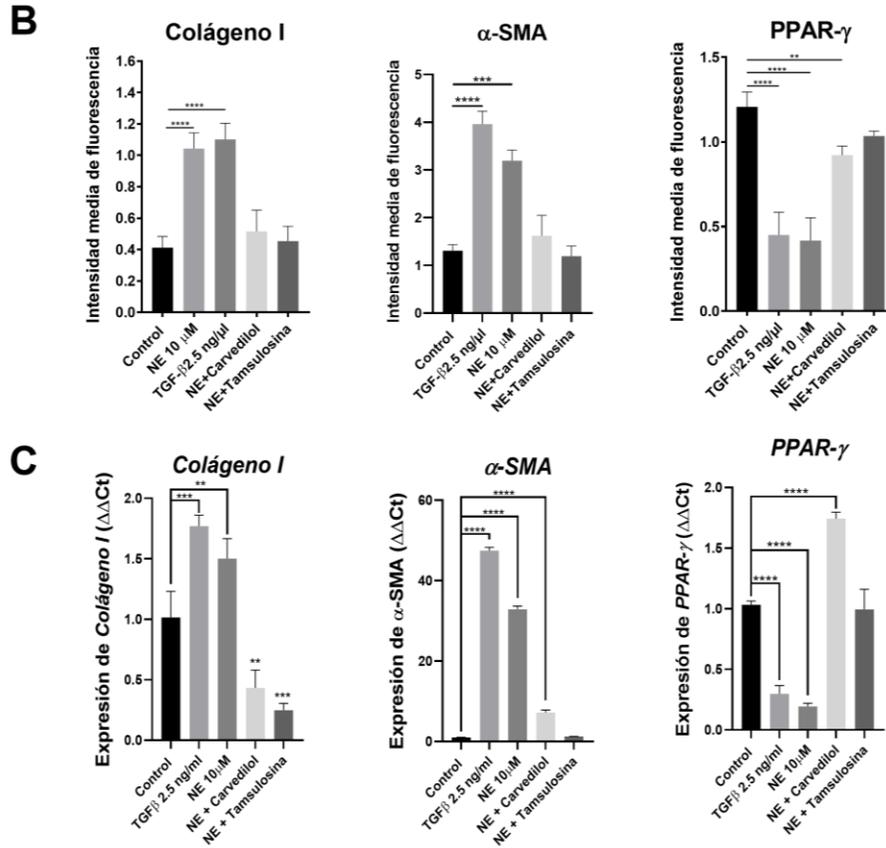
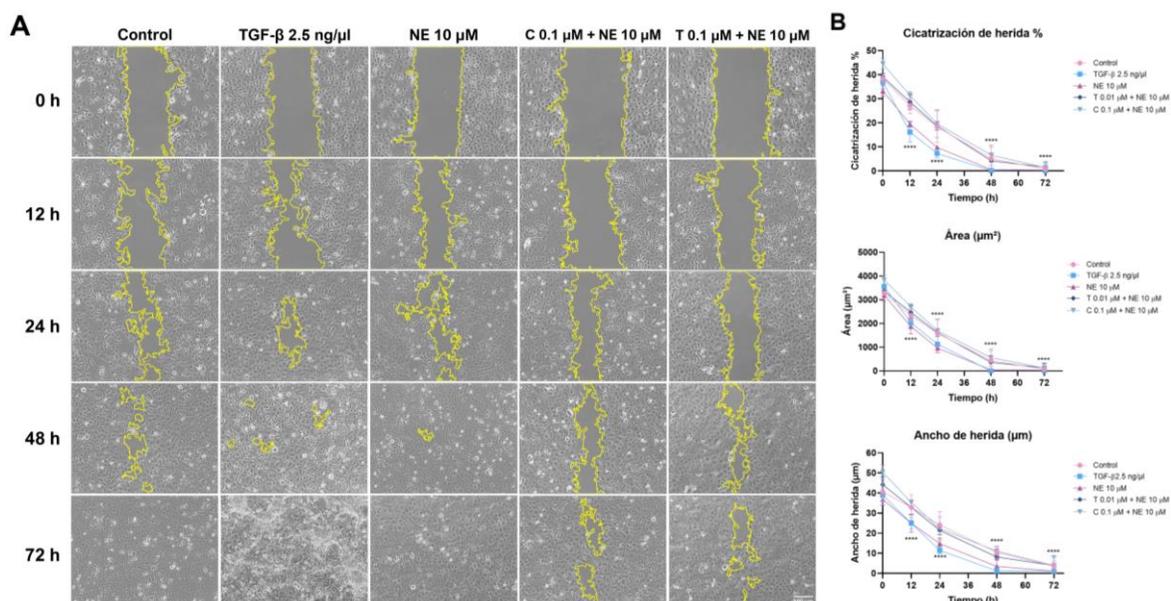


Figura 9. Carvedilol y tamsulosina modularon la actividad fibrogénica de las células estelares hepáticas.

(A, B) En las células LX-2 se observó un aumento de los marcadores fibrogénicos α -SMA y colágeno I, junto con una reducción de PPAR- γ . Por el contrario, el tratamiento con carvedilol o tamsulosina invirtió este patrón de expresión. Se cuantificó la intensidad media de fluorescencia. (C) Los ensayos de expresión génica relativa confirmaron un perfil similar al mostrado en el inmunomarcaje. Los datos se presentan como media \pm DE de tres experimentos independientes (**P = 0.0025; ***P < 0.001; ****P < 0.0001).

7.4. Efecto de carvedilol y tamsulosina sobre la migración e invasión de células estelares hepáticas

Se evaluaron las propiedades de cicatrización y migración de las células LX-2 en placas recubiertas con poli-L-lisina. Se realizó una herida por raspado en la monocapa y, a continuación, se trataron con carvedilol y tamsulosina (0.1 μM y 0.01 μM) y con noradrenalina en intervalos de 0, 12, 24 y 48 h tras el tratamiento. Bajo tratamiento con los fármacos en medio con 1% de suero, no se observó cierre completo de la herida en las primeras 24 h; el cierre alcanzó el 50% y llegó al 80% a las 48 h. En contraste, los controles positivos (10 % de suero, TGF- β 1 y norepinefrina) mostraron un cierre del 90 % a las 24 h y total a las 48 h (Fig. 10 A y B). La migración celular se analizó en insertos Transwell de 8 μm de poro, usando 10 % de suero, TGF- β 1 y norepinefrina en la cámara inferior como quimioatrayentes. Tras la incubación, se contó el número de células que atravesaron el inserto (Fig. 10 C y D). Mientras que el control positivo incrementó significativamente la migración, los tratamientos con carvedilol y tamsulosina redujeron el número de células migradas respecto al control negativo (células no tratadas).



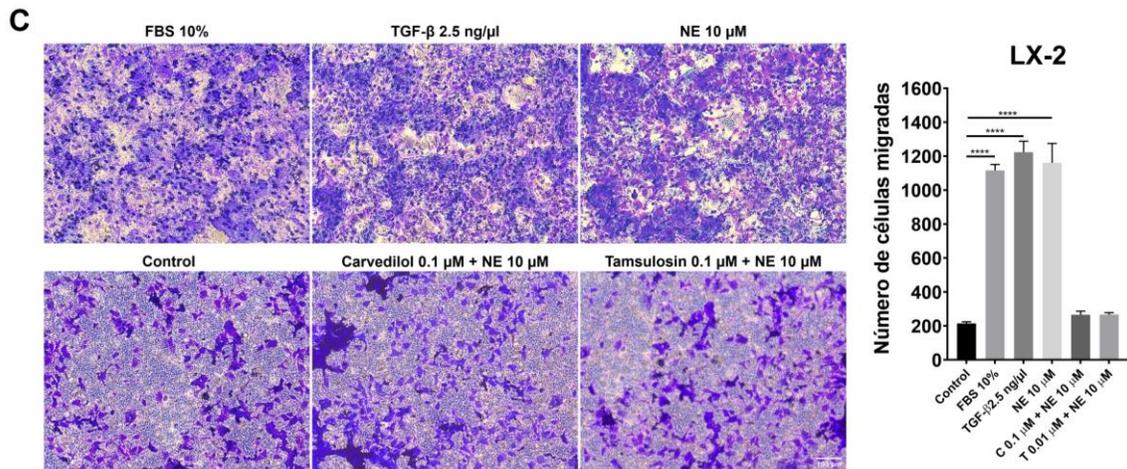


Figura 10. Efecto de los ensayos de cicatrización y migración de LX-2 con carvedilol y tamsulosina. Los ensayos de cicatrización y de migración en Transwell demostraron que los adrenobloqueadores α y β suprimieron la migración de las células LX-2, mientras que FBS al 10 %, TGF- β y norepinefrina la indujeron. (A, B) Ensayos de cicatrización. (C) Las células LX-2 migraron a través de la membrana en el montaje Transwell en un plazo de 24 h. Las imágenes representan únicamente las células migradas, teñidas de púrpura, y muestran el lado inferior de la membrana. Los datos se presentaron como media \pm DE de tres experimentos independientes (***) $p < 0.05$; ****) $p < 0.01$). Aumento: 20 \times .

7.5. Establecimiento del modelo profiláctico en rata Wistar con co-tratamiento de carvedilol y tamsulosina

En el modelo concomitante, se analizaron parámetros bioquímicos, histopatología, marcadores moleculares y alteraciones hemodinámicas y de comportamiento características de la cirrosis en ratas intoxicadas con tioacetamida. Ningún sujeto falleció en ningún grupo durante todo el experimento. A partir de la semana 4, el peso corporal disminuyó de forma continua en el grupo tratado con TAA (248 ± 15.0 g para TAA frente a 324 ± 8.0 g en el grupo intacto; *** $P < 0.0001$), reflejando un progresivo desarrollo de fibrosis hepática. Paralelamente a la pérdida de peso corporal, se observó un notable incremento en el peso del hígado de las ratas fibróticas a la semana 4, lo que provocó un aumento progresivo del índice hepático (Fig. 11).

Se observó que, en el grupo tratado con tioacetamida, el tamaño y peso hepático aumentaron debido a la inflamación y al aumento del tejido fibroso por la progresión de la enfermedad. La cápsula se presentó opaca y engrosada, y la superficie mostró múltiples nódulos pequeños, casi uniformemente distribuidos, que junto con la retracción del tejido fibroso conferirían al órgano un contorno muy irregular con palidez por alteraciones vasculares. En contraste, los hígados de los demás grupos exhibieron superficies lisas, libres de nódulos, con tonalidad rojiza.

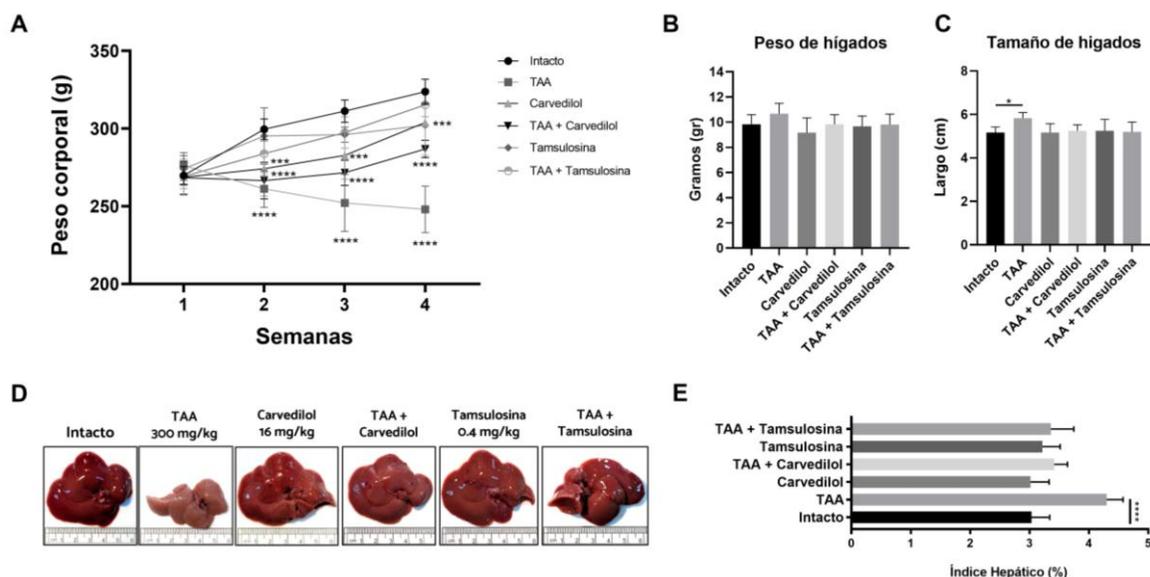


Figura 11. Modelo animal y características generales.

(A) Se registraron los cambios en el peso corporal tras 4 semanas de observación. (B, C) Tamaño y peso de los hígados. (D) Imágenes macroscópicas de los hígados intoxicados con TAA y tratados con carvedilol y tamsulosina mostraron que los grupos intacto y tratados con antagonistas adrenérgicos presentaron morfología normal, color pardo oscuro y superficie lisa, mientras que los hígados inducidos con TAA mostraron presencia de nódulos. (E) Se calculó el índice hepático según la fórmula: El Índice hepático (%) = peso del hígado/peso del cuerpo x 100%. Los índices hepáticos de las ratas tratadas con TAA aumentaron significativamente en comparación con los grupos intacto y tratados. Los datos se expresaron como media \pm DE (n = 6; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs. intacto).

7.6. Análisis histopatológico de modelo profiláctico con co-tratamiento de carvedilol y tamsulosina

Después de cuatro semanas de intoxicación con TAA, las ratas presentaron características histopatológicas relacionadas con la cirrosis hepática, con la tinción de H&E observamos una arquitectura lobulillar distorsionada, con un aumento de tejido fibroso que atraviesa el parénquima formando nódulos de regeneración, Con las tinciones especializadas tricrómica de Masson y rojo sirio se puede analizar el aumento de las fibras de colágeno, que se agrupan en septos gruesos que conectan los espacios porta entre sí y con las venas centrales, dividiendo el parénquima en islotes de hepatocitos de tamaño variable, y en zonas periportales se muestran infiltrados de células inflamatorias. También se observa que los sinusoides pierden la fenestración y aparecen colapsados, perdiendo su luz característica y dando un aspecto más compacto al parénquima, las venas centrales muestran engrosamiento de su pared y alrededores fibrosos, lo que puede indicarnos una característica de cirrosis descompensada como la hipertensión portal (flechas). En contraste el grupo intacto y los tratados únicamente con los medicamentos muestran los lóbulos hepáticos normales, definidos por la disposición radial de los cordones de hepatocitos alrededor de la vena central, sin fibras de colágeno y ausencia de nódulos de regeneración, y los grupos co-tratados con carvedilol, tamsulosina y TAA aunque muestran una reducción notable de las fibras de colágeno, se observan hepatocitos con citoplasmas eosinófilos más abundantes y núcleos pálidos o picnóticos, con vacuolización, reflejo de daño crónico y estrés celular indicando regeneración compensatoria (Fig. 12).

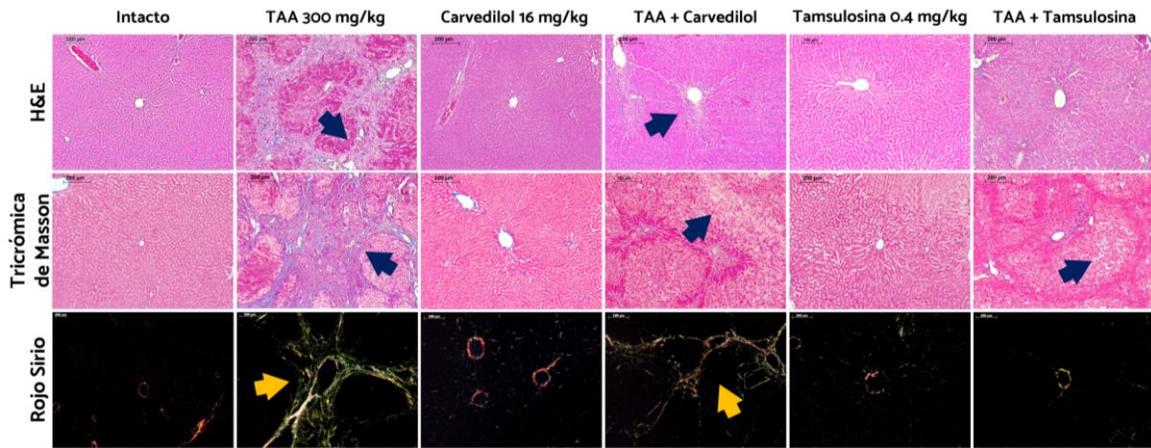


Figura 12. Análisis histopatológico del modelo concomitante de cirrosis hepática.

(A) Histológicamente, el grupo TAA se caracteriza por lobulillos hepáticos distorsionados por septos fibrosos que forman nódulos de regeneración, dando lugar a islotes de hepatocitos con infiltrado inflamatorio periportal y sinusoides capilarizados colapsados; en contraste, los grupos intacto y tratados solo con carvedilol y tamsulosina mantuvieron arquitectura lobulillar radial, ausencia de fibrosis y nódulos. Los animales co-tratados con los medicamentos y el hepatotóxico presentaron menor depósito de colágeno, con hepatocitos con citoplasmas eosinófilos, núcleos picnóticos y vacuolización. Aumento: 10×; barra de escala: 200 μm.

Ambas tinciones especializadas rojo sirio y tricrómica de Masson detectaron eficazmente el colágeno alrededor de los tractos portales. El área proporcional de colágeno se correlaciona con las puntuaciones Metavir y marcadores séricos de fibrosis. En el grupo TAA, el área positiva a colágeno alcanzó un 16.20 % con la tinción de rojo sirio, correspondiente a fibrosis avanzada (F3–F4), mientras que con carvedilol y tamsulosina el colágeno se redujo a 5.90 % y 2.53 %, respectivamente, indicativo de fibrosis leve a moderada (F1–F2) (Fig. 13).

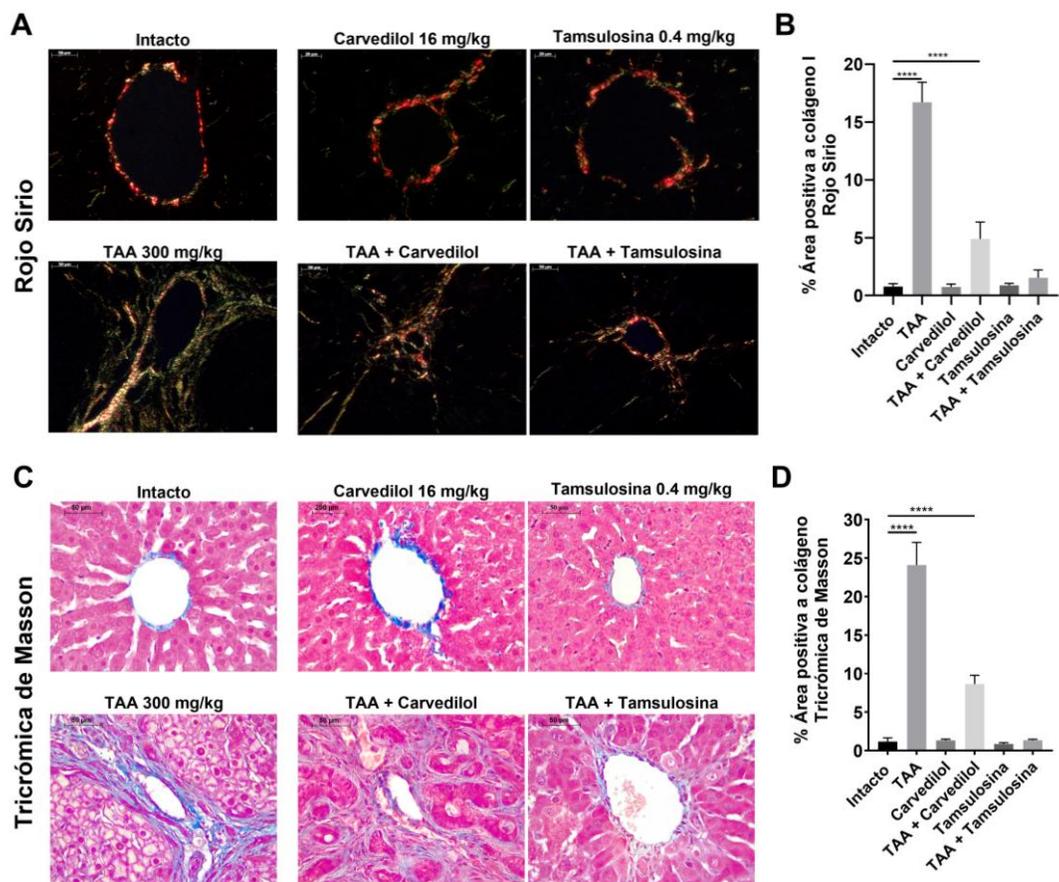


Figura 13. Análisis morfométrico del área proporcional de colágeno en modelo concomitante. (A, B) La tinción con rojo sirio reveló áreas positivas para colágeno I (rojo) y colágeno III (verde), predominantes en el grupo TAA frente a los tratados con carvedilol y tamsulosina. (C, D) La tricrómica de Masson mostró el porcentaje de área positiva para colágeno, con análisis morfométrico indicando una diferencia significativa entre el grupo TAA y el tratado con tamsulosina. Las proporciones del área teñida se ilustraron en fotomicrografías (aumento 20×; barra de escala, 20 μ m). Los datos se presentaron como media \pm DE (n = 6; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs. intacto).

7.7. Marcadores bioquímicos de función hepática en modelo concomitante

Se determinaron los indicadores bioquímicos de daño hepático en sangre de los grupos TAA, intacto, únicamente los medicamentos y co-tratados con carvedilol y tamsulosina (Tabla 9). En las ratas tratadas con TAA, se observaron aumentos significativos de las enzimas de daño hepático AST, ALT y fosfatasa alcalina en comparación con los grupos intacto y tratados, en los que ambos fármacos

previnieron el daño a los hepatocitos. Por el contrario, la glucosa y la albúmina se redujeron en el grupo TAA respecto al grupo intacto, mientras que con los tratamientos de carvedilol y tamsulosina ambos parámetros aumentaron y alcanzaron los niveles esperados. Estos resultados muestran una recuperación en la función hepática con el co-tratamiento de carvedilol y tamsulosina posiblemente debido a la recuperación de su morfología y refuerza su capacidad para sintetizar proteínas.

Tabla 9. Marcadores bioquímicos de función hepática en modelo concomitante.

	Intacto	TAA	Carvedilol	TAA + Carvedilol	Tamsulosina	TAA + Tamsulosina
Glucosa (mg/dL)	107 ± 9	65 ± 7****	117 ± 8	89 ± 11*	111 ± 9	99 ± 8
Albumina (g/dL)	3.2 ± 0.24	2.3 ± 0.16****	3.4 ± 0.27	3.5 ± 0.29	3.2 ± 0.27	3.1 ± 0.11
Urea (mg/dL)	39 ± 3	75 ± 6****	37 ± 4	44 ± 4	34 ± 1	41 ± 3
AST (U/L)	135 ± 19	681 ± 75****	170 ± 29	249 ± 40***	121 ± 12	157 ± 34
ALT (U/L)	52 ± 7	313 ± 25****	49 ± 45	136 ± 30****	45 ± 8	65 ± 23
Fosfatasa alc (U/L)	340 ± 23	970 ± 86****	389 ± 91	542 ± 68***	404 ± 55	403 ± 62

Datos representados como media ± DE

*** $P= 0.0187$ Intacto vs. TAA + Carvedilol.

*** $P= 0.0005$ Intacto vs. TAA + Carvedilol.

**** $P<0.0001$ Intacto vs. TAA.

TAA: tioacetamida; ALT: alanino aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; Fosfatasa alc: fosfatasa alcalina.

7.8. Expresión y cuantificación de marcadores fibrogénicos y hepatoprotectores.

Se evaluaron marcadores clave de fibrosis hepática y, tras el tratamiento con carvedilol y tamsulosina, se registraron disminuciones en los niveles de colágeno I y III. Asimismo, se observó una reducción en la expresión de la proteína α -SMA, indicador de activación de células estelares hepáticas y una menor expresión de MMP-9, MMP-13, TIMP1 y TIMP2 (Fig. 14). Estos resultados no difirieron significativamente de los del grupo control intacto, lo que respaldó los posibles efectos antifibróticos de los adrenobloqueadores y sugirió que la inactivación de las células estelares hepáticas no pudo atribuirse de manera exclusiva al tratamiento con estos fármacos.

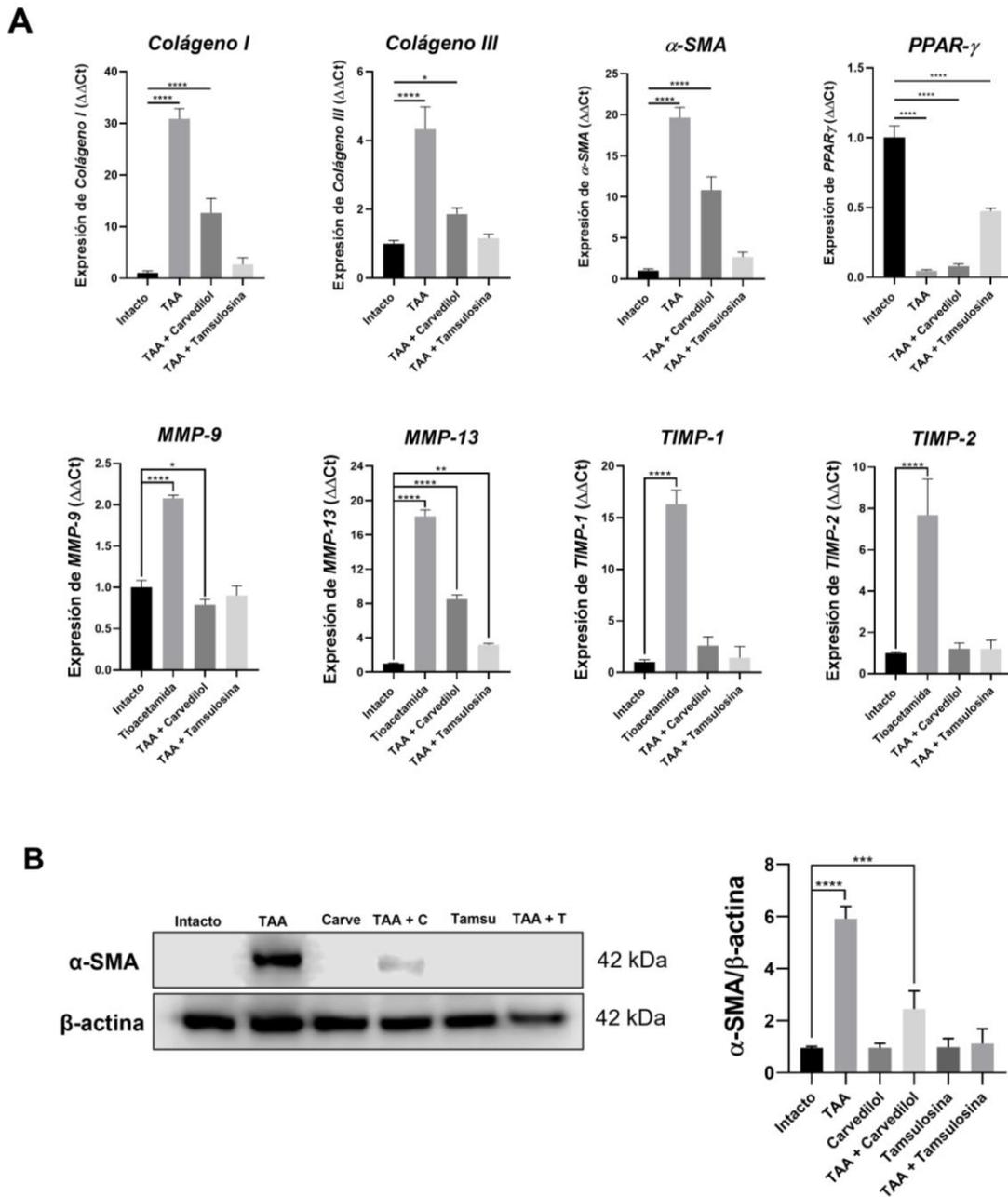


Figura 14. Expresión de marcadores fibrogénicos tras el tratamiento con carvedilol y tamsulosina en ratas con fibrosis inducida por TAA.

(A) Los niveles de ARNm de Colágeno I, Colágeno III, α-SMA, PPAR-γ, MMP9, MMP13, TIMP1 y TIMP2 en hígados de ratas cirróticas tratadas con carvedilol y tamsulosina se normalizaron frente al gen de referencia endógeno (β-actina) y mostraron una reducción en comparación con las ratas inducidas con TAA. (B) Análisis representativo de Western blot para α-SMA en hígados. (C) Cuantificación por densitometría. Los valores se expresaron como media ± DE (n = 6; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs. grupo intacto).

7.9. La tamsulosina y el carvedilol regulan la presión portal y arterial en un modelo concomitante de fibrosis hepática.

Se investigó la hemodinámica sistémica y portal en un modelo cirrótico, observándose alteraciones significativas en la presión portal y la presión arterial media. Tras 4 semanas de inducción con tioacetamida, las ratas desarrollaron síndrome hipertensivo portal en comparación con el grupo intacto (13 ± 2.16 vs. 7.3 ± 2.64 mmHg; $P < 0.001$). En el grupo TAA, también se registró hipotensión sistémica frente al grupo intacto (68 ± 30.6 vs. 103 ± 11.36 mmHg; $P = 0.0361$). Por el contrario, los grupos tratados con carvedilol y tamsulosina no mostraron signos de hipertensión portal ni de hipotensión sistémica, presentando presiones de 7.6 ± 2.75 y $7.64 \pm 1,32$ mmHg, comparables al grupo intacto (fig. 15).

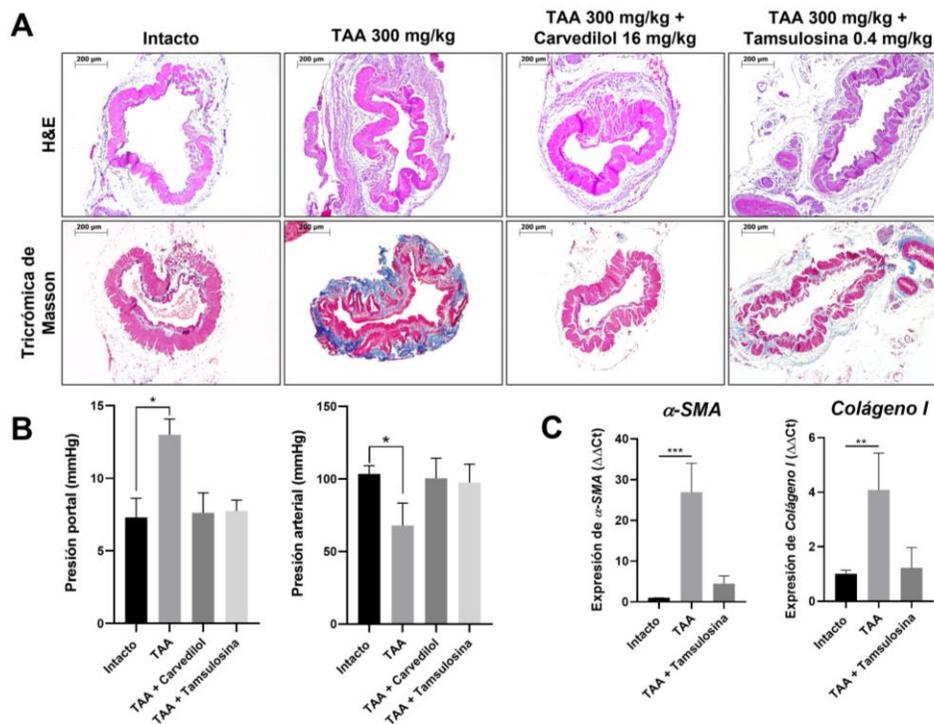


Figura 15. Efecto de tamsulosina y el carvedilol en la regulación de la presión portal y arterial. (A) Histología de la vena porta tras la lesión hepática inducida por TAA, se observa acumulación de colágeno en la túnica media (hematoxilina-eosina, tricrómica de Masson). (B) Presión portal y arterial, el grupo TAA muestra una hipertensión portal e hipotensión. (C) Los niveles de ARNm de α -SMA y Colágeno I. Los valores se expresaron como media \pm DE ($n = 6$; * $P < 0.001$ vs. TAA).

7.10. Regulación del comportamiento en ratas fibróticas tratadas con tamsulosina: encefalopatía hepática asociada a hiperamonemia

La administración de TAA mostró un aumento notable de los niveles de amoníaco hepático de 4 veces, en comparación con las ratas intactas. Los niveles de amoníaco hepático disminuyeron significativamente en el grupo TAA + carvedilol y TAA + tamsulosina 52.1 % y un 72.3 %, respectivamente, en comparación con el grupo TAA (Fig. 16 B). Se analizó la actividad locomotora voluntaria, análisis de campo abierto y reconocimiento de objetos y se demostró que la actividad motora general, la frecuencia de exploración y los signos exploratorios fueron significativamente inferiores en el grupo tratado con TAA. En 4 semanas de inducción con TAA, la actividad motora voluntaria disminuyó 200%, mientras que el comportamiento exploratorio el índice de discriminación y el índice de preferencia disminuyeron un 0.55 y 28.48%, respectivamente; sin embargo, los tratamientos con carvedilol y tamsulosina aumentaron la actividad locomotora diaria debido a una recuperación de la fibrosis hepática evitando una hiperamonemia (Fig.16 C).

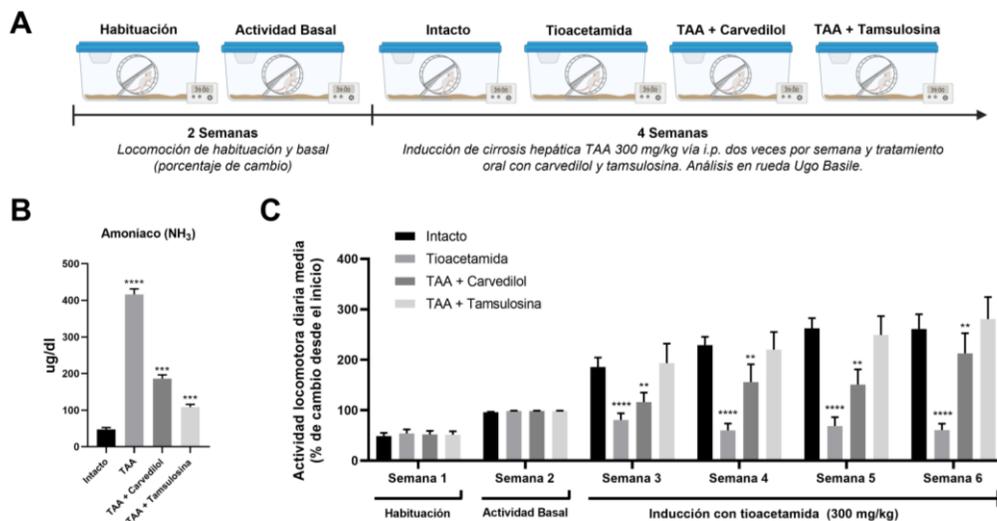
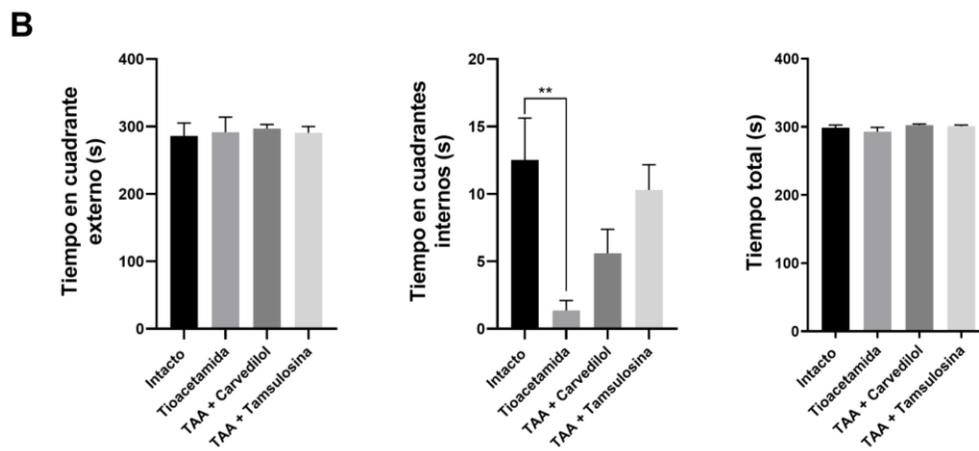
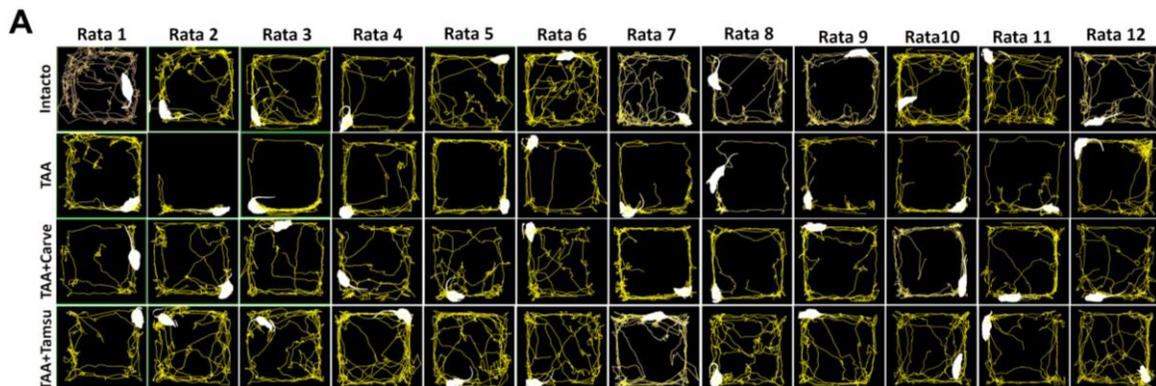


Figura 16. Actividad locomotora voluntaria y niveles de amonio sérico en los grupos experimentales durante 4 semanas.

(A) Esquema del protocolo experimental. (B) El grupo TAA mostró un incremento de 8.81 veces en la concentración sérica de amonio ($P < 0.0001$). (C) La actividad locomotora se cuantificó a diario, promediando los registros por jaula. La inducción con TAA comenzó en la segunda semana,

manteniéndose hasta la cuarta semana; de manera simultánea, se administraron carvedilol y tamsulosina y se evaluó la locomoción. Los datos se expresaron como media \pm DE (n = 12; **P = 0,0025; ***P < 0,001; ****P < 0,0001).

En el ensayo de campo abierto, las ratas del grupo TAA presentaron un incremento significativo del tiempo de inmovilidad y una reducción marcada en la frecuencia de exploración, el tiempo en los cuadrantes internos y la distancia recorrida tanto en zonas internas como externas, en comparación con el grupo intacto. Estos hallazgos reflejaron un aumento de la conducta ansiosa, así como un deterioro del comportamiento exploratorio y de la actividad locomotora. Por el contrario, el tratamiento con tamsulosina y carvedilol reguló la conducta ansiosa y restauró la frecuencia de exploración y la locomoción, evidenciado por una disminución significativa del tiempo de inmovilidad y un notable aumento de la frecuencia de exploración y del tiempo transcurrido en los cuadrantes internos respecto a las ratas cirróticas (Fig. 17).



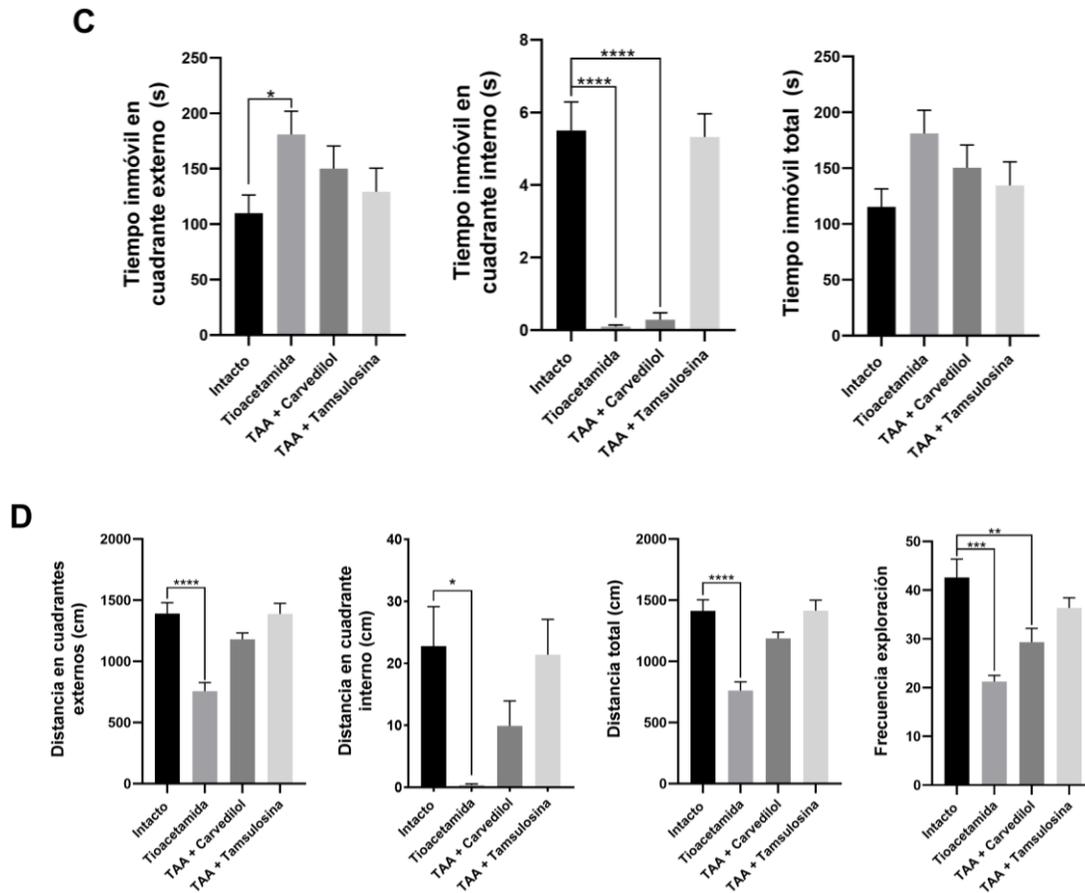
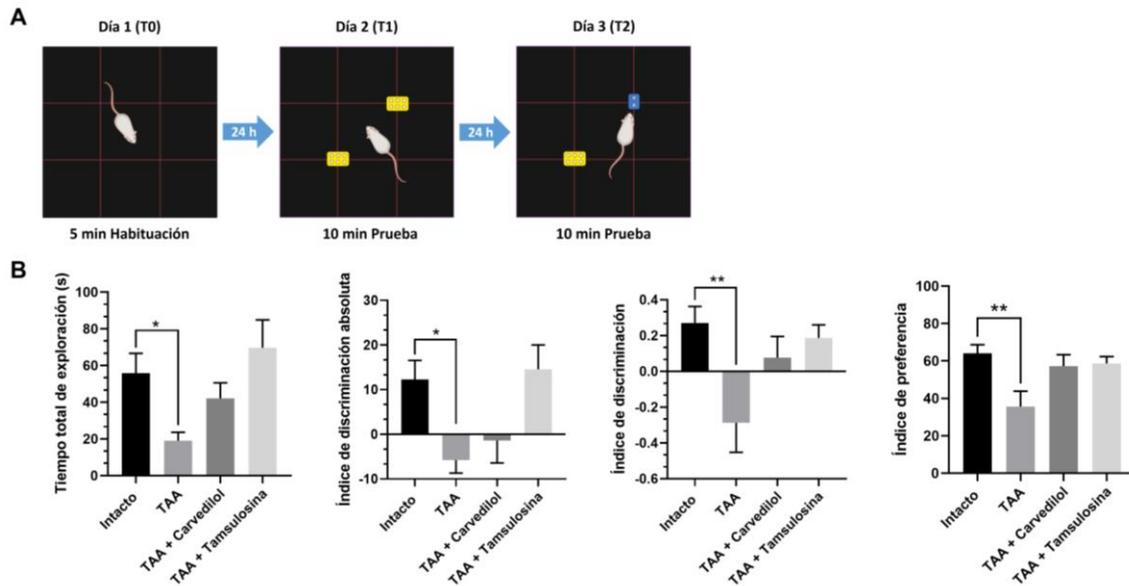


Figura 17. Efecto de carvedilol y tamsulosina en la prueba de campo abierto.

(A) fotograma de campo abierto de 12 ratas por grupo. (B) Las ratas tratadas con TAA mostraron un aumento del tiempo de inmovilidad y una disminución en la frecuencia de exploración, el tiempo en cuadrantes internos y la distancia recorrida, indicando ansiedad y disminución de la actividad locomotora. El tratamiento con tamsulosina y carvedilol redujo significativamente la inmovilidad y restauró la exploración y el tiempo en cuadrantes internos, normalizando la conducta ansiosa y locomotora. Los medicamentos normalizaron la prueba. Los valores se expresaron como media \pm DE (n = 12; *P= 0.0190 vs. Intacto, **P= 0.0041 vs. Intacto).

Con respecto a la prueba de reconocimiento de objetos, en la fase de prueba, las ratas tratadas con TAA mostraron una incapacidad para distinguir entre objetos familiares y nuevos. Sin embargo, las ratas que recibieron TAA y tamsulosina pasaron más tiempo explorando el objeto nuevo, efecto similar con el co-tratamiento con carvedilol (Fig. 18).



7.11. Establecimiento del modelo terapéutico en rata Wistar con carvedilol y tamsulosina

El modelo terapéutico con el tratamiento de ambos adrenobloqueadores se llevó a cabo por 6 semanas, las ratas se dividieron en 5 grupos: intacto (sin ningún tipo de experimentación), tioacetamida (grupo cirrótico), vehículo (agua potable donde se disolvieron los medicamentos), carvedilol y tamsulosina, A lo largo del experimento se registró el peso corporal y, al término, se determinaron marcadores bioquímicos de función hepática (AST, ALT, fosfatasa alcalina y albúmina) y se practicó un análisis histopatológico. A lo largo del experimento se registró el peso corporal y, al término, se determinaron marcadores bioquímicos de función hepática (AST, ALT, fosfatasa alcalina y albúmina) y se practicó un análisis histopatológico. Ningún sujeto falleció en ningún grupo durante

todo el experimento. A partir de la semana 6 todos los sujetos excepto los del grupo intacto, tuvieron una disminución en el peso corporal forma continua (304 ± 8.57 g vs. 331.75 ± 11.13 g del grupo intacto; $***P < 0.0001$), reflejando un progresivo desarrollo de fibrosis hepática. Otro signo que se observó fue un notable incremento en el peso y tamaño del hígado de las ratas fibróticas y del grupo con vehículo a la semana 6, lo que provocó un aumento progresivo del índice hepático (Fig. 19 A-E).

El análisis macrométrico reveló que los hígados de los grupos TAA y placebo presentaron una superficie irregular salpicada de nódulos grandes y pequeños con contorno fragmentado por la retracción del tejido fibroso. En contraste, los hígados de los grupos intacto, carvedilol y tamsulosina exhibieron un incremento de volumen y peso, superficies lisas y libres de nódulos (Fig. 19 B).

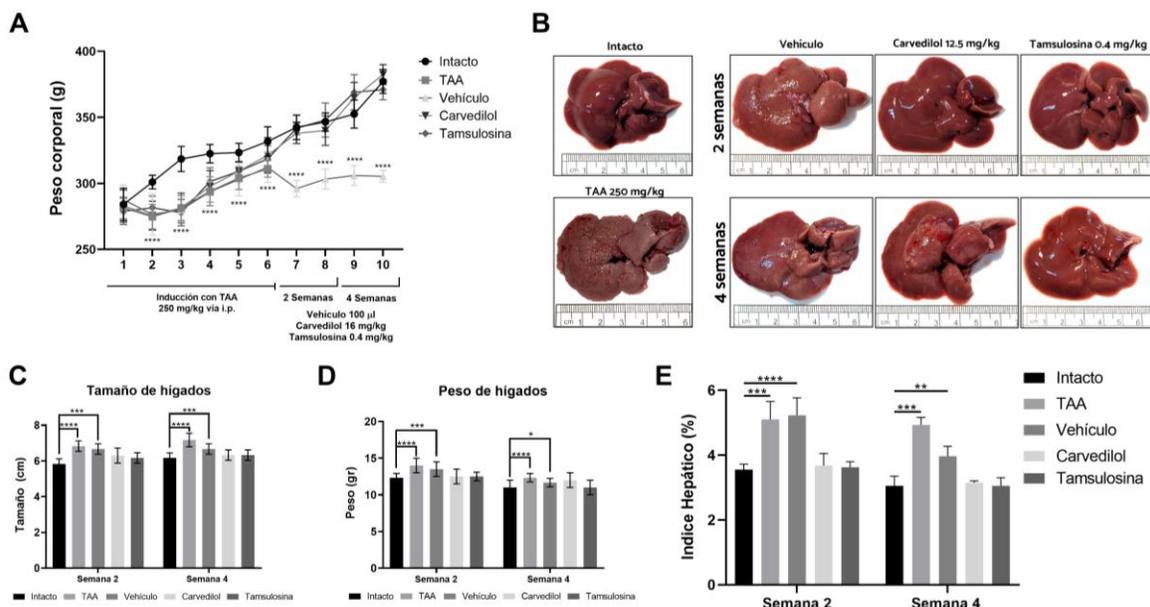


Figura 19. Peso y tamaño de hígados de ratas con tratamiento con carvedilol y tamsulosina.

Las ratas inducidas con tioacetamida y el grupo vehículo al que se le dió agua muestran una disminución en el peso de los hígados comparados con el grupo intacto mostraron disminución del peso corporal después de la inducción de cirrosis. Los tratamientos con carvedilol y tamsulosina mostraron aumento de peso corporal y regulación del índice hepático. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar ($n=6$). *Estadísticamente significativo en comparación con el control (células intactas) ($*P= 0.0373$, $**P= 0.0003$, $****P < 0.0001$) por análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de Dunnett.

7.12. Análisis histopatológico de modelo terapéutico con carvedilol y tamsulosina

En el modelo terapéutico, el tratamiento con carvedilol y tamsulosina promovió una reversión hepática, destacando una recuperación más eficiente a las 4 semanas con tamsulosina. Este fármaco favoreció la proliferación de hepatocitos y su repoblamiento en focos de extinción parenquimatosa, donde antes se encontraban más células inflamatorias. La reabsorción del colágeno mejoró la remodelación del tejido dañado y permitió la formación de placas hepáticas con arquitectura casi normal. Aunque en el grupo tratado con vehículo también se observaron signos de reversión, el tratamiento farmacológico promovió una regeneración más ordenada de los hepatocitos. Además, las tinciones tricrómica de Masson y rojo Sirio mostraron una mayor disminución de las fibras de colágeno en el grupo tratado con tamsulosina después de 2 y 4 semanas, lo que sugiere un mejor efecto antifibrótico en comparación con la regeneración endógena y el tratamiento con carvedilol (Fig. 20).

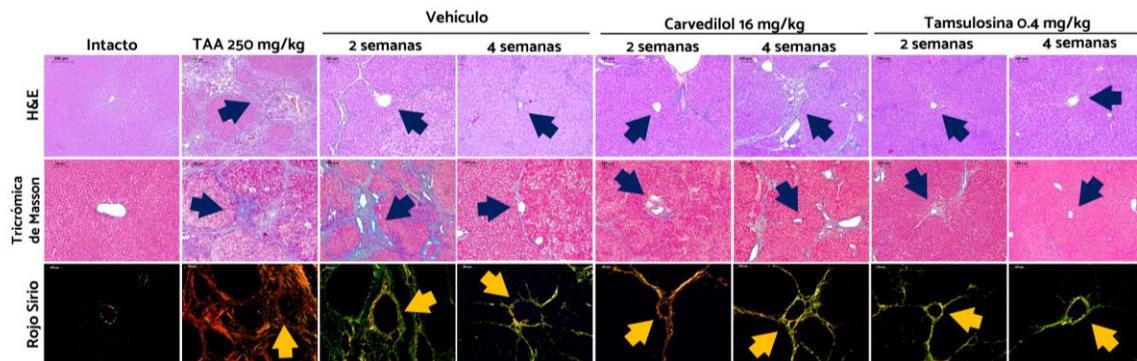


Figura 20. Análisis histopatológico de modelo terapéutico de cirrosis hepática con carvedilol y tamsulosina.

El grupo TAA y vehículo a las 2 semanas se caracterizó por septos fibrosos vascularizados que unieron los tractos portales entre sí y con las venas centrales, dando lugar a islotes de hepatocitos rodeados de septos fibrosos y sin vena central. El tratamiento con carvedilol y tamsulosina redujo cambios morfológicos relacionados con fibrosis hepática, siendo la tamsulosina más eficaz a la cuarta semana. El grupo intacto presentó un parénquima normal, con hepatocitos organizados en lóbulos que irradiaban desde una vena central y tejido conectivo habitual. Aumento: 10×; barra de escala: 200 μm.

Las tinciones especializadas rojo sirio y tricrómica de Masson detectaron eficazmente el colágeno alrededor de los tractos portales. El área proporcional de colágeno se correlaciona con las puntuaciones Metavir y marcadores séricos de fibrosis. En el grupo TAA, el área positiva a colágeno alcanzó un 16.70 % con la tinción de rojo sirio, correspondiente a fibrosis avanzada (F3–F4), aunque el tratamiento con el vehículo disminuyó (7.68% a las 2 semanas y 10.12% a las 4 semanas) los tratamientos con carvedilol y tamsulosina la colágena se redujo a 13.46% y 14.70%, respectivamente, indicativa de fibrosis leve a moderada (F1–F2) (Fig. 21).

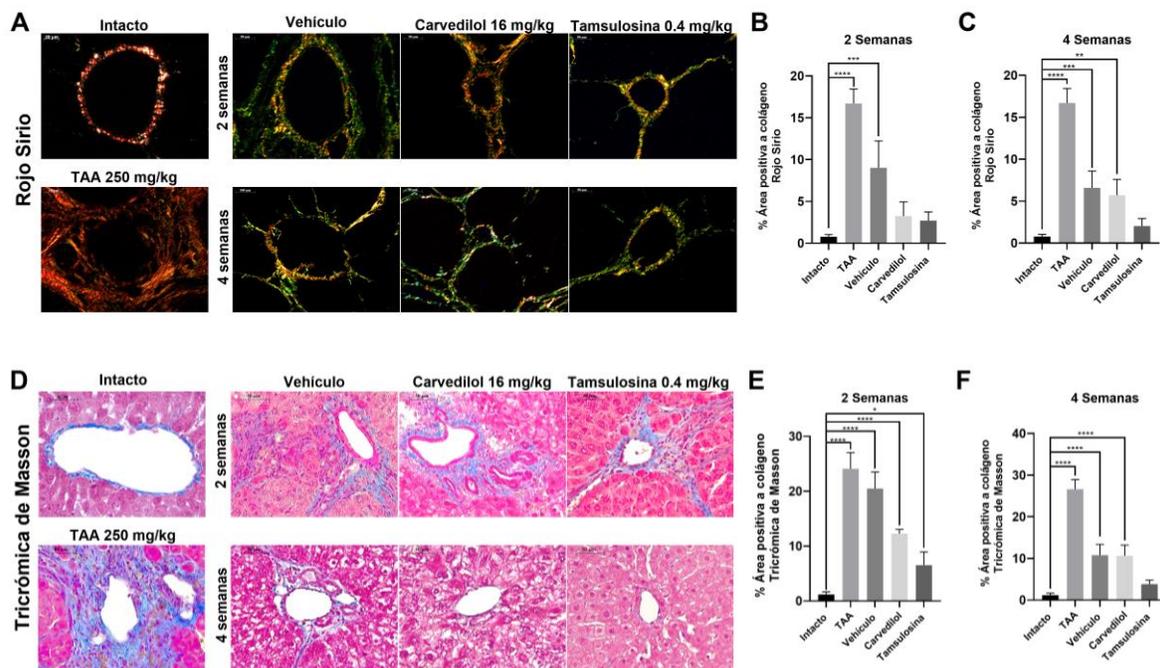


Figura 21. Análisis morfométrico del área proporcional de colágeno en modelo terapéutico.

(A, B, C) La tinción con rojo sirio reveló áreas positivas para colágeno I (rojo) y colágeno III (verde), predominantes en el grupo TAA, vehículo de 2 semanas y carvedilol 4 semanas frente a los tratados con carvedilol y tamsulosina de 2 y 4 semanas de tratamiento se observa también un recambio en el tipo de colágeno de I a III en la reversión de la fibrosis. (D, E, F) La tricrómica de Masson mostró el porcentaje de área positiva para colágeno, con una diferencia significativa entre todos los grupos excepto el tratado con tamsulosina a 4 semanas. Las proporciones del área teñida se ilustraron en fotomicrografías (aumento 20×; barra de escala, 20 μ m). Los datos se presentaron como media \pm DE (n = 6; *P= 0.0124; **P= 0.0013, ***P= 0.0001; ****P <0.0001).

7.13. Marcadores bioquímicos de función hepática en modelo terapéutico

Se evaluaron los marcadores séricos de daño hepático en el modelo terapéutico de cirrosis hepática, en los grupos intacto, TAA, vehículo y los tratados con carvedilol o tamsulosina durante 2 y 4 semanas. Tanto el grupo expuesto a TAA como el que solo recibió vehículo (agua) como tratamiento presentaron incrementos significativos en AST, ALT y fosfatasa alcalina frente a los animales intactos y a los que recibieron los carvedilol y tamsulosina por 2 y 4 semanas, evidenciándose en estos últimos un aumento en la reversión de la fibrosis hepática, demostrando ser un posible tratamiento terapéutico. Por su parte, la albúmina es el principal marcador de capacidad de síntesis de proteínas y en el grupo TAA y vehículo se observó un decremento significativo respecto al intacto; sin embargo, con la administración de carvedilol o tamsulosina aumentaron los niveles séricos indicando una clara mejora en la función bioquímica de producción de proteínas en los hepatocitos además de disminuir marcadores de lesión hepatocelular como AST y ALT y fosfatasa alcalina (Tabla 10).

Tabla 10. Marcadores bioquímicos de función hepática en modelo terapéutico.

	Intacto	TAA	Vehículo		Carvedilol		Tamsulosina	
			2 semanas	4 semanas	2 semanas	4 semanas	2 semanas	4 semanas
AST (U/L)	99 ± 6	150.7 ± 8.5****	143.3 ± 14.6**	135 ± 10***	108 ± 1.0	117.5 ± 4	108 ± 6.0	115 ± 7
ALT (U/L)	23 ± 2	79.3 ± 7.5*****	75.7 ± 4.6***	68.5 ± 3.5****	58.0 ± 3.0	56 ± 4	44 ± 4.0	44 ± 4.0
Albumina (g/dL)	3.5 ± 0.05	2.2 ± 0.3****	2.7 ± 0.2****	2.85 ± 0.25*	3.3 ± 0.4	3.7 ± 0.1	4.0 ± 0.2	3.4 ± 0.1
Fosfatasa alcalina (U/L)	308 ± 7	1023 ± 96*****	830.7 ± 93.9*****	903 ± 72****	336.5 ± 18.5	323 ± 31	321 ± 4.0	328 ± 4.7

Datos representados como media ± DE

* $P=0.0102$, ** $P=0.0055$, *** $P<0.0006$, **** $P<0.0001$

TAA: tioacetamida; ALT: alanino aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demostró el efecto del antagonista de los receptores adrenérgicos α_1 , tamsulosina, en la posible actividad fibrogénica de las células estelares hepáticas LX-2 y su efecto como posible tratamiento antifibrótico en cirrosis hepática.

Tamsulosina, un antagonista adrenérgico α_1 , podría tener un efecto dual sobre la fibrosis hepática. La inactivación de las células estelares hepáticas y su biotransformación que no tiene efectos citotóxicos para los hepatocitos, que posiblemente estén encargados de repoblar el parénquima hepático, gracias a su efecto farmacológico de antagonista similar al de prazosina y doxazosina, evitando los eventos de la perpetuación y causando menos efectos secundarios a las células hepáticas en comparación con otros antagonistas con actividad antifibrótica probados (Fig. 7) (Medina Pizaño, et al., 2023; J. Oben, 2003).

En las células estelares hepáticas, la norepinefrina activa los adrenoreceptores α_1 , iniciando una señalización acoplada a proteínas G. Esta activación estimula la fosfolipasa C- β (PLC- β), que genera inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ moviliza calcio desde los depósitos intracelulares, mientras que el DAG activa la proteína quinasa C (PKC) (Serna-Salas et al., 2022; Xiao et al., 2001). Estas señales promueven la contracción, proliferación y transcripción de genes profibróticos como TGF- β_1 , colágeno I y α -SMA. (Oben, 2004) demostró que prazosina y propranolol atenúan la proliferación inducida por NE en cultivos primarios de CEH, lo que resalta el papel de la señalización adrenérgica en la fibrogénesis; sin embargo, tamsulosina, un antagonista selectivo α_1A basado en sulfonamida, posiblemente también inhibe estas vías estimuladas por NE previamente descritas. Esta

modulación podría atenuar la activación de las células estelares y las respuestas fibrogénicas, contribuyendo así a la reducción de la fibrosis hepática.

A diferencia de los antagonistas $\alpha 1$ basados en quinazolina por ejemplo, doxazosina, prazosina, terazosina, la tamsulosina no induce apoptosis en las CEH (Batty et al., 2016; Kyprianou & Benning, 2000). Por tanto, podría favorecer la preservación y regeneración del parénquima hepático durante la resolución de la fibrosis, apoyando potencialmente la remodelación tisular sin inducir daño celular adicional. Carvedilol es un β -bloqueador no selectivo con propiedades adicionales de bloqueo $\alpha 1$. Al bloquear los adrenoreceptores β , carvedilol inhibe la activación de la adenilil ciclasa, reduciendo los niveles de AMPc y la señalización a través de PKA. Esto puede limitar la proliferación, la angiogénesis y la expresión de genes proinflamatorios. (Oben & Diehl, 2004) sugieren que carvedilol puede inhibir la progresión de la fibrosis hepática al reducir la activación adrenérgica de las CEH, suprimir la expresión de TGF- $\beta 1$ y limitar la deposición de matriz extracelular. Su acción dual hace que carvedilol sea particularmente eficaz para contrarrestar tanto la hipertensión portal como la fibrogénesis; sin embargo, aunque prometedor, se requieren más estudios para confirmar su seguridad en pacientes con insuficiencia hepática.

Estudios recientes han documentado una disminución del marcador PPAR- γ en CEH activadas (Ohata et al., 1997; Serna-Salas et al., 2022). No obstante, la activación de la señalización de PPAR- γ en estas células reduce la producción de colágeno tipo I (Carson et al., 2021) y favorece la reversión a un estado quiescente (Miyahara et al., 2000). La Figura 9 muestra que los niveles transcripcionales de PPAR- γ , se correlacionan con el almacenaje de gotitas lipídicas (Fig. 8) en células estelares hepáticas en estado quiescente, y estas características aumentan con los antagonistas de receptores adrenérgicos α y β como

pretratamiento después de un inductor de activación fibrogénica como NE y TGF- β . Además, las CEH regulan genes relacionados con la absorción y el metabolismo de ácidos grasos, y el proceso de daño y reparación en la enfermedad hepática crónica implica adhesión celular, migración, proliferación, apoptosis y cicatrización (Chang et al., 2008). La migración de CEH activadas, componente clave tanto en la cicatrización como en la fibrogenesis hepática, ha sido consistentemente observada en estudios *in vitro* e *in vivo* (Ezhilarasan et al., 2016; Song et al., 2016), nuestros resultados sugieren que el tratamiento con tamsulosina es efectivo para retardar estas características de la perpetuación (Fig. 10).

El principal hallazgo de este trabajo es que, tamsulosina en comparación carvedilol un α y β adrenobloqueador presenta un mejor efecto en la inactivación de las células estelares hepáticas principales responsables de la producción de componentes de la matriz extracelular. En un modelo concomitante de ratas cirróticas con hipertensión portal e hiperamonemia, el tratamiento oral de 4 semanas con carvedilol y tamsulosina, reguló significativamente la fibrosis hepática y mejoró la hipertensión portal, además se normalizó la presión arterial media, preservando así la hemodinamia sistémica y reduciendo la hiperamonemia. Los resultados sugieren que tamsulosina disminuye la resistencia hepática al promover la reducción de la fibrosis mediante la inactivación de las CEH. De la misma manera en un modelo terapéutico de dos y cuatro semanas de tratamiento con carvedilol y tamsulosina posterior a la inducción de cirrosis hepática, hay una reversión de la fibrosis hepática y una mejora en marcadores de función hepática en comparación con el grupo vehículo, debido a que (Calvillo-Robledo et al., 2024) han demostrado que el hígado de rata puede auto-recuperarse de manera notable después de dos semanas.

La tamsulosina redujo significativamente la fibrosis hepática, como se evidenció en la disminución del área fibrótica en los cortes hepáticos teñidos con Rojo Sirio y Tricrómica de Masson, así como en la disminución de la expresión de ARNm de colágeno tipo I en comparación con el grupo intoxicado con TAA. También se observó una reducción en la expresión de α -SMA tanto a nivel de ARNm como de proteína, lo que sugiere que esta disminución en la activación de las CEH podría deberse a su inactivación. Estos resultados se comprueban con las técnicas *in vitro* en donde las células LX-2 tratadas con tamsulosina redujeron significativamente la expresión génica de colágeno I y α -SMA y mantuvieron la expresión de PPAR- γ en comparación con las tratadas con TGF- β 1 y NE, corroborándose con una menor proliferación, migración y activación retardada.

Se demostró que los modelos donde se induce fibrosis con TAA en dosis mayores a 250 mg/kg también se produce hiperamonemia factor clave en la encefalopatía hepática (El-Marasy et al., 2019), con niveles séricos de amonio significativamente superiores a los controles, y también provocó deterioro neuromotor y cognitivo, las ratas TAA mostraron empeoramiento de la coordinación motora, la actividad exploratoria y el aprendizaje espacial, junto con prolongación del tiempo de exploración en el test de objeto novedoso y comportamientos irritables indicativos de un estado maníaco (Dadsetan et al., 2016). El tratamiento con carvedilol y tamsulosina revirtió estos efectos, normalizando los niveles de amonio y mejorando de forma significativa la locomoción, la memoria no espacial, la exploración en el campo abierto (más tiempo en el centro, más cruces de línea, frecuencia de exploración y, menor inmovilidad) y la respuesta al objeto nuevo, lo que sugiere que la corrección de la hiperamonemia contribuye a mitigar los déficits motores, cognitivos y de ánimo asociados a la encefalopatía hepática (Kawai et al., 2012).

A pesar de la prometedora evidencia preclínica que respalda los beneficios antifibróticos, hemodinámicos y en la reducción de la hiperamonemia de la tamsulosina en modelos experimentales de fibrosis hepática, su uso en la cirrosis sigue siendo limitado debido a la falta de datos clínicos en humanos. Actualmente no existen ensayos clínicos que evalúen la seguridad, eficacia o resultados a largo plazo de la administración de tamsulosina en pacientes con enfermedad hepática crónica. Esto representa una limitación del estudio, ya que la farmacocinética, el metabolismo y los posibles efectos adversos del medicamento podrían diferir en pacientes cirróticos.

9. CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos demuestran que posibles tratamientos antifibróticos podrían basarse en la regulación de neurotransmisores y del sistema nervioso hepático. Al reducir la activación y proliferación de las células estelares hepáticas junto con el aumento de la señalización de citocinas, se disminuye la estimulación del SNS para frenar la fibrosis hepática. Dado que las CEH expresan enzimas esenciales para la biosíntesis de catecolaminas y producen norepinefrina para autorregular su crecimiento por medio de los receptores adrenérgicos alfa y beta, resulta un tratamiento eficaz el bloqueo farmacológico con tamsulosina y carvedilol en modelos de cirrosis hepática reduciendo la presión portal al disminuir la fibrosis hepática. Esta reducción se refleja en mejoras histológicas, bioquímicas y hemodinámicas significativas, tanto in vitro como in vivo, sin comprometer la viabilidad de los hepatocitos. Gracias a su baja toxicidad y a su efecto antifibrótico, la tamsulosina podría ser un tratamiento para pacientes con cirrosis e hipertensión portal.

10. REFERENCIAS

Aldridge, D. R., Tranah, E. J., & Shawcross, D. L. (2015). Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy: Role of Ammonia and Systemic Inflammation. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 5, S7–S20. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2014.06.004>

Amodio, P., Del Piccolo, F., Pettenò, E., Mapelli, D., Angeli, P., Iemmolo, R., Muraca, M., Musto, C., Gerunda, G., Rizzo, C., Merkel, C., & Gatta, A. (2001). Prevalence and prognostic value of quantified electroencephalogram (EEG) alterations in cirrhotic patients. *Journal of Hepatology*, 35(1), 37–45. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(01\)00129-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(01)00129-5)

Arroyo, V., Moreau, R., Kamath, P. S., Jalan, R., Ginès, P., Nevens, F., Fernández, J., To, U., García-Tsao, G., & Schnabl, B. (2016). Acute-on-chronic liver failure in cirrhosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16041. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.41>

Asada, S., Kaji, K., Nishimura, N., Koizumi, A., Matsuda, T., Tanaka, M., Yorioka, N., Sato, S., Kitagawa, K., Namisaki, T., Akahane, T., & Yoshiji, H. (2024). Tofogliflozin Delays Portal Hypertension and Hepatic Fibrosis by Inhibiting Sinusoidal Capillarization in Cirrhotic Rats. *Cells*, 13(6), 538. <https://doi.org/10.3390/cells13060538>

Athari, A. (1994). Prostaglandin F₂α and D₂ release from primary Ito cell cultures after stimulation with noradrenaline and ATP but not adenosine*1. *Hepatology*, 20(1), 142–148. [https://doi.org/10.1016/0270-9139\(94\)90146-5](https://doi.org/10.1016/0270-9139(94)90146-5)

Bajaj, J. S., Wade, J. B., Gibson, D. P., Heuman, D. M., Thacker, L. R., Sterling, R. K., Stravitz, T. R., Luketic, V., Fuchs, M., White, M. B., Bell, D. E., Gilles, H., Morton, K., Noble, N., Puri, P., & Sanyal, A. J. (2011). The Multi-Dimensional Burden of Cirrhosis and Hepatic Encephalopathy on Patients and Caregivers. *American Journal of Gastroenterology*, 106(9), 1646–1653. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.157>

Bataller, R., & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 115(2), 209–218. <https://doi.org/10.1172/JCI24282>

Batty, M., Pugh, R., Rathinam, I., Simmonds, J., Walker, E., Forbes, A., Anoopkumar-Dukie, S., McDermott, C., Spencer, B., Christie, D., & Chess-Williams, R. (2016). The Role of α1-Adrenoceptor Antagonists in the Treatment of Prostate and Other Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1339. <https://doi.org/10.3390/ijms17081339>

Benning, C. M., & Kyprianou, N. (2002). Quinazoline-derived α 1-adrenoceptor antagonists induce prostate cancer cell apoptosis via an α 1-adrenoceptor-independent action. *Cancer Research*, 62(2), 597–602.

Bilbro, J., Mart, M., & Kyprianou, N. (2013). Therapeutic value of quinazoline-based compounds in prostate cancer. *Anticancer Research*, 33(11), 4695–4700.

Calvillo-Robledo, A., Samson-Soleil, Marichal-Cancino, B. A., Medina-Pizaño, M. Y., Ibarra-Martínez, D., Ventura-Juárez, J., & Muñoz-Ortega, M. (2024). Rapid liver self-recovery: A challenge for rat models of tissue damage. *Life Sciences*, 357, 122975. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122975>

Carson, J. P., Robinson, M. W., Ramm, G. A., & Gobert, G. N. (2021). RNA sequencing of LX-2 cells treated with TGF- β 1 identifies genes associated with hepatic stellate cell activation. *Molecular Biology Reports*, 48(12), 7677–7688. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06774-3>

Chang, Y.-Z., Yang, L., & Yang, C.-Q. (2008). Migration of hepatic stellate cells in fibrotic microenvironment of diseased liver model. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International: HBPD INT*, 7(4), 401–405.

Cotecchia, S. (2010). The α 1-adrenergic receptors: Diversity of signaling networks and regulation. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 30(6), 410–419. <https://doi.org/10.3109/10799893.2010.518152>

Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernandez-Rabaza, V., Gil-Perotín, S., Cubas-Núñez, L., García-Verdugo, J.-M., Agusti, A., Llansola, M., & Felipo, V. (2016). Reducing Peripheral Inflammation with Infliximab Reduces Neuroinflammation and Improves Cognition in Rats with Hepatic Encephalopathy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00106>

Desmet, V. J., & Roskams, T. (2004). Cirrhosis reversal: A duel between dogma and myth. *Journal of Hepatology*, 40(5), 860–867. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.03.007>

Dulin, B., & Abraham, W. T. (2004). Pharmacology of carvedilol. *The American Journal of Cardiology*, 93(9), 3–6. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.01.003>

Dunn, C. J., Matheson, A., & Faulds, D. M. (2002). Tamsulosin: A Review of its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Management of Lower Urinary Tract Symptoms. *Drugs & Aging*, 19(2), 135–161. <https://doi.org/10.2165/00002512-200219020-00004>

El-Demerdash, E., Abdel-Sattar, S. A., El-Bakly, W. M., & Mohamed, E. A. (2017). Antifibrotic Effects of Carvedilol and Impact of Liver Fibrosis on Carvedilol Pharmacokinetics in a Rat model. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 42(5), 767–779. <https://doi.org/10.1007/s13318-016-0391-9>

El-Marasy, S. A., El Awdan, S. A., & Abd-Elsalam, R. M. (2019). Protective role of chrysin on thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 299, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.11.021>

Ezhilarasan, D., Evraerts, J., Brice, S., Buc-Calderon, P., Karthikeyan, S., Sokal, E., & Najimi, M. (2016). Silibinin Inhibits Proliferation and Migration of Human Hepatic Stellate LX-2 Cells. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 6(3), 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2016.01.002>

Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K., & Blei, A. T. (2002). Hepatic encephalopathy—Definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: Final report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*, 35(3), 716–721. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.31250>

Fernández, M., Semela, D., Bruix, J., Colle, I., Pinzani, M., & Bosch, J. (2009). Angiogenesis in liver disease. *Journal of Hepatology*, 50(3), 604–620. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.12.011>

Forbes, A., Anoopkumar-Dukie, S., Chess-Williams, R., & McDermott, C. (2016). Relative cytotoxic potencies and cell death mechanisms of α_1 -adrenoceptor antagonists in prostate cancer cell lines. *The Prostate*, 76(8), 757–766. <https://doi.org/10.1002/pros.23167>

Franco-Salinas, G., De La Rosette, J. J. M. C. H., & Michel, M. C. (2010). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Tamsulosin in its Modified-Release and Oral Controlled Absorption System Formulations: *Clinical Pharmacokinetics*, 49(3), 177–188. <https://doi.org/10.2165/11317580-000000000-00000>

Friedman, S. L. (2000). Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2247–2250. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2247>

Friedman, S. L. (2008). Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology*, 134(6), 1655–1669. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.003>

Ginès, P., Krag, A., Abraldes, J. G., Solà, E., Fabrellas, N., & Kamath, P. S. (2021). Liver cirrhosis. *The Lancet*, 398(10308), 1359–1376. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01374-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01374-X)

Gustot, T., Fernandez, J., Garcia, E., Morando, F., Caraceni, P., Alessandria, C., Laleman, W., Trebicka, J., Elkrief, L., Hopf, C., Solís-Munoz, P., Saliba, F., Zeuzem, S., Albillos, A., Benten, D., Montero-Alvarez, J. L., Chivas, M. T., Concepción, M., Córdoba, J., ... for the CANONIC Study Investigators of the EASL-CLIF Consortium. (2015). Clinical Course of acute-on-chronic liver failure syndrome and effects on prognosis. *Hepatology*, 62(1), 243–252. <https://doi.org/10.1002/hep.27849>

Hori, Y., Ishii, K., Kanda, H., Iwamoto, Y., Nishikawa, K., Soga, N., Kise, H., Arima, K., & Sugimura, Y. (2011). Naftopidil, a Selective α 1-Adrenoceptor Antagonist, Suppresses Human Prostate Tumor Growth by Altering Interactions between Tumor Cells and Stroma. *Cancer Prevention Research*, 4(1), 87–96. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0189>

Instituto Mexicano del Seguro Social. (2024). *¿Podemos mejorar la situación de la enfermedad hepática en México?* <https://www.gob.mx/imss/es/articulos/podemos-mejorar-la-situacion-de-la-enfermedad-hepatica-en-mexico?>

Iwakiri, Y., & Trebicka, J. (2021). Portal hypertension in cirrhosis: Pathophysiological mechanisms and therapy. *JHEP Reports: Innovation in Hepatology*, 3(4), 100316. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100316>

Iwasa, M., Sugimoto, R., Mifuji-Moroka, R., Hara, N., Yoshikawa, K., Tanaka, H., Eguchi, A., Yamamoto, N., Sugimoto, K., Kobayashi, Y., Hasegawa, H., & Takei, Y. (2016). Factors contributing to the development of overt encephalopathy in liver cirrhosis patients. *Metabolic Brain Disease*, 31(5), 1151–1156. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9862-6>

Jagdish, R. K., Roy, A., Kumar, K., Premkumar, M., Sharma, M., Rao, P. N., Reddy, D. N., & Kulkarni, A. V. (2023). Pathophysiology and management of liver cirrhosis: From portal hypertension to acute-on-chronic liver failure. *Frontiers in Medicine*, 10, 1060073. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1060073>

Kamimura, H., Oishioe, S., Matsushima, H., Watanabe, T., Higuchi, S., Hall, M., Wood, S. G., & Chasseaud, L. F. (1998). Identification of cytochrome P450 isozymes involved in metabolism of the α 1-adrenoceptor blocker tamsulosin in human liver microsomes. *Xenobiotica*, 28(10), 909–922. <https://doi.org/10.1080/004982598238985>

Kawai, H., Ishibashi, T., Kudo, N., Kawashima, Y., & Mitsumoto, A. (2012). Behavioral and biochemical characterization of rats treated chronically with thioacetamide: Proposal of an animal model for hepatic encephalopathy associated with cirrhosis. *The Journal of Toxicological Sciences*, 37(6), 1165–1175. <https://doi.org/10.2131/jts.37.1165>

Khan, A., Ayub, M., & Khan, W. M. (2016). Hyperammonemia Is Associated with Increasing Severity of Both Liver Cirrhosis and Hepatic Encephalopathy. *International Journal of Hepatology*, 2016, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2016/6741754>

Kim, M. Y., Cho, M. Y., Baik, S. K., Park, H. J., Jeon, H. K., Im, C. K., Won, C. S., Kim, J. W., Kim, H. S., Kwon, S. O., Eom, M. S., Cha, S. H., Kim, Y. J., Chang, S. J., & Lee, S. S. (2011). Histological subclassification of cirrhosis using the Laennec fibrosis scoring system correlates with clinical stage and grade of portal hypertension. *Journal of Hepatology*, 55(5), 1004–1009. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.012>

Kulkarni, A. V., Rabiee, A., & Mohanty, A. (2022). Management of Portal Hypertension. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 12(4), 1184–1199. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.03.002>

Kyprianou, N., & Benning, C. M. (2000). Suppression of human prostate cancer cell growth by alpha1-adrenoceptor antagonists doxazosin and terazosin via induction of apoptosis. *Cancer Research*, 60(16), 4550–4555.

Kyprianou, N., Vaughan, T. B., & Michel, M. C. (2009). Apoptosis induction by doxazosin and other quinazoline α 1-adrenoceptor antagonists: A new mechanism for cancer treatment? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 380(6), 473–477. <https://doi.org/10.1007/s00210-009-0462-4>

Lebrech, D., Corbic, M., Nouel, O., & Benhamou, J.-P. (1980). PROPRANOLOL—A MEDICAL TREATMENT FOR PORTAL HYPERTENSION? *The Lancet*, 316(8187), 180–182. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)90063-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)90063-X)

Lin, X.-H., Liu, H.-H., Hsu, S.-J., Zhang, R., Chen, J., Chen, J., Gao, D.-M., Cui, J.-F., Ren, Z.-G., & Chen, R.-X. (2020). Norepinephrine-stimulated HSCs secrete sFRP1 to promote HCC progression following chronic stress via augmentation of a Wnt16B/ β -catenin positive feedback loop. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01568-0>

Lueptow, L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 126, 55718. <https://doi.org/10.3791/55718>

McConnell, M., & Iwakiri, Y. (2018). Biology of portal hypertension. *Hepatology International*, 12(S1), 11–23. <https://doi.org/10.1007/s12072-017-9826-x>

Medina Pizaño, M. Y., Loera Arias, M. D. J., Montes De Oca Luna, R., Saucedo Cárdenas, O., Ventura Juárez, J., & Muñoz Ortega, M. H. (2023). Neuroimmunomodulation of adrenoblockers during liver cirrhosis: Modulation of hepatic stellate cell activity. *Annals of Medicine*, 55(1), 543–557. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2164047>

Miyahara, T., Schrum, L., Rippe, R., Xiong, S., Yee, H. F., Motomura, K., Anania, F. A., Willson, T. M., & Tsukamoto, H. (2000). Peroxisome Proliferator-activated Receptors and Hepatic Stellate Cell Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 35715–35722. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006577200>

Moreau, R., Jalan, R., Gines, P., Pavesi, M., Angeli, P., Cordoba, J., Durand, F., Gustot, T., Saliba, F., Domenicali, M., Gerbes, A., Wendon, J., Alessandria, C., Laleman, W., Zeuzem, S., Trebicka, J., Bernardi, M., & Arroyo, V. (2013). Acute-on-Chronic Liver Failure Is a Distinct Syndrome That Develops in Patients With Acute Decompensation of Cirrhosis. *Gastroenterology*, 144(7), 1426-1437.e9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.042>

Muñoz-Ortega, M. H., Llamas-Ramírez, R. W., Romero-Delgadillo, N. I., Elías-Flores, T. G., Tavares-Rodríguez, E. D. J., Campos-Esparza, M. D. R., Cervantes-García, D., Muñoz-Fernández, L., Gerardo-Rodríguez, M., & Ventura-Juárez, J. (2016). Doxazosin Treatment Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Hamsters through a Decrease in Transforming Growth Factor β Secretion. *Gut and Liver*, 10(1), 101. <https://doi.org/10.5009/gnl14459>

Nagula, S., Jain, D., Groszmann, R. J., & Garcia-Tsao, G. (2006). Histological-hemodynamic correlation in cirrhosis—A histological classification of the severity of cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 44(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.07.036>

Nardelli, S., Riggio, O., Turco, L., Gioia, S., Puzzone, M., Bianchini, M., Ridola, L., Aprile, F., Gitto, S., Pelle, G., Di Martino, M., Marzocchi, G., Caporali, C., Spagnoli, A., Di Rocco, A., & Schepis, F. (2021). Relevance of Spontaneous Portosystemic Shunts Detected with CT in Patients with Cirrhosis. *Radiology*, 299(1), 133–140. <https://doi.org/10.1148/radiol.2021203051>

Nascimento, M., Piran, R., Da Costa, R. M., Giordani, M. A., Carneiro, F. S., Aguiar, D. H., Dias, M. C., Sugizaki, M. M., Luvizotto, R. A., Nascimento, A. F., & Bomfim, G. F. (2018). Hepatic injury induced by thioacetamide causes aortic endothelial dysfunction by a cyclooxygenase-dependent mechanism. *Life Sciences*, 212, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.09.051>

Naveau, S., Perlemuter, G., & Balian, A. (2005). [Epidemiology and natural history of cirrhosis]. *La Revue Du Praticien*, 55(14), 1527–1532.

Oben, J. (2003). Sympathetic nervous system inhibition increases hepatic progenitors and reduces liver injury. *Hepatology*, 38(3), 664–673. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50371>

Oben, J. A. (2004). Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut*, 53(3), 438–445. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.026658>

Oben, J. A., & Diehl, A. M. (2004). Sympathetic nervous system regulation of liver repair. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 280A(1), 874–883. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20081>

Ohata, M., Lin, M., Satre, M., & Tsukamoto, H. (1997). Diminished retinoic acid signaling in hepatic stellate cells in cholestatic liver fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 272(3), G589–G596. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.272.3.G589>

Parsons, J. K., Hergan, L. A., Sakamoto, K., & Lakin, C. (2007). Efficacy of α -Blockers for the Treatment of Ureteral Stones. *Journal of Urology*, 177(3), 983–987. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.10.023>

Patanè, S. (2015). Insights into cardio-oncology: Polypharmacology of quinazoline-based α_1 -adrenoceptor antagonists. *World Journal of Cardiology*, 7(5), 238. <https://doi.org/10.4330/wjc.v7.i5.238>

Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)

Ripoll, C., Groszmann, R., Garcia-Tsao, G., Grace, N., Burroughs, A., Planas, R., Escorsell, A., Garcia-Pagan, J. C., Makuch, R., Patch, D., Matloff, D. S., & Bosch, J. (2007). Hepatic Venous Pressure Gradient Predicts Clinical Decompensation in Patients With Compensated Cirrhosis. *Gastroenterology*, 133(2), 481–488. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.024>

Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J., & Felipo, V. (2010). Hyperammonemia Induces Neuroinflammation That Contributes to Cognitive Impairment in Rats With Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology*, 139(2), 675–684. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.03.040>

Roskams, T., Cassiman, D., De Vos, R., & Libbrecht, L. (2004). Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 280A(1), 910–923. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20096>

Sato, S., Ohtake, A., Matsushima, H., Saitoh, C., Usuda, S., & Miyata, K. (2001). Pharmacological effect of tamsulosin in relation to dog plasma and tissue concentrations: Prostatic and urethral retention possibly contributes to uroselectivity of tamsulosin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *296*(3), 697–703.

Schuppan, D., & Afdhal, N. H. (2008). Liver cirrhosis. *Lancet (London, England)*, *371*(9615), 838–851. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60383-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60383-9)

Schwarzer, R., Kivaranovic, D., Paternostro, R., Mandorfer, M., Reiberger, T., Trauner, M., Peck-Radosavljevic, M., & Ferlitsch, A. (2018). Carvedilol for reducing portal pressure in primary prophylaxis of variceal bleeding: A dose-response study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *47*(8), 1162–1169. <https://doi.org/10.1111/apt.14576>

Sepanlou, S. G., Safiri, S., Bisignano, C., Ikuta, K. S., Merat, S., Saberifiroozi, M., Poustchi, H., Tsoi, D., Colombara, D. V., Abdoli, A., Adedoyin, R. A., Afarideh, M., Agrawal, S., Ahmad, S., Ahmadian, E., Ahmadpour, E., Akinyemiju, T., Akunna, C. J., Alipour, V., ... Malekzadeh, R. (2020). The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, *5*(3), 245–266. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30349-8](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30349-8)

Serna-Salas, S. A., Arroyave-Ospina, J. C., Zhang, M., Damba, T., Buist-Homan, M., Muñoz-Ortega, M. H., Ventura-Juárez, J., & Moshage, H. (2022). α -1 Adrenergic receptor antagonist doxazosin reverses hepatic stellate cells activation via induction of senescence. *Mechanisms of Ageing and Development*, *201*, 111617. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111617>

Serna-Salas, S. A., Navarro-González, Y. D., Martínez-Hernández, S. L., Barba-Gallardo, L. F., Sánchez-Alemán, E., Aldaba-Muruato, L. R., Macías-Pérez, J. R., Ventura-Juárez, J., & Muñoz-Ortega, M. H. (2018). Doxazosin and Carvedilol Treatment Improves Hepatic Regeneration in a Hamster Model of Cirrhosis. *BioMed Research International*, *2018*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/4706976>

Soeishi, Y., Matsushima, H., Watanabe, T., Higuchi, S., Cornelissen, K., & Ward, J. (1996). Absorption, metabolism and excretion of tamsulosin hydrochloride in man. *Xenobiotica*, *26*(6), 637–645. <https://doi.org/10.3109/00498259609046739>

Song, Y., Kim, S., Kim, K. M., Choi, E. K., Kim, J., & Seo, H. R. (2016). Activated hepatic stellate cells play pivotal roles in hepatocellular carcinoma cell chemoresistance and migration in multicellular tumor spheroids. *Scientific Reports*, *6*(1), 36750. <https://doi.org/10.1038/srep36750>

Sun, L., Sun, C., Zhou, S., Zhang, L., & Hu, W. (2021). Tamsulosin attenuates high glucose-induced injury in glomerular endothelial cells. *Bioengineered*, *12*(1), 5184–5194. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1955527>

Sun, X., Lv, Y., Huang, L., Gao, H., Ren, C., Li, J., Bie, M., Li, W., Koike, K., So, K.-F., & Xiao, J. (2020). Pro-inflammatory cytokines serve as communicating molecules between the liver and brain for hepatic encephalopathy pathogenesis and Lycium barbarum polysaccharides protection. *Journal of Ethnopharmacology*, *248*, 112357. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112357>

Tham, E. K. J., Tan, D. J. H., Danpanichkul, P., Ng, C. H., Syn, N., Koh, B., Lim, R. Y. Z., Wijarnprecha, K., Teng, M. L. P., Nah, B. K. Y., Sim, B. K. L., Cheng, X., Zhang, Z., Mitra, K., Nakamura, T., Takahashi, H., Loomba, R., Zheng, M., Muthiah, M., & Huang, D. Q. (2025). The Global Burden of Cirrhosis and Other Chronic Liver Diseases in 2021. *Liver International*, *45*(3), e70001. <https://doi.org/10.1111/liv.70001>

Turco, L., & Garcia-Tsao, G. (2019). Portal Hypertension. *Clinics in Liver Disease*, *23*(4), 573–587. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2019.07.007>

Turco, L., Reiberger, T., Vitale, G., & La Mura, V. (2023). Carvedilol as the new non-selective beta-blocker of choice in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Liver International*, *43*(6), 1183–1194. <https://doi.org/10.1111/liv.15559>

Wilde, M. I., & McTavish, D. (1996). Tamsulosin: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Potential in the Management of Symptomatic Benign Prostatic Hyperplasia. *Drugs*, *52*(6), 883–898. <https://doi.org/10.2165/00003495-199652060-00012>

Wong, L., Yamasaki, G., Johnson, R. J., & Friedman, S. L. (1994). Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *Journal of Clinical Investigation*, *94*(4), 1563–1569. <https://doi.org/10.1172/jci117497>

Wu, L., Guo, C., & Wu, J. (2020). Therapeutic potential of PPAR γ natural agonists in liver diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *24*(5), 2736–2748. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15028>

Xiao, L., Pimental, D. R., Amin, J. K., Singh, K., Sawyer, D. B., & Colucci, W. S. (2001). MEK1/2–ERK1/2 Mediates α 1-Adrenergic Receptor-stimulated Hypertrophy in Adult Rat Ventricular Myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *33*(4), 779–787. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1348>

11. ARTICULOS PUBLICADOS

ANNALS OF MEDICINE
2023, VOL. 55, NO. 1, 543–557
<https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2164047>



REVIEW ARTICLE

OPEN ACCESS

Neuroimmunomodulation of adrenoblockers during liver cirrhosis: modulation of hepatic stellate cell activity

Mariana Yazmin Medina Pizaño^a , María de Jesús Loera Arias^a , Roberto Montes de Oca Luna^a , Odila Saucedo Cárdenas^a , Javier Ventura Juárez^b and Martin Humberto Muñoz Ortega^c

^aHistology Department, Faculty of Medicine, Autonomous University of Nuevo León, Monterrey, México; ^bDepartment of Morphology, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, México; ^cDepartment of Chemistry, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, México

ABSTRACT

The sympathetic nervous system and the immune system are responsible for producing neurotransmitters and cytokines that interact by binding to receptors; due to this, there is communication between these systems. Liver immune cells and nerve fibres are systematically distributed in the liver, and the partial overlap of both patterns may favour interactions between certain elements. Dendritic cells are attached to fibroblasts, and nerve fibres are connected via the dendritic cell-fibroblast complex. Receptors for most neuroactive substances, such as catecholamines, have been discovered on dendritic cells. The sympathetic nervous system regulates hepatic fibrosis through sympathetic fibres and adrenaline from the adrenal glands through the blood. When there is liver damage, the sympathetic nervous system is activated locally and systemically through proinflammatory cytokines that induce the production of epinephrine and norepinephrine. These neurotransmitters bind to cells through α -adrenergic receptors, triggering a cellular response that secretes inflammatory factors that stimulate and activate hepatic stellate cells. Hepatic stellate cells are key in the fibrotic process. They initiate the overproduction of extracellular matrix components in an active state that progresses from fibrosis to liver cirrhosis. It has also been shown that they can be directly activated by norepinephrine. Alpha and beta adrenoblockers, such as carvedilol, prazosin, and doxazosin, have recently been used to reverse CCl₄-induced liver cirrhosis in rodent and murine models.

KEY MESSAGES

- Neurotransmitters from the sympathetic nervous system activate and increase the proliferation of hepatic stellate cells.
- Hepatic fibrosis and cirrhosis treatment might depend on neurotransmitter and hepatic nervous system regulation.
- Strategies to reduce hepatic stellate cell activation and fibrosis are based on experimentation with α -adrenoblockers.

ARTICLE HISTORY

Received 6 October 2022
Revised 7 December 2022
Accepted 23 December 2022

KEYWORDS

Cirrhosis; hepatic cells; stellate cells; sympathetic nervous system; neuroimmunomodulation; adrenoblockers

Neuroimmunomodulation

The modulating effect of the nervous system on immunological processes is known as neuroimmunomodulation. This modulation considers the reciprocal communication of the immune and neurological systems. Because immune cells have neurotransmitter receptors (including those for norepinephrine and acetylcholine) and lymph nodes are innervated by sympathetic nervous system (SNS) fibres, neuroimmunomodulation is possible [1]. These innervating fibres impact immune cell migration and proliferation,

promoting neuroimmunomodulation. The vagus nerve, which inhibits cytokine generation in peripheral monocytes *via* the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor, is a recently discovered alternative approach to neuroimmunomodulation [2]. Since the inflammatory response is the basis of severe chronic disease pathogenesis, such as cancer and coronary heart disease, the neuroimmunomodulating function of the vagus nerve may have clinical significance. Therefore, it is postulated that vagal activity might modulate disease progression [3,4], an issue currently under

CONTACT Martin Humberto Muñoz Ortega mhmunoz@correo.uaa.mx Department of Chemistry, Autonomous University of Aguascalientes, 940 University Avenue, Aguascalientes C.P. 20131, México; María de Jesús Loera Arias mdjesus.loeraars@uanl.edu.mx Department of Histology, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, 66460, Monterrey, México

© 2023 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



Tamsulosin regulates antifibrotic effects in thioacetamide-induced liver damage and ameliorates portal hypertension

Mariana Yazmin Medina-Pizaño^a, Leonel Alejandro Gómez Llanos-Angulo^a,
 Javier Ventura-Juárez^b, Andrés Quintanar-Stephano^c, Odila Saucedo-Cárdenas^a,
 Roberto Montes de Oca-Luna^a, María de Jesús Loera-Arias^{a,*},
 Martín Humberto Muñoz-Ortega^{d,**}

^a Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Monterrey, Mexico

^b Departamento de Morfología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

^c Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

^d Departamento de Química, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Fibrosis
 Hepatic stellate cells
 Tamsulosin
 Carvedilol
 Thioacetamide
 Liver
 Portal pressure

ABSTRACT

Liver cirrhosis is one of the leading causes of mortality worldwide, with portal hypertension being the initial sign of decompensation. Recent studies in animal models of liver fibrosis have proposed various treatments that reduce stellate cell activity, with adrenergic antagonists having an impact. This study evaluated the effect of tamsulosin as a potential treatment to reduce fibrosis and portal hypertension in a rat model of cirrhosis, without affecting the regenerative capacity of hepatocytes. *In vitro*, viability, morphological, and molecular techniques analyzed the challenge between the activation of hepatic LX2 stellate cells with noradrenaline and the possible reduction of this activation with tamsulosin and carvedilol treatments. *In vivo*, male Wistar rats were intoxicated with thioacetamide for 4 weeks to induce liver fibrosis, then treated orally with carvedilol and tamsulosin for 4 weeks. Hepatic function, histological, and molecular evaluation were made. *In-situ* perfusion was used to evaluate portal pressure. Norepinephrine (NE) induced increasing collagen-1 and α -SMA genes expression, while reducing PPAR- γ . Tamsulosin inhibited NE-induced proliferation, migration, and activation of HSCs, otherwise carvedilol showed partial effects. *In vivo*, tamsulosin treatment improved liver fibrosis, reduced collagen I levels, and normalized liver function. Additionally, in a thioacetamide-induced cirrhosis rat model, tamsulosin treatment prevented development of portal hypertension or arterial hypotension. Our results demonstrate that NE promotes hepatic stellate cell activation and fibrosis, while tamsulosin and carvedilol effectively reduce these effects *in vitro* and *in vivo*, without affecting the regenerative capacity of hepatocytes. In addition, the treatment also alleviates portal hypertension without causing systemic hypotension.

1. Introduction

Liver fibrosis and portal hypertension (PH) are complications of chronic liver disease that can lead to decompensated cirrhosis. PH develops primarily through increased intrahepatic vascular resistance (IHVR) and splanchnic vasodilation with augmented portal blood flow [1]. In fibrotic livers, IHVR results from both structural remodelling, due to extracellular matrix accumulation and altered liver architecture, and

increased vascular tone caused by activated hepatic stellate cells (HSCs) and dysfunctional liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) [2,3].

It has been reported that TAA-induced liver cirrhosis is caused by TAA-associated inhibition of respiratory metabolism and enzymatic activity within the nuclei of liver cells. Also, TAA-induced rats showed a splanchnic hyperdynamic circulation with an increase in portal venous inflow and reduced splanchnic arterial resistance [4]. The HSCs' role in portal hypertension has been investigated less extensively, though

* Correspondence to: M. J. Loera Arias, Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Histología, Facultad de Medicina, C.P. 66460 Monterrey, Nuevo León, Mexico.

** Correspondence to: M.H. Muñoz Ortega, Department of Chemistry, Autonomous University of Aguascalientes, 940 University Avenue, Aguascalientes C.P. 20131, Mexico.

E-mail addresses: mdjesus.loeraars@uanl.edu.mx (M. de Jesús Loera-Arias), humberto.munoz@edu.uaa.mx (M.H. Muñoz-Ortega).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2025.123859>

Received 1 April 2025; Received in revised form 3 July 2025; Accepted 14 July 2025

Available online 16 July 2025

0024-3205/© 2025 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.



Rapid liver self-recovery: A challenge for rat models of tissue damage

Argelia Calvillo-Robledo^a, Samson-Soleil^b, Bruno A. Marichal-Cancino^a,
Mariana Yazmin Medina-Pizaño^d, David Ibarra-Martínez^c, Javier Ventura-Juárez^b,
Martin Muñoz-Ortega^{c,*}

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

^b Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

^c Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

^d Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Liver damage
Self-recovery
Cirrhosis
Thioacetamide
Locomotory activity

ABSTRACT

Animal models, mainly murine, stay as a fundamental resource in diverse research pursuits, notably contributing to significant strides in discovering novel treatments for therapeutic applications. Preclinical assays must consider the existence of self-recovery mechanisms in the murine species to achieve a well-designed control group. This study focuses on unveiling the innate rapid regenerative capacity of rat liver by utilizing the thioacetamide-induced sub-chronic liver injury model. Employing histopathological, biochemical, and molecular liver function tests, we assessed the recovery of liver tissue functionality. Moreover, animals were housed with voluntary running wheels and locomotory activity was recorded and employed as an indirect index of overall animal recuperation. Remarkably, basal locomotory activity reestablished to normal levels only two weeks post-thioacetamide exposure. Our results raise vital considerations about the importance of temporal synchronicity in comparative assays to validate the real action of treatments, emphasizing the role of the rapid rat liver endogenous self-recovery.

1. Introduction

The inherent potential for tissue and organ regeneration within the body holds profound implications within scientific inquiry. Understanding genetic, molecular, and morphological components plays a key role in reestablishing homeostatic conditions, allowing tissue recovery [1]. The regenerative capacities in preclinical animal models may be remarkable; and not necessarily identical than in humans [2]. The use of rodents, mainly mice and rats, has been widely employed to translate the efficacy and responsiveness of certain drugs in humans [3,4]. However, to know the real effect of the treatments, it is necessary to consider the self-recovery mechanisms and the time they occur [1,5–7]. The regeneration process is associated with three main events, the innate recovery pre-existing in tissues; the action of the somatic stem cells during damage processes, and differentiation or transdifferentiation of the cells [4,8]. The regenerative potential of the liver is well-known. This is attributed to its intrinsic capacity to synthesize and metabolize proteins, enzymes, and glucose, and participate in detoxification processes [9,10]. The liver's endothelial complex enhances parenchymal functions

necessary for promoting liver regeneration. Even when the liver has been exposed to harmful substances for extended periods, hepatocytes induce a restorative response in the tissue [10,11]. Thioacetamide (TAA) is a pharmacological tool used to induce acute liver damage through the bioactivation process of cytochrome P450 (CYP)2E1 to TAA-S-oxide and TAA-S-dioxide in preclinical trials. These derivatives encourage the formation of reactive metabolites responsible for promoting hepatic necrosis by increasing oxidative stress through the lipid peroxidation pathway [12]. Despite the liver damage induced by CCl₄, the organ has the capacity to adapt to the new conditions [13]. This adaptation includes histological features collectively referred to as the “hepatic repair complex,” which is associated with cirrhosis regression. These features comprise a set of collagen fibers, periportal fibrous spikes, portal tract remnants, splitting septa, and others [13,14]. The regression of cirrhosis may occur once its inducer, such as CCl₄, ceases to be administered. This phenomenon is attributed to the histopathological changes observed in the tissue following its administration. These changes are characterized by the expansion of regenerative nodules and a reduction in the accumulation of collagen fibers.

* Corresponding author.

E-mail address: humberto.munoz@edu.uaa.mx (M. Muñoz-Ortega).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122975>

Received 16 April 2024; Received in revised form 11 July 2024; Accepted 10 August 2024

Available online 12 August 2024

0024-3205/© 2024 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.



EFFECTS OF THE ADRENERGIC BLOCKERS TAMSULOSIN AND CARVEDILOL ON THE HOMEOSTASIS OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM OF LIVER CELLS

Juan Carlos Rivera-Navarro¹, Mariana Yazmin Medina Pizaño², Sandra Luz Martínez-Hernández³, Javier Ventura-Juárez⁴, David Ibarra-Martínez⁵ and Martín Humberto Muñoz-Ortega^{*5}

¹Department of Medicine, Center of Health Sciences, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, 20100 Mexico.

²Faculty of Medicine, Department of Histology, Autonomous University of Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, 64460, Mexico.

³Department of Microbiology, Center of Basic Sciences, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, 20100 Mexico.

⁴Department of Morphology, Center of Basic Sciences, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, 20100 Mexico.

⁵Department of Chemistry, Center of Basic Sciences, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, 20100 Mexico.

Article Received: 10 January 2024 | Article Revised: 31 January 2024 | Article Accepted: 20 February 2024

Corresponding Author: Martín Humberto Muñoz-Ortega

Department of Chemistry, Center of Basic Sciences, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, 20100 Mexico.

ABSTRACT

Carvedilol and tamsulosin, both belonging to the family of adrenergic receptor antagonists, have been proposed in multiple recent studies (both in vitro and in vivo) for the treatment of liver and kidney fibrosis. However, there are reports of possible side effects that contradict its therapeutic properties in chronic liver damage. Furthermore, there is insufficient toxicological information on these drugs to ensure their safety. The present study investigates the signaling pathways activated during endoplasmic reticulum stress using a cell model derived from hepatocytes. Our MTT assay results suggest that both drugs reduce cell viability in a time-dependent manner, with a tendency for proliferation at higher concentrations. The study of gene expression kinetics for UPR markers revealed a moderate response in the PERK-ATF4 and IRE1-XBP1 branches after 12 hours of treatment. GRP78 showed an increase in expression within the initial hours of treatment; however, no significant differences in its synthesis were observed when evaluated with Western blot. Finally, the study found that tamsulosin did not alter the rate of protein synthesis, while carvedilol briefly reduced it. Our findings suggest that both carvedilol and tamsulosin upregulate genes associated with the response to misfolded proteins, but this alone is insufficient to trigger the cell death response.

KEYWORDS: Carvedilol, Tamsulosin, Reticular stress, HepG2 Cells, Safety.

Review

Novel Approaches in Chronic Renal Failure without Renal Replacement Therapy: A Review

Sandra Luz Martínez-Hernández ¹, Martín Humberto Muñoz-Ortega ² , Manuel Enrique Ávila-Blanco ³ , Mariana Yazmin Medina-Pizaño ³  and Javier Ventura-Juárez ^{3,*}¹ Departamento de Microbiología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Ags, Mexico² Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Ags, Mexico³ Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Ags, Mexico

* Correspondence: javier.ventura@edu.uaa.mx

Abstract: Chronic kidney disease (CKD) is characterized by renal parenchymal damage leading to a reduction in the glomerular filtration rate. The inflammatory response plays a pivotal role in the tissue damage contributing to renal failure. Current therapeutic options encompass dietary control, mineral salt regulation, and management of blood pressure, blood glucose, and fatty acid levels. However, they do not effectively halt the progression of renal damage. This review critically examines novel therapeutic avenues aimed at ameliorating inflammation, mitigating extracellular matrix accumulation, and fostering renal tissue regeneration in the context of CKD. Understanding the mechanisms sustaining a proinflammatory and profibrotic state may offer the potential for targeted pharmacological interventions. This, in turn, could pave the way for combination therapies capable of reversing renal damage in CKD. The non-replacement phase of CKD currently faces a dearth of efficacious therapeutic options. Future directions encompass exploring vaptans as diuretics to inhibit water absorption, investigating antifibrotic agents, antioxidants, and exploring regenerative treatment modalities, such as stem cell therapy and novel probiotics. Moreover, this review identifies pharmaceutical agents capable of mitigating renal parenchymal damage attributed to CKD, targeting molecular-level signaling pathways (TGF- β , Smad, and Nrf2) that predominate in the inflammatory processes of renal fibrogenic cells.

Keywords: chronic kidney disease; anti-fibrotic drugs; new diuretics drugs; novel anti-hypertensives drugs; metabolism-regulating drugs



Citation: Martínez-Hernández, S.L.; Muñoz-Ortega, M.H.; Ávila-Blanco, M.E.; Medina-Pizaño, M.Y.; Ventura-Juárez, J. Novel Approaches in Chronic Renal Failure without Renal Replacement Therapy: A Review. *Biomedicines* **2023**, *11*, 2828. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102828>

Academic Editors: Henricus A.M. Mutsaers and Shuo-Ming Ou

Received: 25 July 2023
Revised: 28 September 2023
Accepted: 12 October 2023
Published: 18 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Chronic kidney disease (CKD) encompasses a complex array of etiological factors that can culminate in severe complications, notably renal failure [1]. It is imperative to underscore the intimate connection between acute kidney disease (ACKD) and CKD, with the former often acting as a precipitating factor for the latter, especially among elderly patients. Therefore, a meticulous assessment of renal function in patients presenting with ACKD is paramount, along with the implementation of judicious therapeutic strategies to avert the progression to CKD. An investigation conducted in 2017 [2] emphasizes that the prevalence of ACKD escalates with advancing age, placing elderly individuals at heightened susceptibility because of age-related physiological alterations, including reduced renal blood flow and declining renal function [3]. CKD is characterized by structural or functional abnormalities within the kidney, or a persistent decline in the glomerular filtration rate (GFR) < 60 mL/min/1.73 m² [4,5], extending for a minimum duration of ≥ 3 months. It is categorized into five gradations: (1) Grade 1, denoting normal renal function with a GFR > 90 mL/min/1.73 m²; (2) Grade 2, signifying renal impairment with a mild reduction

12. APÉNDICE

A. Tratamientos con los antagonistas de los receptores alfa y beta carvedilol y tamsulosina

	Tamsulosina	Carvedilol
Concentración	0.010 M	0.010 M
Volumen	220 μ L	230 μ L
Gramos	0.001 gr	0.001 gr
Peso Molecular	444.97 g/mol	406.47 g/mol

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

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

B. Tinciones histológicas

a. Hematoxilina y eosina

El colorante hematoxilina para la contratinción de los tejidos se preparó con los siguientes reactivos, en el orden en que están escritos.

Hematoxilina	
Agua destilada	730 ml
Etilenglicol	250 ml
Hematoxilina anhidra en polvo	2 gramos
Yodato de sodio	0.2 gramos
Sulfato de aluminio	17.6 gramos
Ácido acético glacial	2 ml

Partimos de muestras que han sido fijadas e incluidas en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 5 μm de grosor y adheridas a portaobjetos.

1. 2x10 min en xileno para desparafinar
2. 2x10 min en etanol 100°
3. 10 min en etanol 96°
4. 10 min en etanol 80°
5. 10 min en etanol 50°
6. min en H₂O destilada
7. 5-10 min en Hematoxilina de Mayer
8. 15 min en agua corriente. Diferenciación.
9. 2x1 min en H₂O destilada
10. 0.5 a 2 min en Eosina al 0.2 % en H₂O
20s en etanol 96°
11. 2x3 min en etanol 100°
12. 2x10 min en xileno
13. Montado con medio de montaje.

b. Tricrómica de Masson

Los colorantes se prepararon con los siguientes reactivos, en el orden en que están escritos.

Fushina escarlata acida de Bierbrich

Bierbrich escarlata acuosa 1%	90 mL	0.9 gr en 90 mL H ₂ O destilada
Fushina acida acuosa 1%	10 mL	0.1 gr en 10 mL H ₂ O destilada
Ácido acético glacial	1 mL	

Solución acida de ácido fosfomolibdico y ácido fosfotúngstico

Ácido fosfomolibdico	5 gr
Ácido fosfotúngstico	5 gr
Agua destilada	200 mL

Solución de azul de anilina

Azul de anilina	2.5 gr
Ácido acético glacial	2 mL
Agua destilada	100 mL

Procedimiento

1. Calentar la solución de bouin a 60°C y colocar las laminillas por 30 minutos.
2. Lavarlas con agua destilada 30 baños.
3. Hematoxilina de Harris por 1:30 segundos.
4. Lavar en agua de la llave 10 baños.
5. Colocar en rojo escarlata por 10 minutos.
6. Lavar con agua de la llave 10 baños.
7. Colocar en ácido fosfomolibdico y ácido fosfotúngstico por 20 minutos.
8. Azul anilina 60°C por 3 minutos.
9. Ácido acético por 1 minuto.
10. Alcohol al 96% por 2 minutos.
11. Alcohol al 96% por 2 minutos.
12. Alcohol al 100% por 2 minutos.
13. Alcohol al 100% por 2 minutos.
14. Xilol por 2 minutos.
15. Xilol por 2 minutos.
16. Montar con entellan y dejar secar por 24 horas.

c. Rojo sirio

Los colorantes se prepararon con los siguientes reactivos, en el orden en que están escritos:
Solución de rojo sirio-picro: Rojo sirio 0.5 gramos y solución acuosa saturada de ácido pícrico 500 ml hasta que sature y filtrarla. Agua acidificada: añadir 5 ml ácido acético glacial a 1 litro agua destilada.

Procedimiento:

1. Hidratar los cortes de la siguiente manera:
2. Xilol 7 min
3. Xilol 7 min
4. Alcohol al 100% 5 min
5. Alcohol al 100% 5 min
6. Alcohol al 96% 3 min
7. Alcohol al 96% 3 min
8. Agua destilada 3 min
9. Colocar los cortes en HXT por 1:30 minutos para teñir los núcleos
10. Lavar 5 min con agua corriente
11. Colocar en PBS1x por 5 min
12. Colocar las laminillas en solución rojo sirio picro por 1 hora
13. Lavar dos veces con agua acidificada (2 baños por lavado)
14. Deshidratar
15. OH 96% 45 segundos
16. OH 96% 45 segundos
17. OH 100% 2 minutos
18. OH 100% 2 minutos
19. Xilol 100% 2 minutos
20. Xilol 100% 2 minutos
21. Montar con entellan.

C. Soluciones para SDS-PAGE y Western blot

Buffer de Transferencia pH 8.3			
10X		1X	
Tris base 250 mM	30 g	Buffer de transferencia 10X	100 mL
Glicina 1.92 M	144.13 g	Metanol	200 mL
Para 1 litro		H ₂ O destilada	700 mL
		Para 1 litro	

Buffer de Corrida pH 8.3			
10X		1X	
#146 Tris base 250 mM	30 g-15g	Buffer de corrida 10X	100 mL
#86 Glicina 1.92 M	144.13 g-72.06g	H ₂ O destilada	900 mL
#128 SDS 1%	10 g – 5g	Para 1 litro	
Para 1 litro			

TBS pH 7.6			
10X		1X	
Tris base 200 mM	23 g-11.5g	TBS 10X	100 mL
#49 NaCl 1.37 M	80 g-40g	H ₂ O destilada	900 mL
Para 1 litro		Para 1 litro	

Solución de Tinción Commassie		Solución de Desteñido I		Solución de Desteñido II	
Stock Azul de Commassie R-250 1%	12.5 mL	Metanol	50 mL	Metanol	5 mL
Metanol	50 mL	Ácido acético	10 mL	Ácido acético	7 mL
Ácido acético	10 mL	Agua bidestilada	40 mL	Agua bidestilada	88 mL
Agua bidestilada	27.5 mL	Volumen final	100 mL	Volumen final	100 mL