



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ALTERACIONES BIOQUÍMICAS E
INMUNOLÓGICAS DESARROLLADAS DURANTE LA INDUCCIÓN DE
CIRROSIS EN LOS MODELOS DE SUERO PORCINO Y POR CCl_4

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
SAUL CAMARGO TIBURCIO

TUTOR PRINCIPAL
ROLANDO EFRAÍN HERNÁNDEZ MUÑOZ
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
LETICIA MORENO FIERROS
[Facultad de Estudios Superiores Iztacala](#)
JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
[Facultad de Química](#)

Ciudad Universitaria, CDMX. Enero, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ALTERACIONES BIOQUÍMICAS E INMUNOLÓGICAS DESARROLLADAS DURANTE LA INDUCCIÓN DE CIRROSIS EN LOS MODELOS DE SUERO PORCINO Y POR CCL₄.

que presenté para obtener el grado de ----Maestría ----- es original, de mi autoría y lo realicé con

el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Saúl Camargo Tiburcio
409090051

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA.....	6
RESUMEN	7
ABREVIATURAS.....	8
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	11
Células mesenquimales.....	12
Células mieloides.....	13
Células linfoides.....	13
Regeneración hepática	15
Modelo cirrosis/fibrosis inducida por CCl ₄	16
Mecanismos de toxicidad del CCl ₄	16
Moléculas inmunológicas presentes en enfermedades hepáticas	18
Modelo cirrosis/fibrosis inducida por suero porcino	20
Análisis bioquímico	22
Colágena	22
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
General.....	24
Particulares.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Obtención de muestras.....	27
Análisis histológico	27
Análisis bioquímico	27
Transaminasa glutamato-oxalacetato (TGO)/Aspartato aminotransferasa (AST).....	27
Transaminasa Glutamato-Piruvato (TGP)/Alanina aminotransferasa (ALT)...	27
Albúmina	28
Lactato deshidrogenasa (LDH)	28
Bilirrubina Total	28

Ciclo de la Urea.....	28
Ornitina.....	29
Citrulina	29
Arginina	29
Nitritos	29
Amoníaco	29
Urea	30
Ornitin Carbamiltransferasa (OTC)	30
Arginasa	30
Cuantificación de citocinas y factores de crecimiento.....	31
Metabolismo de colágena.....	31
Determinación de anticuerpos	32
Inmunoglobulina M (IgM).....	32
Inmunoglobulina E (IgE).....	33
Inmunoglobulina G (IgG).....	34
Análisis estadístico	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
Colágena (cuantificación de hidroxiprolina)	38
Análisis Bioquímico.....	40
Pruebas de función de hepática.....	40
Ciclo de urea	46
Anticuerpos y citocinas	57
Inmunoglobulina E	57
Inmunoglobulina G	59
Inmunoglobulina M.....	60
Citocinas	61
Histología.....	67
CONCLUSIONES.....	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO 1.....	89

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz por el apoyo durante el desarrollo de esta tesis de maestría, por la paciencia y la colaboración para el mejoramiento de este trabajo.

A la Dra. Martha Lucinda Contreras Zentella por apoyarme y animarme durante el desarrollo de este trabajo.

Al comité tutor por ayudar a mejorar este trabajo, por la disposición para la colaboración.

Dra. Leticia Moreno Fierros

Dr. José Pedraza Chaverri

A la UNAM por ser una gran institución, al Instituto de Fisiología Celular, al posgrado de Ciencias Bioquímicas por ser formadores de grandes investigadores.

A mis profesores de la maestría, por la excelencia en la impartición de cursos.

A mis compañeros de laboratorio 326 del Instituto de Fisiología Celular.

Al jurado por los comentarios sobre este trabajo.

Dr. Jesús Adolfo García Sainz

Dra. Ileana Patricia Canto Cetina

Dr. Salvador Uribe Carvajal

Dra. Mahara Angélica. Valverde Ramirez

Dra. Maria Cristina Fernández Mejía

Este proyecto fue desarrollado en el IFC-UNAM con el apoyo de:

CONACYT 219710

Beca CONACYT 742072

Beca Fundación Telmex-Telcel

DEDICATORIA

RESUMEN

La cirrosis representa una de las cinco principales causas de muerte en México, se presenta como la etapa final en la mayoría de enfermedades crónicas del hígado. La cirrosis se produce cuando hay una alta tasa de recambio de células hepáticas (hepatocitos) y las células estelares hepáticas (CEH) quiescentes son activadas por células de Kupffer (macrófagos hepáticos) para formar células hepáticas estrelladas activadas. Éstas tienen la función de ser fibrogénicas-proliferativas y que al igual que los miofibroblastos, tienen como característica la sobreproducción de proteínas de matriz extracelular (MEC) como la colágena (Friedman, 2005). Se han desarrollado diversos modelos para el estudio de la cirrosis entre ellos destacan los inducidos por tetracloruro de carbono (CCl_4) que se asemeja a la cirrosis ocasionada por el consumo de alcohol; y suero porcino utilizado por la semejanza que tiene con el daño ocurrido después de la infección con el virus de la hepatitis C. El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios bioquímicos e inmunológicos que ocurren en ambos modelos durante la cirrosis hepática y las repercusiones sobre el potencial regenerativo. Los cambios encontrados en enzimas y sustratos en el análisis bioquímico de los modelos experimentales demuestran que en los organismos tratados con CCl_4 se observa una pérdida de la homeostasis hepática desde comienzo del tratamiento. Las concentraciones de colágena son elevadas desde el inicio del tratamiento con CCl_4 , el daño provocado por el CCl_4 produjo cambios morfo-fisiológicos en el hígado cambiando la estructura del hígado. En el modelo de SP el incremento de las concentraciones de colágena fue significativo, se observaron conexiones entre las venas porta-porta lo cual podría ser crucial en la comprensión de este modelo. A nivel inmunológico, las mediciones indican que la cirrosis puede estar mediada por células del sistema inmune, citocinas e inmunoglobulinas las cuales actúan de manera sinérgica con células hepáticas provocando cambios fisiológicos. Por su parte, en el tratamiento con CCl_4 los cambios pueden estar relacionados con el daño hepático (necrosis) observado desde el inicio del tratamiento y no con una respuesta inmunológica.

ABREVIATURAS

CCl ₄	Tetracloruro de carbono
SP	Suero porcino
CEH	Célula estelar hepática
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CD	Célula dendrítica
CPA	Células presentadoras de antígeno
CD8+	Linfocitos T citotóxicos
CD4+	Linfocitos T cooperadores
NK	Células Asesinas Naturales
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
TGO	Transaminasa glutamato-oxalacetato
TGP	Transaminasa Glutamato-Piruvato
LDH	Lactato deshidrogenasa
OTC	Ornitina carbamiltransferasa
TNF α	Factor de necrosis tumoral

INTRODUCCIÓN

En el mundo existen diversas enfermedades con una alta tasa de mortalidad; las enfermedades crónicas del hígado como es el caso de la cirrosis que representa una de las cinco principales causas de muerte en México, según datos de la Secretaría de Salud en México, en el año 2020, la incidencia de cirrosis hepática alcohólica fue de 3.2 personas por cada 100 mil habitantes. Particularmente, la cirrosis se ha visto favorecida por diversas causas como la hepatitis alcohólica, la autoinmunidad, el desorden metabólico, las hepatitis virales, entre otras (Chagoya de Sánchez et al., 2012; D'Amico et al., 2006; Friedman, 2005; Hernández-Muñoz et al., 2001)

La cirrosis se presenta como la etapa final en la mayoría de enfermedades crónicas del hígado, que en su fase inicial suele ser asintomática (fase compensada), pero rápidamente puede progresar a la fase descompensada que se caracteriza por la aparición de ascitis, ictericia, encefalopatía y hemorragias gastrointestinales (D'Amico et al., 2006). Cuando ocurre el daño crónico en hígado, se produce una tasa alta de recambio de células hepáticas (hepatocitos) y las células estelares hepáticas (CEH) quiescentes son activadas por células de Kupffer (macrófagos hepáticos) para formar células hepáticas estrelladas activadas (figura 1). Éstas tienen la función de ser fibrogénicas-proliferativas y que al igual que los miofibroblastos, tienen como característica la sobreproducción de proteínas de matriz extracelular (MEC) como la colágena, fibronectina, ondulina y tensina, las cuales juegan un papel importante en la formación de la fibrosis hepática y todos los desórdenes que conlleva la lesión (Friedman, 2005).

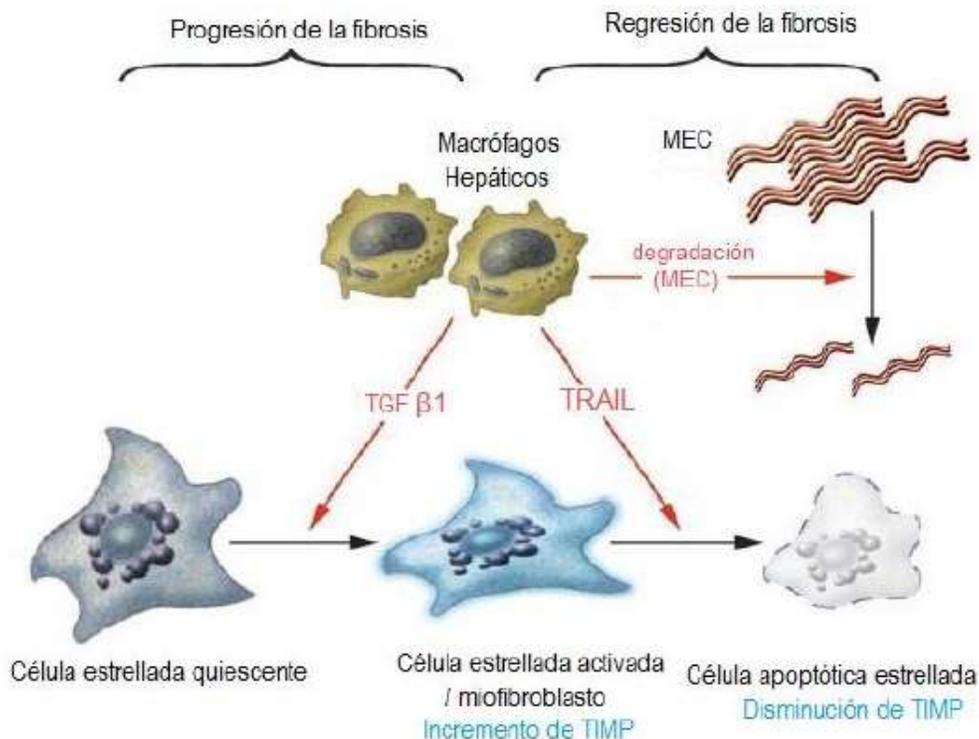


FIGURA 1. ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS DE KUPFFER EN LA PROGRESIÓN Y REVERSIÓN DE LA FIBROSIS HEPÁTICA.

Se han desarrollado diversos modelos de cirrosis y fibrosis hepática inducidos por tetracloruro de carbono (CCl₄) (Chagoya de Sánchez et al., 2012; Hernández-Muñoz et al., 2003; Pérez-Carreón et al., 2010) y suero porcino (SP) (Hasegawa-Baba & Doi, 2011; Paronetto & Popper, 1966; Suárez-Cuenca et al., 2008), el primero él más usado como modelo de la cirrosis producida como consecuencia del consumo de alcohol y el segundo utilizado por la semejanza que tiene con el daño ocurrido después de la infección con el virus de la hepatitis C (Huang et al., 2014). Además, se ha observado que durante la inducción con suero heterólogo en ratones (suero porcino), las lesiones que produce se caracterizan por la formación de nódulos parenquimatosos (Paronetto & Popper, 1966).

El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios inmunológicos que ocurren en ambos modelos durante la cirrosis hepática y las repercusiones sobre el potencial regenerativo.

ANTECEDENTES

El hígado es un órgano que desempeña distintas funciones a nivel metabólico como la síntesis, degradación y almacenaje de nutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas), y es el principal órgano de desintoxicación, el cual remueve los metabolitos tóxicos y xenobióticos mediante conversión metabólica (Celton-Morizur & Desdouets, 2010). Además, cuenta con gran capacidad regenerativa, así como diversas funciones más complejas que pueden afectar a otros órganos. La unidad funcional del hígado son los lóbulos, estos tienen forma poligonal, contienen a las arteriolas, ducto biliar, vena porta y la vena central (Sadri et al., 2016). El hígado es el encargado de recibir a través de la vena porta toda la circulación proveniente del intestino, bazo y páncreas, por lo que cualquier falla en la homeostasis del hígado puede desencadenar en problemas del funcionamiento correcto de diversos órganos (Michalopoulos, 2007).

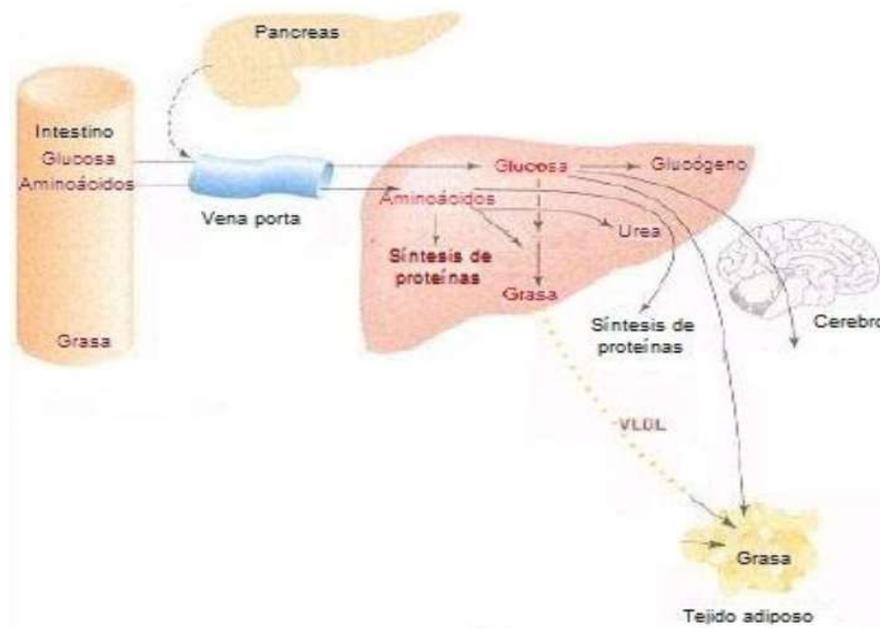


FIGURA 2. IMPORTANCIA METABÓLICA DEL HÍGADO. Devlin, M T. 4ta edición.

Como se mencionó antes, el hígado está compuesto de lóbulos que contienen principalmente células parenquimales (hepatocitos y colangiocitos) (Sadri et al., 2016) de las cuales los hepatocitos conforman el 80% de las células del

hígado; por otro lado, las células no-parenquimales (mesenquimales, mieloides y linfoides) cumplen con funciones muy diversas. En este grupo se encuentran las células estrelladas hepáticas (CEH, células de Ito o lipocitos hepáticos), los macrófagos hepáticos (células de Kupffer), linfocitos y células cebadas (mastocitos) (Taub, 2004).

Las células parenquimales del hígado cuentan con características particulares, ya que pueden ser binucleadas y poliploides. Los colangiocitos forman una barrera que cubre a los conductos biliares y así previene el daño provocado por la bilis al hígado (Sadri et al., 2016). A continuación, se presenta una breve descripción de los diferentes tipos celulares que conforman al tejido hepático:

Células mesenquimales

Las células estrelladas hepáticas (CEH, células de Ito) son células quiescentes de origen mesenquimal, que se localizan en el espacio perisinusoidal de Disse entre el endotelio fenestrado del hígado y los hepatocitos epiteliales, y tienen diversas funciones como la homeostasis de la vitamina A. Además, se encuentran muy relacionadas con la fibrosis hepática y la regulación del flujo de sangre (Unanue, 2007).

Las CEH pueden diferenciarse en miofibroblastos (Fausto et al., 2006) por medio de la estimulación de citocinas como TGF- β , y éstos pueden expresar a la α -actina de músculo liso (característica de células del músculo liso) y proteínas de matriz extracelular que son responsables de la contractilidad, pérdida de la capacidad de almacenar retinoides, cambios en la organización del citoesqueleto, morfología celular y la capacidad fibrogénica (Moreira, 2007; Velasco-Loyden et al., 2010). Por otro lado, se ha observado que en células estelares hepáticas de humano se expresan las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I y II y responden a las citocinas mediante la expresión de moléculas co-estimuladoras, por lo que este tipo de células pueden tener una función extra como células presentadoras de antígeno (Unanue, 2007; Winau et al., 2008).

Células mieloides

Las células de Kupffer, son de origen no parenquimal, y provienen de monocitos, que se originan a partir de células hematopoyéticas en médula ósea; estos monocitos son reclutados por diversos tejidos, donde maduran a macrófagos. Los macrófagos hepáticos representan cerca de un 15% de las células del hígado, y se les considera como células limpiadoras, pues eliminan una gran cantidad de partículas. A diferencia de los macrófagos de otros tejidos, las células de Kupffer tienen una vida media más larga (H. J. Li et al., 2015; Naito et al., 2004). Las células de Kupffer están implicadas en la activación de las CEH quiescentes mediante liberación de factores de crecimiento (TGF- β 1) provocando un incremento en los niveles de inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP-1) y de forma contraria mediante la secreción del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) en células de Kupffer; éstas pueden inducir la apoptosis en células estrelladas hepáticas y con ello disminuye la concentración de TIMP-1. Esto supone que los macrófagos en hígado tienen una importante función en el desarrollo de fibrosis, pero también inhiben la proliferación de éste (Friedman, 2005).

Las Células Dendríticas (CD) forman parte del sistema de células presentadoras de antígeno (CPA), que son las responsables de la modulación de la respuesta inmune, siendo muy eficientes en la activación de los linfocitos B y T. En su superficie expresan el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II, son responsables de la activación de linfocitos T citotóxicos (CD8+) y linfocitos T cooperadores (CD4+), respectivamente (Banchereau & Steinman, 1998; H. J. Li et al., 2015).

Células linfoides

Las células asesinas naturales (NK) maduran en médula ósea a partir de un progenitor linfoide común que conforma el sistema inmune adaptativo, y esta célula NK tiene características distintivas pues es de gran tamaño y contiene un citoplasma granular (citolítico). Estos linfocitos pueden reconocer y eliminar células anormales (células tumorales y células infectadas viralmente) (Murphy & Weaver, 2017). En

hígado se encuentran en grandes cantidades y se ha observado que tienen un importante rol inmunológico, pues son activadas cuando las células de Kupffer (macrófagos) liberan IL-12 e IFN- γ (S. Seki et al., 2000).

En el hígado, los linfocitos T pasan a través de los sinusoides e interactúan con los macrófagos, a través de células (específicamente células presentadoras de antígeno) al reconocer péptidos unidos al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) (Gorham, 2007). Las células T se clasifican además en linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD4+; estas células se activan por medio de células dendríticas inmaduras en agregados de tejidos linfoides. Las células T CD8+ superan por en gran cantidad a las células T CD4+. Los linfocitos T CD4+ sintetizan IFN- γ y IL-4, pero una gran cantidad de linfocitos T puede resultar perjudicial pues debido a ello los hepatocitos expresan FAS (CD95, TNFRSF6) que es un receptor de superficie que está relacionado con la muerte celular programada (apoptosis) (Crispe, 2003). Por otro lado, las células T CD4+ pueden diferenciarse en varios tipos de células efectoras que producen citocinas específicas asociadas a una gran variedad de enfermedades hepáticas, estos subconjuntos incluyen a células Th1 productora de interferón γ (IFN γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α); Th2 productoras de IL-3, IL-4 y IL-5; todas estas relacionadas con la interacción entre células T y B; T-reg productora de IL-10 y TGF- β 1 las cuales están asociadas a mecanismos inmunosupresores; y Th17 la cual produce IL-17 que funciona como citocina proinflamatoria estimulando diferentes tipos de células (Gorham, 2007).

Los linfocitos B, son las células encargadas de producir y liberar anticuerpos, esto puede ser mediado a través de células presentadoras de antígeno como células dendríticas y macrófagos. Además, las células B presentan receptores BCR los cuales se unen directamente a los antígenos solubles o antígenos en la superficie de patógenos por lo que pueden comportarse como células presentadoras de antígenos. Por otro lado, los linfocitos B pueden diferenciarse en células plasmáticas a través de la activación por linfocitos T, de esta manera las células plasmáticas pueden producir grandes cantidades de anticuerpos de alta especificidad (inmunoglobulinas). Finalmente, se ha descrito que existen

poblaciones de células B en un hígado sano y que están ubicadas cerca de las zonas portales y en el parénquima, mientras su forma activada (células plasmáticas) cobra relevancia serológica durante en infecciones virales como es el caso de hepatitis B, hepatitis C, así como en enfermedades autoinmunes hepáticas (Gorham, 2007).

Regeneración hepática

La regeneración es un proceso de recuperación de un miembro perdido que inicia con la formación de un blastema que contienen células con potencial de diferenciación (Fausto et al., 2006). Sin embargo, la regeneración hepática ha sido ampliamente estudiada desde el punto de vista de modelos de hepatectomía parcial (HP) y CCl₄, en los cuales se ha descrito como la reposición compensatoria del número y masa de células (Fausto et al., 2006). La regeneración hepática es un fenómeno que ocurre como respuesta a diversos estímulos (lesiones tóxicas, infecciones y escisiones), mientras que en un hígado sano bajo condiciones normales los hepatocitos son de vida larga y no entran en división celular (Taub, 2004). Un ejemplo de ello sería que durante el inicio de la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial existe una importante presencia de redes de citocinas, lo cual incluye el aumento de los ARNm y niveles factor de necrosis tumoral (TNF, Caquecina) e IL-6 en suero; así como la activación de factores de transcripción, el factor nuclear-kappa B (NFkB) y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (Fausto et al., 2006). Durante la regeneración del hígado diversas citocinas, factores de crecimiento y redes metabólicas se relacionan entre sí, siendo diversas moléculas las que se encuentran asociadas a las señales mitogénicas (Michalopoulos, 2007).

Por otro lado, los hepatocitos en condiciones normales (*in vivo*) se consideran quiescentes, es decir, en fase G₀ del ciclo celular y en este estadio hay mínima o nula cantidad de los mitógenos de factor de crecimiento transformante- α (TGF α), factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). De este modo, la red de citocinas actúa en el inicio de la

regeneración hepática, el cual corresponde al paso de hepatocitos quiescentes a células en el ciclo celular (G_0 a G_1) (Fausto et al., 2006).

La anulación de los puntos de restricción de G_1 tardío son precedidos por la activación de los factores de crecimiento (Fausto et al., 2006). HGF y la familia de ligandos del receptor de EGF son importantes factores de crecimiento que impulsan la progresión de ciclo celular durante la regeneración hepática (Fausto et al., 2006). El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), está presente en diversas células mesenquimales y actúa sobre hepatocitos de manera paracrina y endocrina (por ej. hepatocitos y células epiteliales); su receptor es el *cMet*, el cual se expresa en muchas células epiteliales, endoteliales, neuronas y CEH (Nakamura et al., 2011). El HGF está implicado en el desarrollo y regeneración hepática (Fujimoto & Kaneda, 1999); así como favorecer la progresión de tumores; sin embargo, esto ocurre en sinergia con otras moléculas proinflamatorias (Y. Li et al., 2019).

Modelo cirrosis/fibrosis inducida por CCl_4

Desde hace más de cinco décadas se ha usado el tetracloruro de carbono (CCl_4) como modelo de daño hepático. Sin embargo, Paquet y Kamphausen en 1975 describieron las características esenciales de este modelo a largo plazo, observando incrementos en la actividad sérica de aminotransferasas, los niveles de triglicéridos, así como los depósitos de colágena y la presencia de necrosis hepatocelular. Otros grupos han detallado, de manera más completa el daño provocado por el CCl_4 en diferentes organismos y vías de inducción, además de los cambios que sufren los hepatocitos y la pérdida de sus funciones (Recknagel et al., 1989).

Mecanismos de toxicidad del CCl_4

Existen dos mecanismos en el metabolismo del CCl_4 que actúan colectivamente provocando daño hepático severo y la muerte celular. Por un lado, cuando el CCl_4 es catalizado por la acción del sistema oxidasa de función mixta citocromo P450 (retículo endoplásmico), al radical triclorometil ($\bullet CCl_3$) (Tomasi et al., 1987), que también puede formarse en la mitocondria (Boll et al., 2001). Esto

ocurre específicamente en algunas isoenzimas de la familia CYP2, como CYP2E1 (metabolismo de xenobióticos) se lleva a cabo la biotransformación al radical $\bullet\text{CCl}_3$. Sin embargo, éste se une covalentemente al sitio activo de la enzima inactivándola, causando una inactivación del sistema citocromo P450. De esta manera al inactivar a la enzima los $\bullet\text{CCl}_3$ formados podrán tomar diversas rutas, como dimerizarse en C_2Cl_6 (Fowler, 1969), reaccionar con los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos o bien reducirse a cloroformo (CHCl_3) por la sustracción de H^+ de los ácidos grasos insaturados (Slater et al., 1985). Por otro lado, en presencia de oxígeno y moléculas orgánicas, el radical $\bullet\text{CCl}_3$ se convierte a un radical triclorometil peroxil ($\bullet\text{CCl}_3\text{OO}$), el cual es mucho más reactivo que triclorometil, que debido a esta reactividad su tiempo de vida es más corto (en un rango de milisegundos). El radical $\bullet\text{CCl}_3\text{OO}$ es capaz de sustraer H^+ de ácidos grasos poliinsaturados a este proceso se le denomina peroxidación de lípidos (Forni et al., 1983). Entre los productos de degradación de ácidos grasos producido por el radical triclorometil se encuentran los aldehídos que pueden unirse directamente a grupos funcionales de proteínas, inhibir actividades enzimáticas y la ruptura de los fosfolípidos de la membrana celular, es claro que la muerte celular inducida por el CCl_4 se debe a la combinación de diversos factores como la dosis y los periodos intoxicación. (Weber et al., 2003). Como consecuencia de esto, ocurre la formación del hígado graso, lo que se acompaña de una disfunción en el metabolismo de lípidos (Varela-Moreiras et al., 1995).

Otro efecto de la haloalquilación en ratas tratadas con CCl_4 , es la hipometilación, lo que induce la inhibición de síntesis proteica (Smuckler & Benditt, 1965), por la baja metilación del DNA. En experimentos *in vitro* se ha logrado revertir esta hipometilación, al administrar S-adenosil metionina (Varela-Moreiras et al., 1995), que parece tener función cito-protectora y que probablemente tiene algún efecto en los fosfolípidos (Tsuji et al., 1990).

Waller y colaboradores, reportaron la importancia de la salida de Ca^{2+} de los microsomas de hígado instantes después de la administrar CCl_4 . La pérdida de la homeostasis de los hepatocitos es consecuencia de la haloalquilación de los lípidos y también por la lipoperoxidación, que compromete la regulación del calcio

intracelular. Estos cambios suceden principalmente en mitocondria (alta $[Ca^{2+}]$), retículo endoplásmico y citosol (baja $[Ca^{2+}]$) (Weber et al., 2003). Los cambios en los compartimientos ocurren al poco tiempo de administrar una alta concentración de CCl_4 , inactivando la ATPasa- Ca^{2+} del retículo endoplásmico y el sistema uniporte de la mitocondria (Parola et al., 1990). Este sistema uniporte se encuentra en la membrana interna de la mitocondria y es un canal altamente selectivo, funciona como subunidad formadora de poros permitiendo el acceso de Ca^{2+} y así activar el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Baughman et al., 2011). La desregulación provocada por el CCl_4 puede resultar en un incremento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol debido al daño ocurrido en mitocondria (Long & Moore, 1986). También se ha observado que ocurre una segunda oleada de incremento de Ca^{2+} algunas horas más tarde debido a la pérdida de la permeabilidad de la membrana. La elevación de Ca^{2+} citosólico daña estructuras del citoesqueleto, además de activar proteasas, endonucleasas y fosfolipasas, que conducen a vías apoptóticas y necróticas, terminando en la muerte celular (Haouzi et al., 2000). Como consecuencia de la elevada concentración de Ca^{2+} se activa la vía proteína cinasa C (Björnsson et al., 1998), sin embargo, la alta concentración de CCl_4 induce la activación de la enzima calpaína la cual destruye la actividad de la proteína cinasa C lo que contribuirá a la muerte celular (Pronzato et al., 1993).

Moléculas inmunológicas presentes en enfermedades hepáticas

Existen diversas moléculas que son secretadas por los diferentes tipos de células del sistema inmune (Linfocitos T, B, NK, células dendríticas y células de Kupffer). Hay cinco clases de inmunoglobulinas (IgM, IgD, IgG, IgE e IgA) producto de la secreción de células B activadas, estas pueden presentarse como receptores de antígenos transmembrana o como anticuerpos secretados.

Las células B inactivadas expresan el anticuerpo IgM en su superficie, la cual es la más común en plasma, y tiene una forma pentamérica lo que provoca que sean moléculas de baja afinidad, pero con gran cantidad de sitios de unión a antígenos, durante las etapas más tempranas de una infección se encuentra de manera más recurrente. La secreción de algunas citocinas como IL-4, IFN- γ y TGF-

β podrían estar implicados con la regulación de su expresión del anticuerpo IgM ya que inhibe su producción (Murphy & Weaver, 2017). Al igual que IgM, IgD se encuentra adherida a la superficie celular de células B maduras indiferenciadas, sin embargo, este anticuerpo se produce en menor cantidad que otras inmunoglobulinas.

Los anticuerpos IgA son de alta afinidad frente a antígenos pues suelen funcionar como neutralizantes de toxinas y se presentan como forma de monómero en el plasma y como dímero en las secreciones mucosas, de manera experimental se ha observado que TGF- β ésta induce la proliferación y IL-5 aumenta la producción del anticuerpo IgA (Murphy & Weaver, 2017).

Las IgG son los anticuerpos específicos más abundantes, suelen proporcionar inmunidad a largo plazo contra infecciones virales y bacterianas. Su especificidad depende de la subclase a la que pertenece (IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4). A pesar de que conservan cerca de un 90% de similitud de las secuencias de aminoácidos entre ellas, las propiedades biológicas como la unión a antígeno, la vida media, la activación de células efectoras y la formación de complejos inmunológicos es diferente (Napodano et al., 2020). En infecciones provocadas por el virus de hepatitis B, IgG e IgM suelen aparecer muy al inicio de la infección aguda y permanecen a lo largo de la infección crónica (Trépo et al., 2014).

Por otro lado, las interleucinas generalmente son expresadas en leucocitos y algunas células endoteliales, están implicadas en la respuesta inmune, procesos inflamatorios y en la fibrogénesis del hígado (Zhou et al., 2014). Se ha reportado el incremento de algunas citocinas proinflamatorias en la enfermedad hepática alcohólica, y se ha descrito que algunas citocinas como IL-1 y TNF α pueden provocar daño hepático de manera indirecta a través de otras células o de manera directa después de unirse receptores específicos de hepatocitos para generar señales intracelulares tóxicas (McClain et al., 1999). Por otro lado, la sobreexpresión de la Interleucina 6 (IL-6) puede tener como consecuencia la hiperplasia de hepatocitos periportales, es probable que la IL-6 esté relacionada con la optimización de procesos en la regeneración temprana, sin embargo, no puede ser vista como un iniciador de regeneración (Michalopoulos, 2007). De igual manera,

la IL-6 también se ha observado que actúa de manera sinérgica con HGF en el desarrollo de tumores (Y. Li et al., 2019).

Modelo cirrosis/fibrosis inducida por suero porcino

Paronetto y Popper en 1966 describieron algunos aspectos del modelo de cirrosis inducido por suero porcino, en el que inyectaron en ratas de manera intraperitoneal quincenalmente con sueros heterólogos (suero porcino y suero de caballo, entre otros), y observaron que la incidencia de cirrosis aumentó a lo largo de la inmunización, aumentando de 65% a 80% después de 100 días. Por otro lado, se observó que una fracción de albúmina de suero porcino contenía propiedades cirróticas, sin embargo, el mecanismo no fue completamente descrito, pues presumiblemente los complejos inmunes que se localizaron en los tractos portales produjeron la formación de septos alrededor, lo que indica un origen inmunológico en este modelo de lesión hepática crónica.

En otros estudios se ha investigado si la fibrosis hepática inducida por suero porcino es producida debido a una reacción inmunológica. En uno de esos estudios se probaron dos grupos, el primer grupo con suero porcino-tolerante (neonatales) y un grupo control (ocho semanas de edad) siendo ambos inyectados intraperitonealmente dos veces por semana durante 18 y 10 semanas respectivamente. El grupo suero porcino-tolerante mostró bajos niveles de anticuerpo y no hubo desarrollo de fibrosis hepática, lo que contrastó con el grupo control que mostró altos niveles de anticuerpos y el 75% de ellas desarrolló fibrosis. Concluyeron que la diferencia en la localización de células ED1 positivas (macrófagos/células de kupffer) entre el hígado de rata normal y fibrótico, sugiere que las células del sistema inmune, como los macrófagos están involucrados en la fibrogénesis y la formación de septos (Baba et al., 2004).

Por otro lado, se hicieron observaciones histológicas en ratas Brown Norway (BN), Sprague Dawley (SD) y Wistar. Aquí, el número de eosinófilos (CD3+) y macrófagos (ED1+) se encontraron muy elevados en ratas BN y SD, al igual que células T (CD45RA+) en ratas BN y células positivas para α -actina de musculo liso (α -SMA+) en ratas SD, sugiriendo que las diferencias con células inflamatorias

pueden estar relacionadas con la ausencia de fibrosis hepáticas en ratas Wistar. Finalmente, a las 8 semanas se encontró una gran cantidad de pseudo-lóbulos pequeños en todas las cepas, sugiriendo que cada célula inflamatoria tiene un papel diferente en el proceso de la fibrosis (Bishayi et al., 2002).

Se ha estudiado la implicación de las células estrelladas hepáticas (CEH) podrían tener en el recambio de la MEC en un modelo de una fibrosis preestablecida y en la hepatectomía parcial. En ratas Wistar machos se les administró de manera intraperitoneal un suero porcino durante 9 semanas y posteriormente se sometieron a una hepatectomía parcial del 70% o con operación simulada. Se realizaron análisis histológicos, morfométricos, además se determinaron los parámetros indicativos de la proliferación celular, la síntesis de colágena y degradación, así como la activación de CEH. Observaron que el contenido de colágena del hígado se redujo a 75% después de HP en ratas con cirrosis, en comparación con las ratas con cirrosis con operación simulada, lo que resultó en la síntesis disminuida de colágena. También observaron que durante la HP aumentó la actividad de colagenasa, obteniendo altas concentraciones de pro- MMP-9, MMP-2 y MMP-13, y que estos datos contrastaban con una menor expresión de TIMP-1 y TIMP-2. Demostrando que hubo una disminución de la síntesis temprana de colágena, degradación leve de la MEC, regeneración hepática activa seguida por una mayor colagenólisis y la deposición limitada de MEC. Por otro lado, se observó que las CEH activadas aumentaron rápidamente durante la fibrosis hepática y permanecieron activas después de la regeneración del hígado, incluso durante la resolución de la fibrosis. Por último, concluyeron que la estimulación de la regeneración del hígado a través de HP restaura el equilibrio en la síntesis/degradación de la MEC, lo cual conlleva a la remodelación de la MEC y a una resolución casi completa de la fibrosis hepática. Como respuesta al estímulo regenerativo, las CEH activas parecen tener un papel de control en la remodelación de la MEC durante la cirrosis experimental en ratas (Suárez-Cuenca et al., 2008).

Análisis bioquímico

En el hígado se llevan a cabo diversos procesos metabólicos, durante el desarrollo de la enfermedad hepática ocurre un aumento y disminución de muchas moléculas, estas pueden ser indicadores de la progresión del daño en el hígado (Tabla 1).

Analito	Funciones	
Alanina aminotransferasa (ALT)	Catalizan la transferencia de grupos amino.	
Aspartato aminotransferasa (AST)		
Albumina	Mantener la presión osmótica vascular. Transportar compuestos endógenos y exógenos. Actúa como reserva proteica.	
Bilirrubina Total	Componente de la bilis.	
Lactato deshidrogenasa (LDH)	Catalizar reacciones en diversos tejidos.	
Amoníaco	Importante en el diagnóstico de encefalopatía.	
Ciclo de la urea	Ornitina carbamoil transferasa (OTC)	Cataliza la formación de citrulina.
	Ornitina	Intermediario de la síntesis de citrulina
	Citrulina	Intermediario de la síntesis de arginina
	Arginina	Intermediario de la síntesis de la urea
	Arginasa	Cataliza la formación de citrulina y urea.

Tabla 1. Análisis bioquímico. Algunos analitos importantes en el desarrollo de la enfermedad hepática. I Wolf, 1999. Ramírez-Zamora *et al.* 2013

Colágena

La colágena es la más importante proteína del tejido conectivo, se encuentra presente en piel, huesos, tendones, cartílagos y otros órganos como el hígado (Da Silva *et al.*, 2015). La colágena está conformada principalmente por prolina, glicina, lisina e hidroxiprolina, este último, es el mayor componente de la colágena y es producido de la hidroxilación de la prolina. Durante la formación de la triple hélice

de colágena, la prolil-4-hidroxilasa cataliza la formación de 4-hidroxi prolina que sirven dar estabilidad a la colágena (Gabr et al., 2016).

Específicamente, cuando el hígado es expuesto a diversos factores biológicos, quimio-tóxicos, infecciones virales, parásitos y enfermedades autoinmunes puede resultar en la deposición de fibras de colágena, esto es conocido como fibrosis hepática (Bruck et al., 2001).

HIPÓTESIS

Es posible que a través de las alteraciones generadas en el hígado por la administración de CCl₄ y/o SP se pueda explicar el mecanismo o las diferentes vías del desarrollo del daño hepático. De esta manera, el análisis comparativo de los cambios inmunológicos y bioquímicos proporcionarían elementos adicionales para el estudio de la fibrosis/cirrosis.

OBJETIVOS

General

Evaluar las alteraciones inmunológicas en ratas Wistar provocadas por la administración crónica de suero porcino y de CCl₄ para la inducción de fibrosis/cirrosis en hígado.

Particulares

- Evaluar el metabolismo de la colágena mediante la cuantificación de hidroxiprolina.
- Analizar los metabolitos y la actividad enzimática presente en el suero durante el desarrollo de la cirrosis.
- Observar los cambios histológicos que ocurren en el hígado al inducir cirrosis por administración de suero porcino y de CCl₄.
- Cuantificar los niveles séricos de citocinas e inmunoglobulinas en los tratamientos de SP y de CCl₄.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos modelos de cirrosis/fibrosis hepática uno mediante la inducción con suero porcino (Celton-Morizur & Desdouets, 2010; Suárez-Cuenca et al., 2008) y el otro por CCl₄. Para este estudio se adquirieron ratas macho de la cepa Wistar del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, los organismos usados contaban con siete semanas de edad y un peso inicial aproximado de 100-120g, este protocolo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular (CICUAL-IFC) con número de protocolo RHM85-16. Los organismos se mantuvieron durante todas las semanas de tratamiento en condiciones de bioterio con acceso libre al alimento y agua, y ciclos de 12:12 horas luz:oscuridad. Se inyectaron las ratas por vía intraperitoneal (IP) formando los grupos experimentales y sus respectivos controles, que recibieron los tratamientos a diferentes tiempos experimentales para conocer la progresión del daño hepático.

Los tratamientos experimentales de las ratas se desarrollaron en dos etapas, la primera consistió en el grupo CCl₄ inyectadas con una dosis de 4 ml/Kg de rata (el CCl₄ tuvo una dilución 1:4 con aceite vegetal), tres veces por semana, durante dos, cuatro, seis, ocho y diez semanas; y el grupo control que recibió la dosis de 4ml/Kg de aceite vegetal sin CCl₄. Para esta etapa se obtuvieron 45 ratas macho de siete semanas y peso de 100-120g, se destinaron 25 ratas para el grupo CCl₄, n=5 para cada dos semanas y 20 para el grupo control, n=4 cada dos semanas; para el grupo CCl₄ no sobrevivieron 5 ratas las cuales fallecieron a lo largo del tratamiento experimental por lo que se ajustó a n=4, es importante mencionar que todas las ratas formaron parte de las mediciones de pesos, pero no del análisis bioquímico e inmunológico debido a la dificultad para obtener suero e hígado. Por otro lado, la segunda etapa consistió en los grupos SP a las cuales se les administró una dosis de 3.5 ml/Kg de rata, tres días a la semana, durante ocho, diez, doce y catorce semanas; y grupo control al cual se le administró 3.5 ml/Kg de solución salina (NaCl al 0.9%). Para esta parte del ensayo se obtuvieron 52 ratas macho de siete semanas y peso de 100-120g, se destinaron 36 ratas para el grupo SP, n=9

para cada dos semanas y 16 para el grupo control, n=4 cada dos semanas; en la octava semana de tratamiento se sacrificaron 6 ratas las cuales no contaron con signos de daño hepático, estos organismos fueron descartados del análisis final de este trabajo; se ajustó la n=12 para décima y decimosegunda semana, a lo largo del tratamiento experimental solo falleció una rata cerca de la decimocuarta semana de tratamiento por lo que se ajustó a n=5. Al término del periodo de tratamiento, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/Kg) y se sacrificaron a los diferentes tiempos experimentales. Los individuos experimentales fueron manipulados de acuerdo a el “Reglamento para usuarios del Vivarium” y aprobado por CICUAL-IFC. **ANEXO 1.** La Figura 3 muestra el diseño experimental a seguir para los tratamientos.

	1ra. Etapa		2da. Etapa	
	Control	CCl ₄	Control	Suero porcino
2 semanas	 n=4	 n=4	/	/
4 semanas	 n=4	 n=4	/	/
6 semanas	 n=4	 n=4	/	/
8 semanas	 n=4	 n=4	/	/
10 semanas	 n=4	 n=4	 n=4	 n=12
12 semanas	/	/	 n=4	 n=12
14 semanas	/	/	 n=4	 n=5

FIGURA 3. *Diseño experimental de los grupos tratados con CCl₄, SP y sus respectivos grupos control. No se incluyen los individuos descartados por quedar fuera en el análisis final, ni las ratas con muerte prematura. Únicamente se usaron ratas macho.*

Obtención de muestras

De cada una de las ratas sacrificadas se obtuvo la sangre mediante decapitación. Para evitar la coagulación las muestras se colocaron en tubos Vacutainer™ con EDTA y fueron agitadas. Para la obtención del plasma, la sangre se centrifugó a 10,000 rpm (1,750 g) en una centrifuga clínica durante 10 minutos y se obtuvieron los sobrenadantes procesados. Posteriormente, el plasma se mantuvo congelado a -20 °C para usado en ensayos bioquímicos e inmunológicos.

Análisis histológico

Se tomó una porción de aproximadamente 0.5 g, que se fijó en una solución de formaldehído al 20% y fue embebida en parafina para realizar cortes en secciones delgadas de tejido con ayuda del micrótopo (grosor aproximado de 5-10 µm). Posteriormente, después de ser fijados en el portaobjetos y rehidratados con etanol/agua, se tiñeron con tinción tricrómica de Masson para observar las fibras de colágena (Hernández-Muñoz et al., 1997).

Análisis bioquímico

Transaminasa glutamato-oxalacetato (TGO)/Aspartato aminotransferasa (AST)

Se incubó el suero con buffer sustrato (K_2HPO_4 86 mM, KH_2PO_4 14 mM, L-aspartato 0.1 M; α -cetoglutarato 2 mM, pH 7.4;) durante 60 minutos a 37 °C, y también se usó un blanco de muestra el cual no fue incubado y el blanco el cual únicamente contenía agua con buffer sustrato. Después de la incubación se agregó a cada una de los tubos 2,4-dinitrofenil hidrazina 0.001 mM y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para detener la reacción se agregó NaOH 0.4 M, finalmente las muestras se leyeron a una longitud de onda de 546 nm (H.-U. Bergmeyer & Bernt, 1965).

Transaminasa Glutamato-Piruvato (TGP)/Alanina aminotransferasa (ALT)

Se incubó el suero con buffer sustrato (K_2HPO_4 86 mM, KH_2PO_4 14 mM, DL-alanina 0.2 M; α -cetoglutarato 2 mM, pH 7.4;) durante 30 minutos a 37 °C, también se usó un blanco de muestra el cual no fue incubado y el blanco el cual únicamente

contenía agua con buffer sustrato. Después de la incubación se agregó a cada una de los tubos 2,4-dinitrofenil hidrazina 0.001 mM y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, para detener la reacción se agregó NaOH 0.4 M, finalmente las muestras se leyeron a una longitud de onda de 546 nm (H.-U. Bergmeyer & Bernt, 1965).

Albúmina

A partir de las instrucciones del fabricante Spinreact BSIS02 Albúmina. Se colocó en una cubeta de espectrofotómetro, 1 ml de verde bromocresol (pH 4.2) y se agregaron 5 µl de muestra (suero libre de hemólisis), se mezcló y se incubó a una temperatura de 15-25°C durante 10 minutos, posteriormente se realizó la lectura a una longitud de onda de 630 nm.

Lactato deshidrogenasa (LDH)

La muestra de suero se incubó con solución Tris/NaCl/NADH (Tris, 81.3 mM; NaCl, 203.3 mM; NADH, 0.244 mM; pH 7.2) y se realizó una primera lectura espectrofotométrica a 340 nm. Posteriormente se agregó solución Tris/NaCl/Piruvato (Tris, 81.3 mM; NaCl, 203.3 mM; Piruvato, 9.76 mM; pH 7.2) para iniciar la reacción y se realizó la lectura a 0, 0.5, 1, 2, 3, y 5 minutos (H. U. Bergmeyer & Bernt, 1974).

Bilirrubina Total

A partir de las instrucciones del fabricante Spinreact 1001044 Bilirrubina T&D. Se colocaron en una cubeta de espectrofotómetro, 1.5 ml de una solución de ácido sulfanílico (30 mmol/L) y ácido clorhídrico (150 mmol/L), 50 µl de sodio nitrito (29 mmol/L) y se agregaron 100 µl de muestra (suero libre de hemólisis), se mezcló y se incubó a una temperatura de 15-25°C durante 5 minutos, posteriormente se realizó la lectura a una longitud de onda de 555 nm.

Ciclo de la Urea

Para realizar la determinación espectrofotométrica de metabolitos se colocó el extracto de suero obtenido con HClO₄ al 8%, se centrifugó y se obtuvo el sobrenadante, con la muestra ácida del suero se realizaron las determinaciones de

citrulina y ornitina, mientras que el resto de la muestra ácida se neutralizó 0.1 M NaOH.

Ornitina

Se incubó la muestra ácida con ácido acético glacial y reactivo de ninhidrina (140 mM, ácido acético 60% del volumen deseado, H_3PO_4 16.16% de volumen deseado, aforar con agua), mientras que el blanco se incubó con agua, posteriormente se incubaron durante 15 minutos en agua hirviendo, se disminuyó la temperatura y se agregó etanol 96% y se leyó 515 nm de absorbancia (Ramírez-Zamora et al., 2013).

Citrulina

Se incubó la muestra ácida con una solución de antipirina (antipirina 21 mM, $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 9H_2O$, ambos se diluyeron en una solución H_2SO_4 y H_2O 1:5) y solución de 2,3-Butanedione monoxime 0.5 % w/v, ambas se agregaron en proporciones iguales 1:1, se incubó la muestra durante 15 minutos en agua hirviendo y se realizó la medición espectrofotométrica a 460 nm (Ramírez-Zamora et al., 2013).

Arginina

Después de haber neutralizado la muestra se puso a incubar con buffer sustrato (KH_2PO_4 0.5 M diluido en NaOH 1M y agua, pH 7 se aforó hasta alcanzar el volumen deseado), NADH (20 mM), Piruvato (50 mM) y agua, se realizó la lectura a 340 nm (Ramírez-Zamora et al., 2013).

Nitritos

Se puso a incubar el suero neutralizado con clorhidrato de N(1-naftil) etilendiamina (16.6 mM), sulfanilamida (58 mM en solución H_3PO_4 al 5% w/v), durante 20 minutos a temperatura ambiente y se realizó la lectura espectrofotométrica a 550 nm (Green et al., 1982).

Amoníaco

Se incubó la muestra con buffer sustrato (Trietilamina-HCl 500 mM; 2-oxoglutarato 35 mM; ADP 1.82 mM; pH 8.0) y como blanco se utilizó el buffer de sustrato con agua, se esperó a que la reacción se estabilizara y se realizó la lectura

espectrofotométrica a 340 nm, posteriormente se agregó la enzima glutamato deshidrogenasa (GIDH 1200 kU/l) y de nuevo se realizó la lectura a diferentes tiempos 0, 15, 30 y 45 minutos, en cada tiempo se volvió realizar la lectura del blanco (H. Bergmeyer & Beutler, 1984).

Urea

A partir de la muestra resultante de la reacción de la muestra neutralizada con la enzima glutamato deshidrogenasa, se incubó la muestra con buffer sustrato (Tris base 150 mM; succinato 60 mM; 2-oxoglutarato 12.5 mM; ADP 2 mM; pH 8), se realizó una primera lectura a 340 nm y posteriormente se le agregó ureasa (500 kU/l en solución buffer de fosfatos 20 mM pH 6.8 y glicerol 50% v/v) y se volvió a leer a 340 nm, a diferentes tiempos 0, 15, 30 y 45 minutos (Kerscher & Ziegenhorn, 1983).

Ornitina Carbamoiltransferasa (OTC)

Se mezcló el suero con solución sustrato/ureasa (Carbamil-fosfato, 23 mM; clorhidrato de ornitina, 2.5 mM; ureasa 2500 U/l), se mezcló e incubó durante 30 minutos a 37 °C, después de este tiempo se le agregó la solución cromogénica (antipirina, 21 mM; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0.08 mM; ambos se diluyeron en una solución H_2SO_4 y H_2O 1:5) y solución de 2,3-butanodiona monoxima 0.5 % w/v), ambas se agregaron en proporciones iguales 1:1 y por último se colocaron en agua hirviendo durante 15 minutos, se enfriaron y se leyó a una absorbancia de 460 nm (Ceriotti, 1983).

Arginasa

Se incubó el suero con solución activadora MnCl_2 (10 mM), durante 20 minutos a 55 °C y se enfrió a 37 °C. Después se incubaron las muestras con buffer de carbonatos NaHCO_3 100mM; Na_2CO_3 100 mM; pH 9.5), solución de arginina (100 mM), mezclar e incubar durante 10 minutos a 37 °C. Finalmente agregar ácido acético glacial y ninhidrina (140 mM, H_3PO_4 al 16.16% v/v, ácido acético glacial al 60% v/v, aforar con agua hasta el volumen deseado) mezclar bien incubar en agua hirviendo durante 1 hora y realizar la lectura espectrofotométrica a 515 nm, el color es estable durante 1-2 horas (Gäde, 1983).

Cuantificación de citocinas y factores de crecimiento

A partir del plasma obtenido, se determinaron los títulos de citocinas: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF α , GM-CSF mediante Magpix. Esta técnica se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor. Se colocaron 100 μ L de anticuerpo (según la citocina) y fueron diluidos en amortiguador de carbonatos (recubrimiento) en cada pozo de la placa. La placa se incubó durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se lavó la placa en cinco ocasiones, utilizando 100 μ L de PBS + Tween 20 al 0,05%, en cada uno de los pozos de la placa, se agitó ligeramente durante 3 minutos en cada lavado. Después se incubó la placa con una solución de PBS-Tween 0,05% y leche descremada al 5% durante una hora a temperatura ambiente, para bloquear los espacios en los que el antígeno no se adhirió, nuevamente se hicieron cinco lavados. Posteriormente se añadieron 100 μ L de los sueros a cada uno de los pozos de la placa y se dejó una hilera o columna para los controles blanco. Se incubó la placa durante una hora a 37 °C, para permitir la reacción antígeno anticuerpo. Se lavó con PBS + Tween 0.05% la placa cinco veces más. Fueron añadidos 100 μ L del conjugado de peroxidasa en cada pozo de la placa y se dejó incubando durante una hora a 37 °C. Nuevamente se realizaron cinco lavados. Después de los lavados se añadió en cada uno de los pozos 100 μ L del sustrato (una tableta de orto-fenil-dietanolamina (OPD) disuelta en una mezcla de ácido cítrico y fosfato disódico a pH 5,0), a la que se añadieron 20 μ L de peróxido de hidrógeno. Una vez que ocurrió la reacción conjugado-sustrato se incubó la placa durante 30 minutos cubriéndola completamente de la luz y a temperatura ambiente, dicha reacción provocó un cambio en la coloración (amarillo – naranja). Finalmente, se colocó en cero el lector contra el blanco de sustrato, se leyó a una densidad óptica de 450 nm con corrección entre 570 y 590 nm.

Metabolismo de colágena

Se cuantificó la biodisponibilidad de la hidroxiprolina, se homogenizaron 100 mg de hígado en 0.5 ml de NaOH 7M, para facilitar su disolución se llevó a una temperatura de 120 °C durante 40 min en autoclave, posteriormente se

neutralizaron las muestras con 0.5 ml de H₂SO₄ 3.5M, éstas se llevaron a un volumen final de 10 ml con agua ultrapura, se tomaron 50 µL de las muestras y se les agregó 0.45 ml Cloramina T (cloramina T al 4%) para favorecer la formación de pirrolidona, se incubó a temperatura ambiente durante 25 min, se agregó a cada muestra 0.5 ml de reactivo de Ehrlich y se incubaron las muestras a 65 °C durante 20 min, las muestras fueron estimadas por espectrofotometría a 550 nm (Da Silva et al., 2015).

Determinación de anticuerpos

Inmunoglobulina M (IgM)

Se cuantificó la IgM por medio de ELISA, de acuerdo a lo indicado por el fabricante abcam ab157738 IgM Rat ELISA kit. Se prepararon las muestras de plasma diluyendo cada una, la dilución fue de 1/5000, primero y se transfirieron 5 µL de muestra a 495 µL de solución diluyente 1X (dilución de 1/100), después esta muestra se diluyó nuevamente transfiriendo 10 µL del stock a 490 µL de solución diluyente 1X (dilución 1/5000). Antes de realizar la curva estándar se reconstituyó el calibrador de IgM a una concentración final de 54,000 ng/mL. Se preparó una curva estándar a partir del calibrador de IgM, el tubo #1 contenía 18.5 µL de stock calibrador de IgE + 281.5 µL de solución diluyente 1x para obtener una concentración de 1000 ng/mL. Después se añadieron 150 µL de solución diluyente 1X en los números de tubo 2-6, se agregaron 150 µL del tubo #1 al tubo #2 y así sucesivamente en serie, el tubo #7 contenía únicamente solución de diluyente 1X, el cual sirvió como el estándar cero (0 ng/mL). Se pipetearon 100 µL de los tubos estándar, incluyendo el control cero, en duplicado. Por otro lado, se pipetearon 100 µL de muestra diluida en los pozos y la placa se incubó a temperatura ambiente durante treinta minutos manteniendo la placa cubierta nivelada. Después de la incubación, se aspiró el contenido de los pocillos, se lavaron los pozos buffer de lavado 1X, esto se repitió tres veces, para un total de cuatro lavados, posteriormente se secaron adecuadamente hasta eliminar el exceso de líquido. Se colocaron en cada pozo 100 µL de Conjugado Enzima-Anticuerpo 1X y se incubó a temperatura ambiente durante treinta minutos, manteniendo la placa cubierta en oscuridad y nivelada. Después de transcurrido el tiempo, se lavaron y secaron los pocillos en

cuatro ocasiones. Después del lavado y secado de los pozos, se pipetearon 100 μ L de solución de sustrato TMB en cada pocillo, se incubó la placa en oscuridad a temperatura ambiente durante exactamente diez minutos y posteriormente se agregaron 100 μ L de solución de paro a cada pocillo. Finalmente se determinó la absorbancia a 450 nm.

Inmunoglobulina E (IgE)

Se cuantificó de la IgE por medio de ELISA, se realizó la técnica basada en el procedimiento indicado por el fabricante abcam ab157736 IgE Rat ELISA kit. Se prepararon las muestras de plasma diluyendo cada una, la dilución fue 1/10 de la muestra, se transfirieron 30 μ L de muestra a 270 μ L Buffer diluyente 1X. Se preparó una curva estándar a partir de la reconstitución del calibrador de IgE, el tubo #1 contenía 5.18 μ L de stock calibrador de IgE + 294.82 μ L de solución diluyente 1x para obtener una concentración de 32 ng/mL, se añadieron 150 μ L de Solución diluyente 1X en los números de tubo 2-6, se realizaron diluciones seriadas de los tubos #2 al 6, el tubo #7 contenía únicamente solución de diluyente 1X, el cual sirvió como el estándar cero (0 ng/mL).

Se pipetearon 100 μ L de los tubos estándar, incluyendo el control cero, en duplicado. Por otro lado, se pipetearon 100 μ L de muestra diluida en los pozos y la placa se incubó a temperatura ambiente durante sesenta minutos manteniendo la placa cubierta nivelada. Después de la incubación, se aspiró el contenido de los pocillos, se lavaron los pozos buffer de lavado 1X, esto se repitió tres veces, para un total de cuatro lavados, se secaron adecuadamente hasta eliminar el exceso de líquido. Se colocaron en cada pozo 100 μ L de Conjugado Enzima-Anticuerpo 1X y se incubó a temperatura ambiente durante sesenta minutos, manteniendo la placa cubierta en oscuridad y nivelada, después de transcurrido el tiempo, se lavaron y secaron los pocillos en cuatro ocasiones. Después del lavado y secado de los pozos, se pipetearon 100 μ L de solución de Sustrato TMB en cada pocillo, se incubó la placa en oscuridad a temperatura ambiente durante exactamente diez minutos y posteriormente se agregaron 100 μ L de solución de paro a cada pocillo. Finalmente se determinó la absorbancia a 450 nm.

Inmunoglobulina G (IgG)

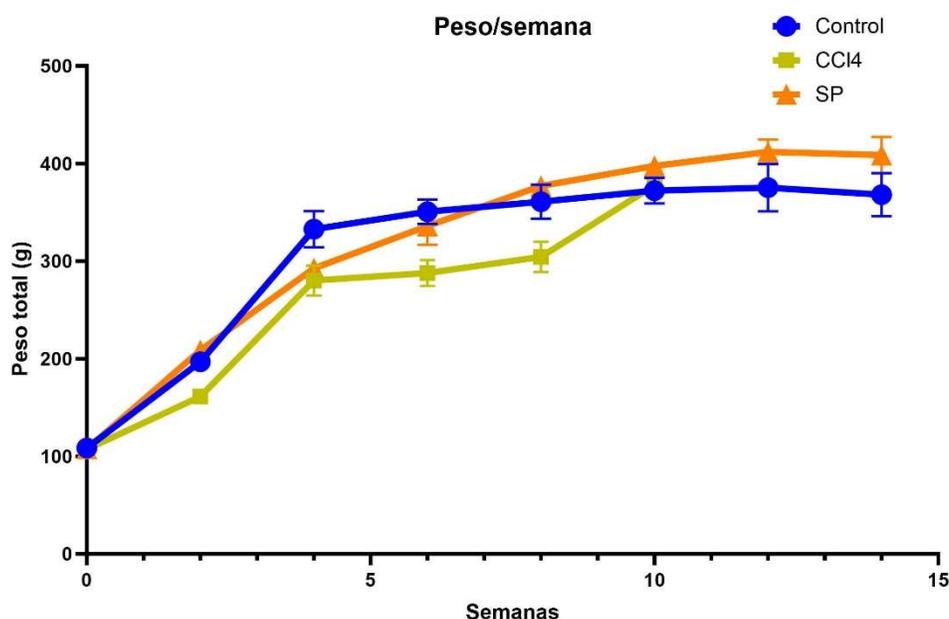
Se realizó la cuantificación de la IgG por medio de ELISA, se realizó la técnica basada en el procedimiento indicado por el fabricante abcam ab157737 IgG Rat ELISA kit. Se prepararon las muestras de plasma diluyendo cada una, la dilución fue 1:10,000 en buffer de lavado PT 1X, y después se diluyó 100 veces en diluyente de muestra NS para una dilución final de 1:1,000,000. Se preparó una curva estándar a partir de la reconstitución del calibrador de IgG, el tubo #1 contenía 3 μL de stock calibrador de IgG + 297 μL de diluyente de muestra NS 1x para obtener una concentración de 2,000 ng/mL, se añadieron 150 μL de diluyente de muestra NS 1X en los números de tubo 2-8, se realizaron diluciones seriadas de los tubos #2 al #8, el tubo #9 contenía únicamente diluyente de muestra NS 1X, el cual sirvió como el estándar cero (0 ng/mL). Se pipetearon 50 μL de los tubos estándar y las muestras diluidas 1:1,000,000 en los pozos, se pipetearon 50 μL del cóctel de anticuerpos previamente preparado diluyendo los anticuerpos de captura 1x y detector 1x en el diluyente de anticuerpo 4B y la placa se incubó a temperatura ambiente durante sesenta minutos manteniendo en agitación de 400 rpm. Después de la incubación, se aspiró el contenido de los pocillos, se lavaron los pozos con 350 μL buffer de lavado PT 1X, esto se repitió tres veces, para un total de cuatro lavados, se secaron adecuadamente hasta eliminar el exceso de líquido. Después del lavado y secado de los pozos, se pipetearon 100 μL de solución de Sustrato TMB en cada pocillo, se incubó la placa en oscuridad a temperatura ambiente durante exactamente tres minutos en agitación a 400 rpm y posteriormente se agregaron 100 μL de solución de paro a cada pocillo agitando durante 1 minuto. Finalmente se determinó la absorbancia a 450 nm.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se expresaron como medias y error estándar debido a que fue necesario conocer que tan dispersas se encontraban las medias de los análisis de los grupos control, CCl₄ y SP, a partir de estos datos, se realizó el análisis individual mediante t de Student no pareada. La significancia estadística en todos los casos se consideró con $p < 0.05$ respecto al tiempo y contra el grupo control. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para realizar el análisis comparativo de las características de dos modelos de daño hepático se indujo cirrosis en ratas Wistar a través de tratamientos con SP o con CCl_4 , además se agregaron grupos control para cada par de semanas. Las ratas partieron de un peso aproximado 100-120 g. Se midió la ganancia del peso corporal de las ratas cada semana durante todo el experimento. (gráfica 1). Al término del tiempo de tratamiento (dos, cuatro, seis, ocho y diez semanas para CCl_4 ; diez, doce y catorce semanas para SP) las ratas fueron sacrificadas y se obtuvieron los órganos (riñones, pulmones, estómago, corazón e hígado), estos posteriormente fueron almacenados en congelación a -20°C . Las ratas con muerte prematura fueron descartadas del análisis final.

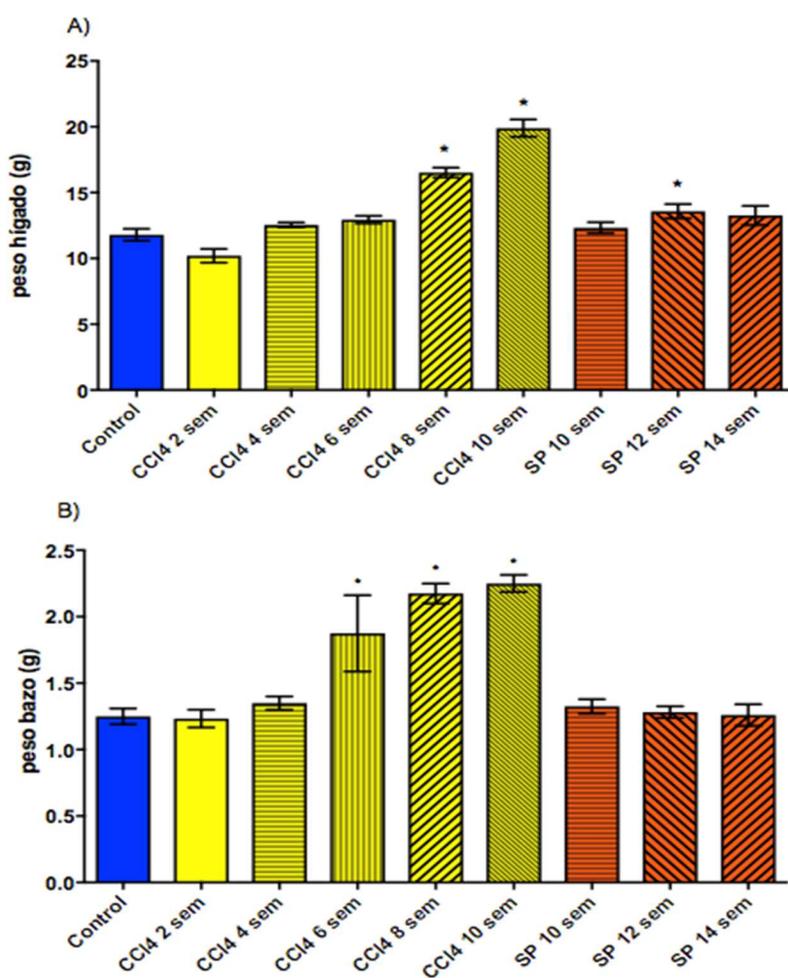


Gráfica 1. Grupo control (azul), CCl_4 (amarillo), SP (naranja). Se observó poca ganancia de peso entre las ratas tratadas con CCl_4 y su grupo control a lo largo del experimento. Por otro lado, las ratas tratadas con SP tuvieron una ganancia de peso similar a sus respectivos grupos control, es decir, no hubo diferencias significativas.

Se observó que las ratas tratadas con CCl_4 no ganaron el mismo peso que su respectivo grupo control, mientras que en el grupo con tratamiento de SP, las ratas se mantuvieron en pesos muy similares a los presentados por sus respectivos controles. La disminución en el peso de las ratas tratadas con CCl_4 se ha observado

en otros estudios, perdiendo alrededor del 20% de su peso en comparación con ratas del grupo control, esto puede deberse a los cambios anatómicos que sufren las ratas durante el tratamiento de CCl₄ (Fortea et al., 2018). Previamente al almacenaje de los órganos, se pesaron los hígados y bazo extraídos de las ratas tratadas con CCl₄, SP y grupo control.

Los hígados de las ratas tratadas con CCl₄ y SP presentaron características diferentes a los hígados de los grupos control (no se muestran imágenes). Los hígados de ratas tratadas con CCl₄ presentaron un nivel mayor de daño con



Leyenda. Grupo control (azul), Grupo CCl₄ (amarillo; sin líneas 2 semanas, líneas horizontales 4 semanas, líneas verticales 6 semanas, líneas ascendentes 8 semanas, líneas descendentes 10 semanas), Grupo SP (anaranjado; líneas horizontales 10 semanas, líneas descendentes 12 semanas, líneas ascendentes 14 semanas).

Gráfica 2. A. Peso hígado (g). Se presentó un incremento significativo en el peso y tamaño de los hígados (hepatomegalia) de las ratas tratadas con CCl₄ a partir de las ocho y diez semanas con respecto al grupo control. Por otro lado, sólo hubo diferencias a las doce semanas de tratamiento entre las ratas tratadas con SP y el grupo control. (*p<0.05). **B. Peso Bazo (g).** Únicamente hubo incremento en el peso y tamaño de los bazo (esplenomegalia) de las ratas tratadas con CCl₄ a las seis, ocho y diez semanas con respecto a los controles (*p<0.05). No se observaron diferencias significativas entre las ratas tratadas con SP y los controles.

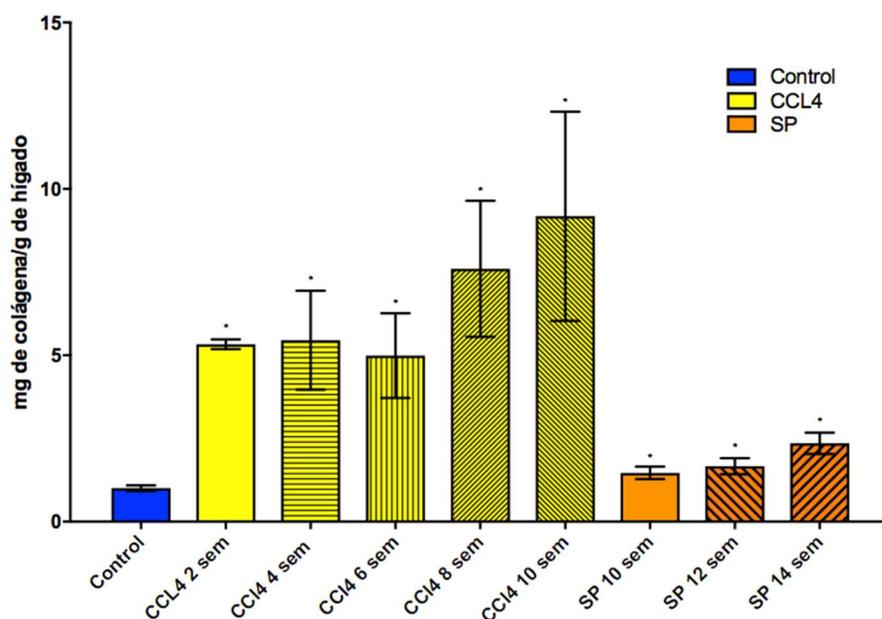
respecto al grupo control y también al grupo SP. En ambos casos, los grupos CCl₄ y SP tuvieron una coloración pálida y textura rugosa, por otro lado, los hígados y bazo del grupo CCl₄ presentaron pesos superiores a los cuantificados en los

grupos control y SP. Para tener un mejor margen comparativo se pesaron los hígados y bazo obtenidos de los grupos experimentales (Gráfica 2).

Colágena (cuantificación de hidroxiprolina)

Se obtuvieron fragmentos de hígado (~100 mg) para llevar a cabo la cuantificación de colágena (mg de colágena/g de hígado) a partir de la hidrólisis alcalina de los homogeneizados. Se cuantificó la colágena de acuerdo a la biodisponibilidad de hidroxiprolina la cual constituye ~17.8% de la colágena en el hígado (Fowler, 1969) en espectrofotómetro a 560 nm como referencia para la medición de la concentración final de mg de colágena por g de hígado (gráfica 3). Los datos vertidos en la gráfica muestran la concentración de colágena a diferentes tiempos; es decir, en ambos modelos de CCl₄ y de SP se observó un incremento de la concentración hepática de colágena. El incremento más notable e importante ocurrió a las ocho y diez semanas en el modelo de CCl₄, aunque en menor proporción también se observó un incremento significativo de concentración de hidroxiprolina presente en los hígados tratados con SP comparado con el grupo control (*p<0.05 a 0.01). Estos datos sugieren que ambos modelos difieren mucho en el mecanismo de inducción de la cirrosis hepática, en el tratamiento con SP la fibrosis hepática ocurre de manera gradual y menos intensa que en el modelo de CCl₄.

En otros estudios, se ha observado que durante la administración de CCl₄ ocurre la necrosis centro-zonal en hígado (F. Sun et al., 2001), la cual trae como consecuencia el incremento de la concentración de colágena. Esto se ha observado en el modelo de cirrosis inducida por CCl₄ (en ratas y ratones) desde el inicio de la administración (Iredale et al., 1998) y continúa incrementando a lo largo del tratamiento (Abdel Aziz et al., 2007; Hernández-Muñoz et al., 2001; Issa et al., 2003; H. Sun et al., 2010), lo cual significa que la hepato-toxicidad por la administración de CCl₄ no se limita únicamente a la muerte de los hepatocitos, también promueve un cambio conformacional de la arquitectura del hígado debido a síntesis de la colágena (H. Sun et al., 2010). De igual manera, Wu y Norton en 1996 realizaron un



Gráfica 3. Concentración de colágena en hígado. Se observó el aumento de la concentración de la colágena en ratas tratadas con CCl₄ desde las dos semanas a las diez semanas de tratamiento, y desde las diez a las catorce semanas para SP. Hubo cambios significativos en ambos casos con respecto al grupo control (*p<0.05).

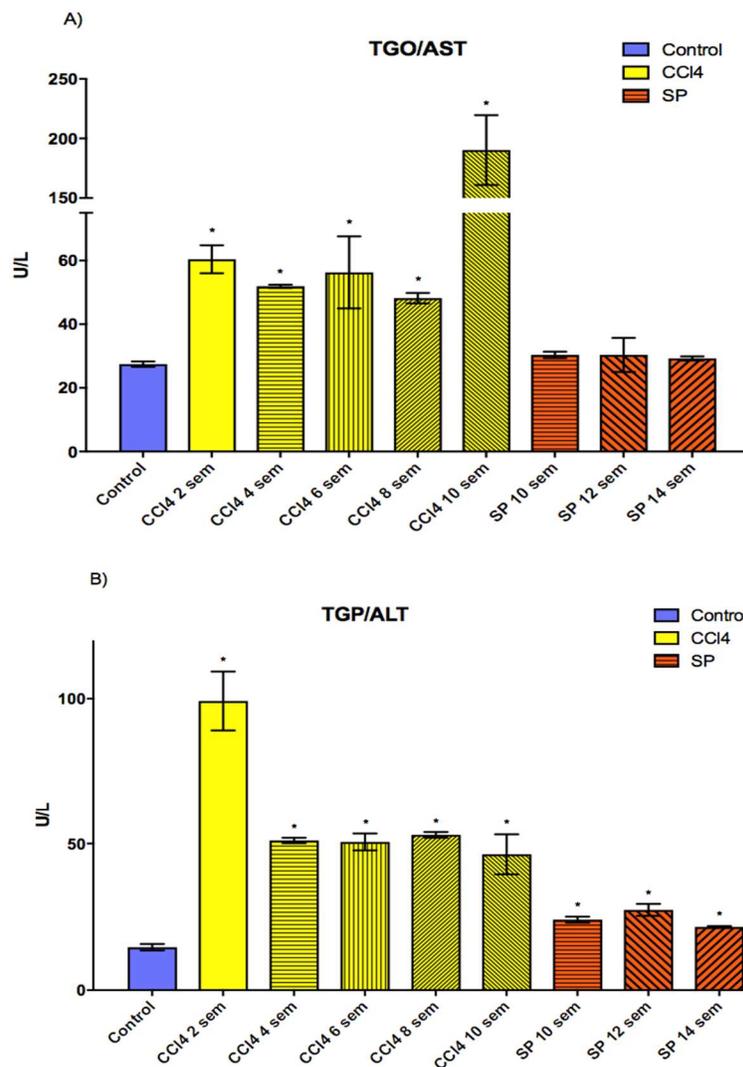
análisis comparativo de diferentes modelos de fibrosis/cirrosis, donde mencionan que la fibrosis del hígado en ratas tratadas con SP ocurre a las seis semanas, mientras a las diez semanas la cirrosis ya está establecida. Lo anterior fue constatado por otros autores (Fujiwara et al., 1988), retomando este trabajo se observó el incremento de colágena a las diez semanas, ésta fue incrementando posteriormente en las semanas subsecuentes del tratamiento. En ambos casos (SP y CCl₄), se podría suponer la pérdida de algunas funciones del hígado debido al incremento de la concentración de colágena. Es importante mencionar que se realizó un análisis comparativo entre los últimos tiempos de tratamiento con SP y CCl₄, se observó que la producción de colágena fue mayor en las ratas tratadas con CCl₄. La similitud más notable entre ambos modelos de daño hepático, es la acumulación frecuente de colágena en la matriz extracelular (Bickel et al., 1998; Wu & Norton, 1996), la cual puede llevar a complicaciones letales cuando el daño es irreversible.

Análisis Bioquímico

Pruebas de función de hepática

Transaminasas (TGO y TGP)

Después de obtener el suero de la sangre colectada en tubos vacutainer™ con EDTA como anticoagulante, se extrajo plasma y se realizaron determinaciones colorimétricas de las Transaminasas. La Transaminasa Glutamato-Piruvato se encuentra principalmente en el citoplasma de los hepatocitos (TGP o ALT) y Transaminasas Glutamato-Oxaloacetato (TGO o AST) se encuentra en mitocondria y citoplasma de diversos tipos celulares (gráfica 4).



Gráfica 4. A. Transaminasa Glutamato-oxalacetato (Aspartato aminotransferasa), (U/L). En las ratas tratadas con CCl₄ hubo un incremento de los niveles de la enzima TGO con respecto a los grupos control en los grupos tratados con SP no hubo cambio significativo pues los niveles de TGO son similares al grupo control.

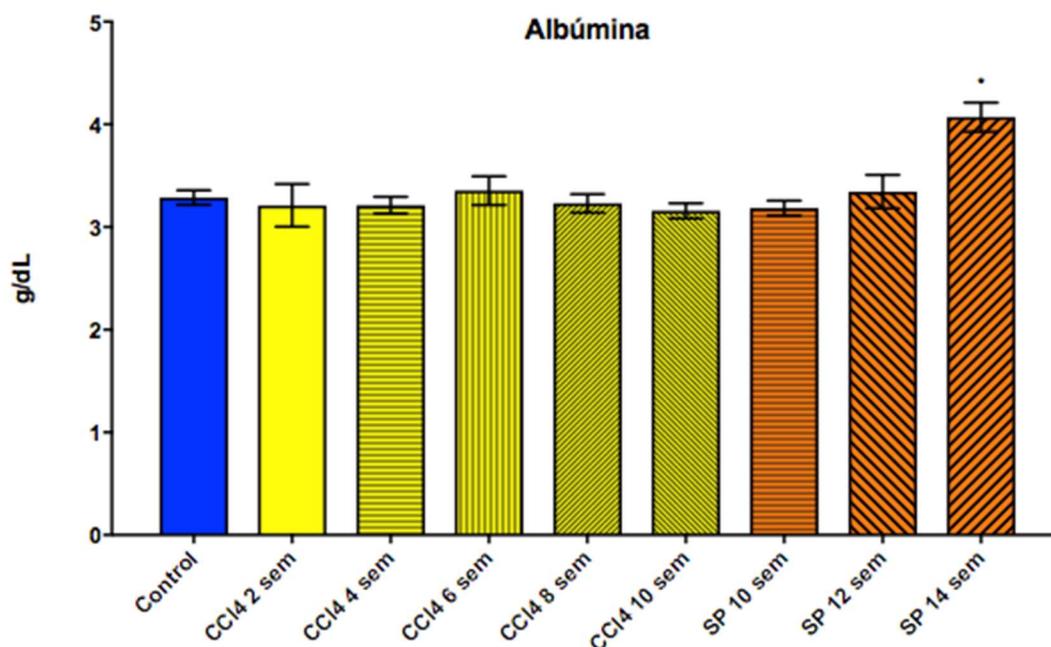
B. Transaminasa glutamato-piruvato (Alanina aminotransferasa), (U/L). En ambos tratamientos hubo cambios significativos en el nivel de la TGP con respecto al grupos control. Aunque son un poco más discretos en ratas tratadas con SP los datos son significativos *p<0.05 a 0.01.

Se observaron niveles séricos altos de las actividades de TGO/AST y TGP/ALT en las ratas tratadas con CCl₄; sin embargo, en los grupos tratados con SP, únicamente se observaron niveles altos de la TGP, lo que podría sugerir la ruptura de la membrana plasmática de los hepatocitos. Por otro lado, previo a la cuantificación se observó una coloración amarillenta en el plasma obtenido de las ratas tratadas con CCl₄ lo que sugiere la presencia de bilirrubina, la cual es otro indicador de daño hepático (Boll et al., 2001; Tomasi et al., 1987).

Los altos niveles séricos de TGO/AST en las ratas tratadas con CCl₄ se observaron desde el inicio del tratamiento y continuó elevado hasta las diez semanas, y esto concuerda con lo que ha sido observado en diversas investigaciones donde prueban la toxicidad y tratamientos contra la cirrosis inducida por CCl₄ (Bickel et al., 1998; Bishayi et al., 2002; Chagoya de Sánchez et al., 2012; Hernández-Muñoz et al., 2001; Jeong et al., 2005; Oyagi et al., 2006; F. Sun et al., 2001; H. Sun et al., 2010). En general se ha observado este incremento seguido de elevación de triglicéridos y disminución de la función hepática (Scholten et al., 2015). Por otro lado, las ratas tratadas con SP no tuvieron ningún cambio significativo en los niveles de transaminasas glutamato-oxalacetato con respecto al grupo control, lo anterior fue observado anteriormente en otro trabajo (Shiga et al., 1997). Sin embargo, Osuna-Martínez y colaboradores en 2012 observaron diferencias significativas entre los niveles de TGO/AST de ratas tratadas con SP y sus respectivos grupos control. El incremento de TGP/ALT en diversos modelos de cirrosis ha sido reportado frecuentemente, particularmente en el modelo de CCl₄, y esta tendencia es recurrente (Badger et al., 1996; Bickel et al., 1998; Hernández-Muñoz et al., 2001; Muriel et al., 2005; H. Sun et al., 2010; Wu & Norton, 1996; Zhang et al., 2016), tal como fue observado en este trabajo; sin embargo, también en modelos de cirrosis inducida por SP se ha observado incremento pero sin diferencias significativas (Liu et al., 2009; Osuna-Martínez et al., 2011; Sakaida et al., 1998; Shiga et al., 1997). En este trabajo se observaron diferencias significativas de TGP con respecto al control y el modelo CCl₄, pero de pequeña magnitud y sin gran variabilidad en el tiempo.

Albúmina

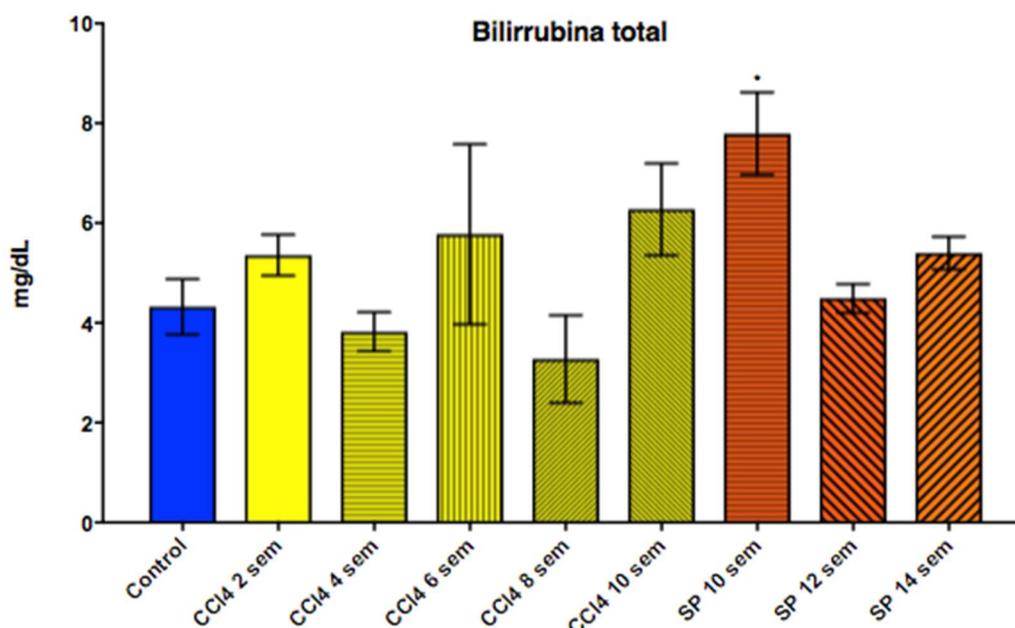
Se cuantificó la presencia de albúmina en suero, sin embargo, no se observaron cambios significativos de las ratas tratadas con CCl_4 con respecto a su grupo control. Por otro lado, en los sueros de las ratas tratadas con SP únicamente se observó un aumento significativo a las catorce semanas de tratamiento con respecto al grupo control y a los grupos tratados con CCl_4 (gráfica 5). Estos hallazgos se compararon con lo realizado en estudios previos donde se observó la disminución de la síntesis de albúmina al compararlos con sus grupos control (Hernández-Muñoz et al., 2001; Oyagi et al., 2006; Scholten et al., 2015; Starkel & Leclercq, 2011), muchos de esos no parecen ser significativos, lo que concuerda con este trabajo. Finalmente, Shiga y colaboradores en 1996 observaron el incremento de la concentración de albúmina en ratas tratadas con SP a la octava semana de tratamiento, observándose en este estudio un incremento significativo a las catorce semanas de tratamiento.



Gráfica 5. Albúmina (g/dL). Las ratas tratadas con CCl_4 no mostraron incrementos en las concentraciones de albúmina al compararlos con el grupo control. Las ratas tratadas con SP mostraron altas concentraciones de albúmina en la decimocuarta semana de tratamiento (* $p < 0.05$ a 0.01).

Bilirrubina

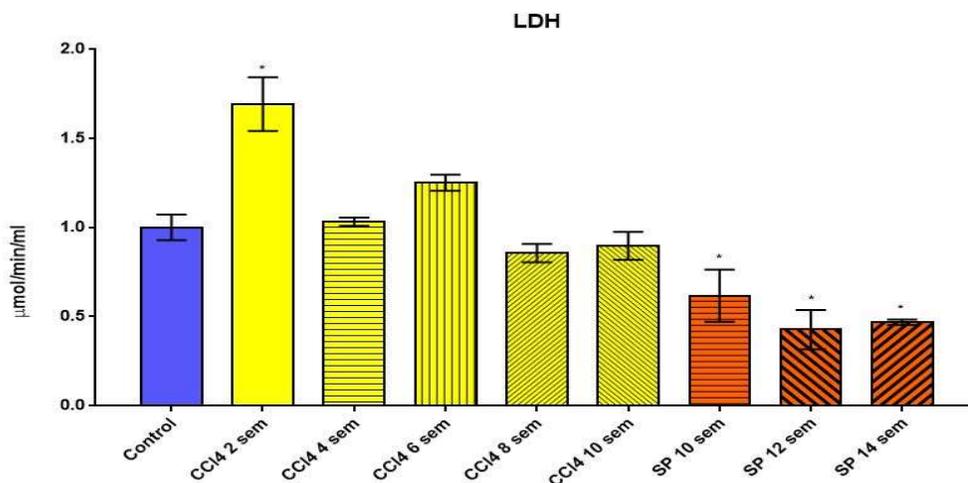
Se realizó la cuantificación de bilirrubina total (gráfica 6) y directa (no se muestra), y se observaron distintos cambios a lo largo de los tratamientos para CCl₄ y SP. Sin embargo, el único tiempo donde se encontró una diferencia significativa ocurrió a la décima semana del tratamiento con SP y después de esto no se observó ningún incremento notable. Se ha usado el aumento de la concentración de la bilirrubina total como un indicador de daño hepático, sumado al cuadro de ictericia que se presenta en los organismos de estudio (Bickel et al., 1998; Bishayi et al., 2002). Por otro lado, el incremento de la concentración de bilirrubina total se observó en las primeras semanas de tratamiento con CCl₄, dicha variación puede ocurrir debido a la edad de las ratas, tiempo de tratamientos e incluso distintas concentraciones usadas (Hernández-Muñoz et al., 2001; Zhang et al., 2016).



Gráfica 6. Bilirrubina total (mg/dL). Las ratas tratadas con CCl₄ no mostraron incrementos en las concentraciones de bilirrubina al compararlos con el grupo control. Por su parte, las ratas tratadas con SP sólo mostraron un incremento significativo en la décima semana de tratamiento, posteriormente disminuyó (* $p < 0.05$ a 0.01).

Lactato Deshidrogenasa

En las ratas tratadas con CCl_4 , solamente se observó un incremento en la actividad sérica de LDH durante la segunda semana de tratamiento, posteriormente se mantuvo en condiciones similares a los grupos control. En estudios previos, se ha reportado el incremento de la actividad sérica de LDH, ya que al ser una enzima citosólica es un buen indicador de daño hepático en el tratamiento con CCl_4 en ratas y ratones (Al-Ghamdi, 2003; Lu et al., 2011; Rusu et al., 2005; Shahjahan et al., 2004); sin embargo, la especificidad de la isoenzima localizada en suero podría ser un importante indicador del daño en el hígado (Ali, 2010; Lu et al., 2011). Los niveles de la enzima LDH en ratas tratadas con SP se mantuvieron por debajo de los grupos control ($p < 0.05$). Al comparar los últimos grupos de cada tratamiento se observaron diferencias significativas entre ambos, es decir, los niveles de LDH fueron inferiores en el grupo de ratas tratadas con SP a las catorce semanas (SP 14 sem) con respecto a las ratas tratadas con CCl_4 diez semanas (CCl_4 10 sem) (gráfica 7). En el modelo de fibrosis inducido por SP no hay reporte de cambios en la actividad de LDH, sin embargo, es importante notar que en este trabajo se cuantificó la actividad

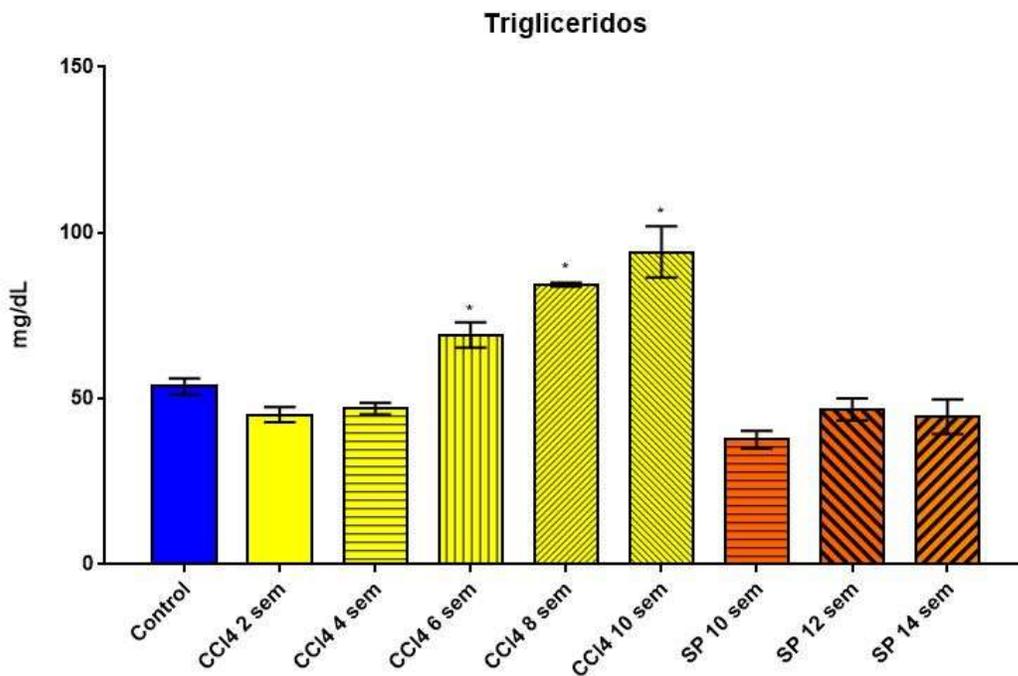


Gráfica 7. Lactato deshidrogenasa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$). En ratas tratadas con CCl_4 , se observaron cambios significativos al inicio del tratamiento (segunda semana) posteriormente el nivel de LDH se mantuvo similar al grupo control. Por otro lado, en las ratas tratadas con SP los niveles de LDH se mantuvieron por debajo del grupo control (* $p < 0.05$ a 0.01).

por debajo de lo presentado en el grupo control.

Triglicéridos en plasma

La concentración de triglicéridos en suero incrementó a lo largo del tratamiento con CCl₄, esto ha sido reportado previamente en casos hepatitis crónica y aguda, y parece estar relacionado con la disminución del catabolismo de los triglicéridos (Ali et al., 2010). Los cambios provocados por el CCl₄ llevan a la esterificación de los ácidos grasos libres y fosfolípidos, permitiendo la rápida acumulación de estos en el hígado (esteatosis) (Boll et al., 2001; Ramasamy et al., 2014). Por otro lado, no se observaron cambios significativos en el aumento de triglicéridos en las ratas tratadas con SP (gráfica 8).



Gráfica 8. Triglicéridos (mg/dL). Se observó el incremento en la concentración de triglicéridos en las ratas tratadas con CCl₄, ocurrió a partir de la sexta semana y continuó incrementando las semanas posteriores (*p<0.05 a 0.01). Por otro lado, en ratas tratadas con SP no ocurrió ningún cambio, los niveles de triglicéridos se mantuvieron levemente por debajo de los grupos control, aunque este cambio no fue significativo (*p<0.05 a 0.01).

Para ambos modelos, el daño en el hígado ocurrió, sin embargo, el metabolismo de lípidos ocurre de manera normal en el modelo de SP. El daño presentado por las ratas tratadas con CCl₄, tiene características similares a las presentadas por la esteatosis provocada por consumo excesivo de alcohol o dietas basadas en ácidos grasos de cadena larga (Lieber, 2004).

Ciclo de urea

A través de la ureogénesis, que ocurre principalmente en el hígado, se eliminan los excedentes de amonio resultante del metabolismo de aminoácidos. Una falla en el ciclo implica la acumulación de amonio en las células y síntesis deficiente de urea. En el ciclo intervienen 5 reacciones, dos son mitocondriales y tres citoplásmicas (figura 4) (Boyle, 2005).

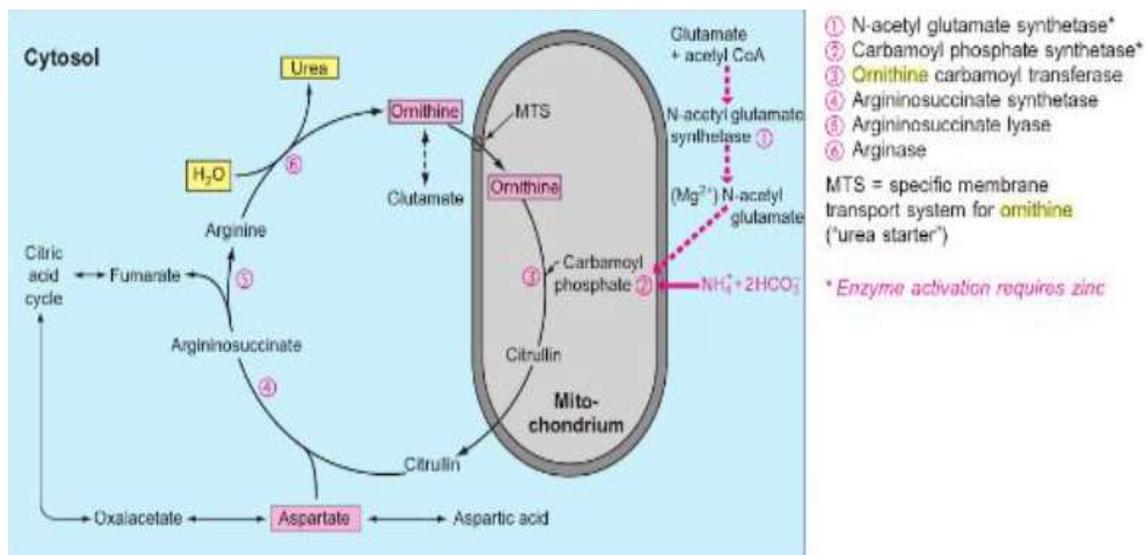


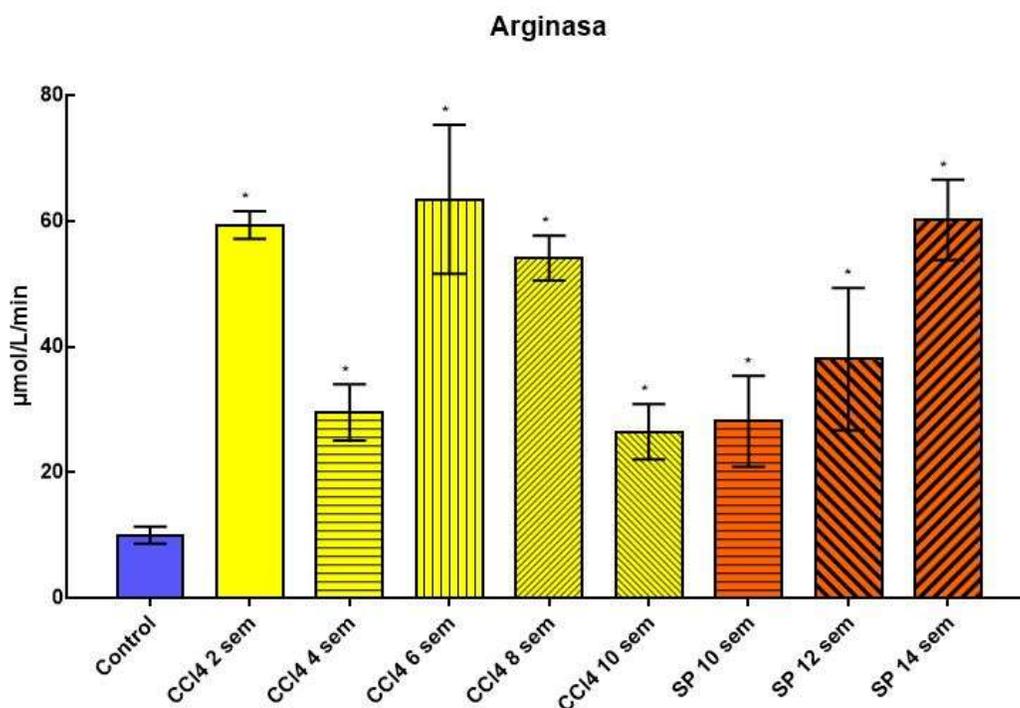
FIGURA 4. DIAGRAMA QUE MUESTRA EL PROCESO DE DESINTOXICACIÓN EN EL CICLO DE LA UREA (Boyle, 2005)

Arginasa y arginina en suero

Las enzimas arginasas I y II son isozimas que se encuentran en humanos y mamíferos; la arginasa I es citosólica y por ello es liberada cuando ocurre la ruptura de los hepatocitos, mientras que la arginasa II es liberada de la mitocondria. Ambas participan en la hidrólisis de la arginina a ornitina lo cual forma parte del ciclo de la urea (Boyle, 2005).

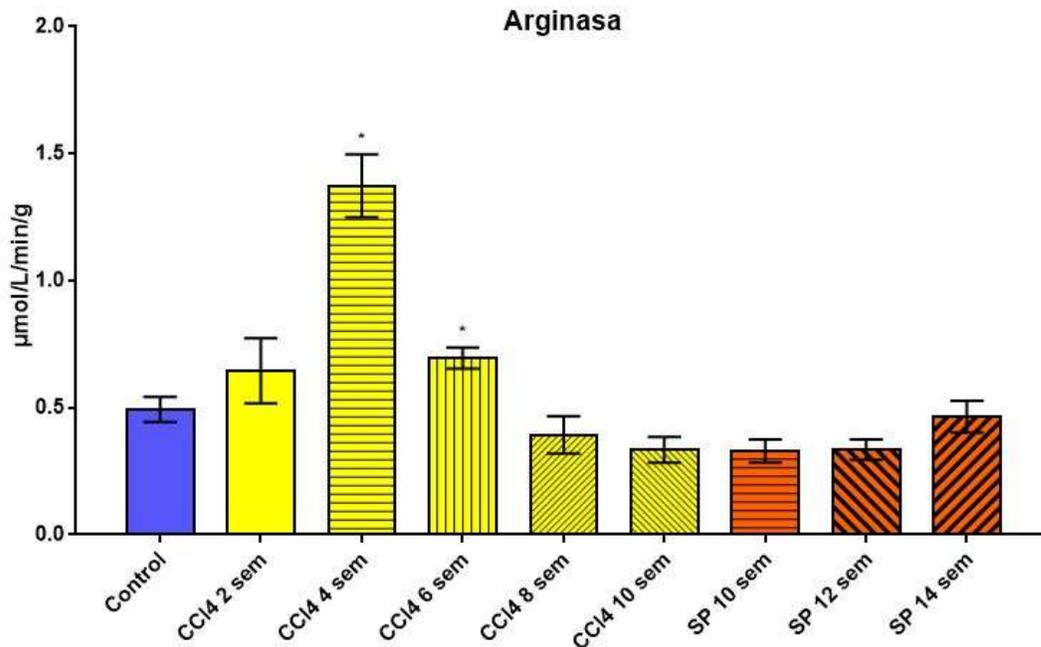
Se cuantificó actividad de la arginasa en plasma y homogenado de hígado de ratas tratadas con CCl_4 y SP. Se observaron primero los cambios en el plasma de ratas tratadas con CCl_4 , en el cual se presentó un incremento de la concentración de arginasa desde la segunda a la décima semana con respecto al grupo control

(*p<0.05 a 0.01); sin embargo, el incremento máximo ocurrió a las seis y ocho semanas. Por otro lado, los niveles de la actividad de la arginasa en plasma en ratas tratadas con SP incrementó gradualmente desde las diez semanas y continuó aumentando a las catorce semanas. Al comparar los últimos dos grupos de cada tratamiento se observaron cambios significativos entra CCl₄ 10 sem vs SP 14 sem (gráfica 9).



Gráfica 9. Arginasa (en plasma, µmol/L/ml). En ratas tratadas con CCl₄, se cuantificó la actividad de la enzima arginasa (en plasma), a lo largo de las semanas de tratamiento ocurrieron incrementos en las concentraciones, dichos cambios fueron comparados con el grupo control (*p<0.05 a 0.01). En el tratamiento con SP también incremento, sin embargo, ocurrió de manera gradual, estos cambios se compararon con el grupo control (*p<0.05 a 0.01).

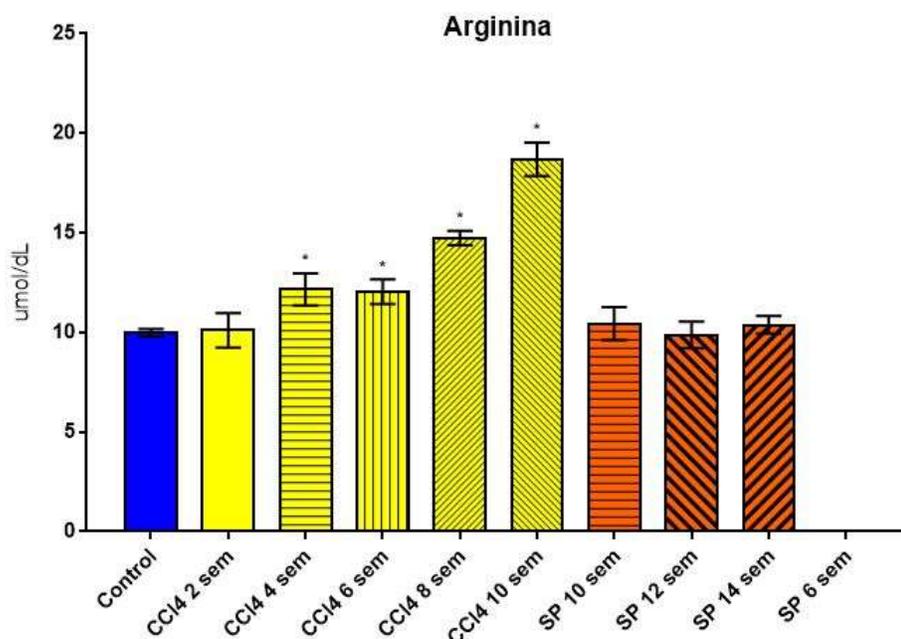
Se realizaron cuantificaciones de la actividad de la arginasa en homogenado de hígado de rata en ambos tratamientos (CCl₄ y SP). Los niveles de actividad de la arginasa tuvieron un incremento máximo a las cuatro y seis semanas, posteriormente actividad de la arginasa se mantuvo constante y cercana a la concentración del grupo control. En las ratas tratadas con SP no se observaron cambios significativos y la actividad de la arginasa se mantuvo levemente por debajo del grupo control (gráfica 10).



Gráfica 10. Arginasa (en homogenado, µmol/L/min/g). En ratas tratadas con CCl₄, las concentraciones de arginasa fueron medidas en homogenado de hígado de rata a lo largo de diez semanas de tratamiento, se presentaron cambios significativos en la cuarta y sexta semana (*p<0.05 a 0.01), sin embargo, disminuyeron a partir de la octava y décima semana. En ratas tratadas con SP, no se observaron cambios significativos (*p<0.05 a 0.01).

El hígado contiene una gran cantidad de arginasa I, por lo tanto, cualquier enfermedad o daño en el hígado (incluso un trasplante) puede resultar en el aumento de esta enzima (Morris, 2012). Por otro lado, la arginina cumple diversas funciones en las células, como sustrato de la biosíntesis de proteínas (Weber et al., 2003). En ratas tratadas con SP, se cuantificaron altas actividades de arginasa en plasma, pero no ocurrió lo mismo en homogenado de hígado, lo cual podría sugerir que se trata de la isoenzima arginasa-1, misma que puede ser secretada por un fenotipo de macrófagos M2, las cuales expresan arginasa-1 e iNOS. Estos dos últimos se han estudiado en el contexto de respuestas Th1; sin embargo, arginasa-1 puede polarizar hacia respuesta Th2 mediante un mecanismo aún desconocido (Pesce et al., 2009).

Por otra parte, los niveles plasmáticos de arginina incrementaron a lo largo de la temporalidad de los tratamientos con CCl₄, y se observaron cambios significativos con respecto al grupo control (*p<0.05). No hubo cambios significativos aparentes en ratas tratadas con SP al compararse con el grupo control (*p<0.05 a 0.01) (gráfica 11). Lo observado en las gráficas anteriores, podría indicar que los hepatocitos de las ratas tratadas con CCl₄ liberan arginasa al plasma y la arginasa localizada en hígado comienza a disminuir, es decir, ocurre desequilibrio entre la enzima arginasa que cataliza la reacción de arginina a ornitina y urea. Es importante mencionar que el aumento de la arginasa y la arginina pueden ser considerados marcadores en el diagnóstico del daño hepático, por lo menos en el modelo de CCl₄ (Kayali et al., 2009). Por su parte, siguiendo con la hipótesis de la presencia de macrófagos activados por la vía alternativa (M2 que expresan arginasa-1), estos serían los encargados de catalizar la hidrólisis arginina en urea y ornitina (Pesce et al., 2009), por esta razón en los grupos tratados con SP se observan concentraciones de arginina relativamente normales con respecto a la arginasa encontrada en este estudio, sin embargo, para corroborar lo anterior es



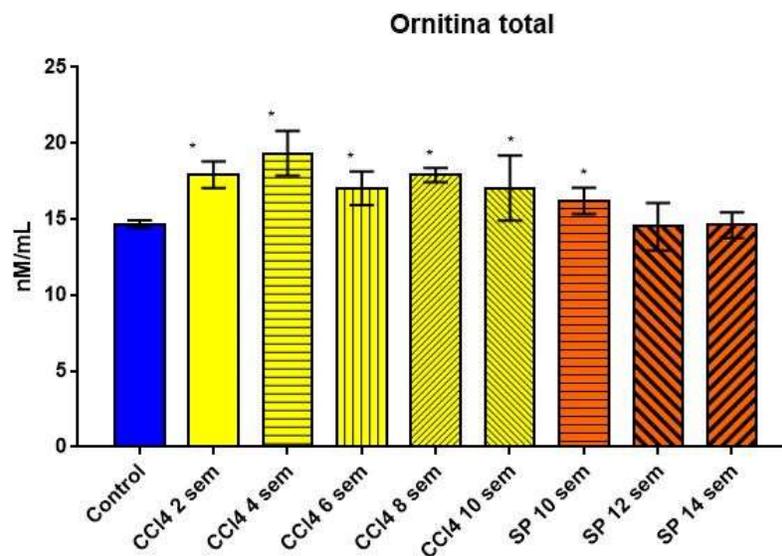
Gráfica 11. Arginina (µmol/dL). En ratas tratadas con CCl₄, las concentraciones de arginina se cuantificaron en suero de rata a lo largo de diez semanas de tratamiento, se presentaron cambios significativos a partir de la cuarta semana, el incremento fue gradual hasta la décima semana de tratamiento. (*p<0.05 a 0.01). En ratas tratadas con SP, no se observaron cambios significativos (*p<0.05 a 0.01).

recomendable realizar los marcajes a poblaciones del fenotipo M2 (CD163, Arg1, Mcr2) de células de Kupffer (Wan et al., 2014).

Ornitina, Ornitina transcarbamilasa y Citrulina

Ornitina

La ornitina, es un producto de la catálisis de la arginasa sobre la L-arginina que tiene como resultado la formación de urea y ornitina (L-ornitina), y ésta se transporta a la mitocondria, donde comúnmente se considera como el inicio del ciclo de la urea. La ornitina es un intermediario clave en el metabolismo nitrogenado y desempeña una función similar a la del oxalacetato en el ciclo de Krebs, aceptando material en cada vuelta (Forni et al., 1983). Aquí, observamos cambios en la concentración de ornitina en plasma de ratas tratadas con CCl₄ desde el inicio del tratamiento y fue constante este incremento en las semanas posteriores, sin embargo, en los grupos tratados con SP se observó una elevación únicamente durante la décima semana de tratamiento (gráfica 12).



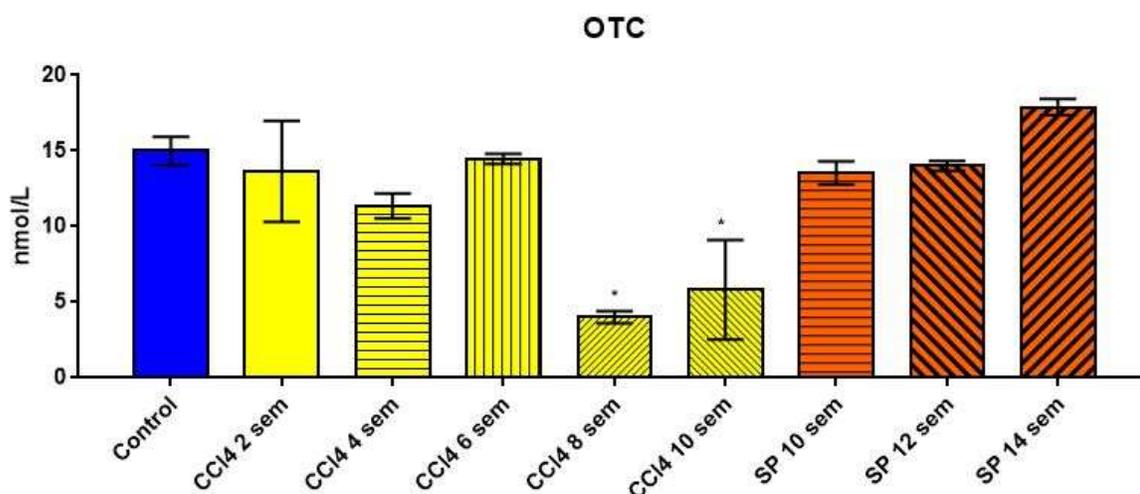
Gráfica 12. Ornitina (nmol/mL). Hubo un incremento del aminoácido dibásico ornitina en los grupos tratados con CCl₄ con respecto a el grupo control, el aumento ocurrió desde la segunda semana y fue constante a lo largo de las diez semanas de tratamiento. Por otro lado, en el tratamiento con SP hubo un incremento en la décima semana y este disminuyó a concentraciones similares a las presentadas por los grupos control (*p<0.05 a 0.01).

Los niveles altos de ornitina en las ratas tratadas con CCl₄ indican un desbalance en el ciclo de la urea, lo cual se suma a lo observado anteriormente en las gráficas

de arginasa. Es decir, las altas concentraciones de arginina y ornitina funcionan como biomarcadores de la desregulación del metabolismo de la arginina, como factor de riesgo y de mortalidad (Morris, 2012). Cabe destacar que la producción de ornitina está relacionada con la proliferación celular a través de la generación de poliaminas y por otro lado promueve la reparación celular (mediante prolinas) a través de la síntesis de colágena (Yang & Ming, 2014).

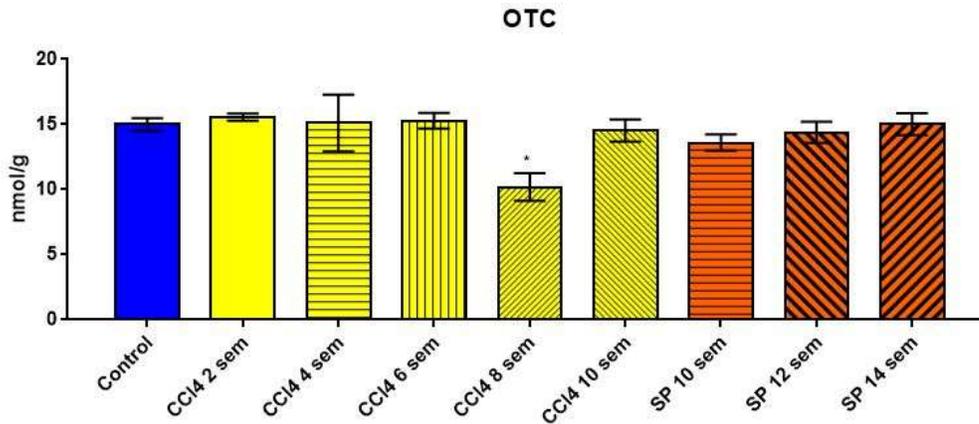
Ornitina transcarbamilasa

La ornitina transcarbamilasa (OTC) es una enzima mitocondrial encargada de catalizar reacción entre la ornitina y carbamoil fosfato a citrulina y Pi. Se cuantificaron los niveles de la actividad de la enzima OTC en plasma y homogenado de hígado de ratas. En el plasma se encontraron actividades de OTC similares al grupo control; sin embargo, durante la octava y décima semana de tratamiento con CCl₄ se observó una disminución significativa con respecto al control (*p<0.05), en cambio, en las ratas tratadas con SP no se observaron cambios significativos con respecto al grupo control (*p<0.05) (gráfica 13).



Gráfica 13. OTC en plasma (nmol/L). En los grupos tratados con CCl₄, existe un descenso de la actividad de la enzima OTC con respecto al grupo control, esto se presentó en la octava semana de tratamiento y continuó en la décima semana. Por su parte, en los grupos administrados con SP, el incremento de la enzima ocurrió en la decimocuarta semana, no hubo diferencias significativas. (*p<0.05)

Por otro lado, también se cuantificó la actividad enzimática de la OTC en homogenado de hígado de ratas; en ratas tratadas con CCl₄ y SP donde no se observó ningún cambio. De hecho, únicamente se encontró una disminución atípica en la octava semana de tratamiento con CCl₄ (gráfica 14).



Gráfica 14. OTC en homogenado de hígado de rata (nmol/L/g). En los grupos tratados con CCl₄, no hubo incremento de la concentración de la enzima, se encontraron ocurridos en la octava semana de tratamiento, sin embargo, en la décima semana este cambio no se hizo presente. En los grupos con tratamiento con SP no se observó ningún cambio a lo largo del tiempo. (*p<0.05)

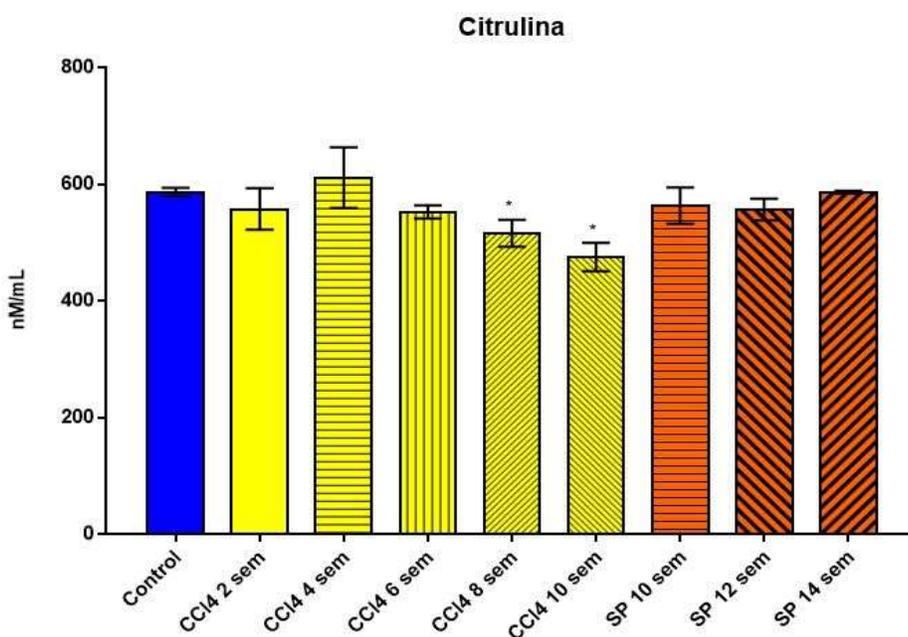
En las últimas semanas de tratamiento con CCl₄ se observó en plasma la disminución de la enzima. La deficiencia enzimática de OTC, puede ser relacionada con problemas de atrofia cerebral y encefalopatías debido al incremento de amonio (Takanashi et al., 2002; Weber et al., 2003). Por otro lado, se ha observado que enfermedad hepática crónica e hígado cirrótico provocada a través del virus de hepatitis, el incremento de los niveles de OTC es un indicador de daño hepático severo (Murayama et al., 2007), sin embargo, en este trabajo en el modelo de SP, la OTC tuvo un incremento discreto en la décimo cuarta semana de tratamiento el cual no fue significativo.

Citrulina

Se ha reportado a la citrulina como un marcador de función intestinal, además de ser el intermediario de la conversión de glutamina a citrulina, la cual es transportada a los riñones para ayudar en la síntesis *de novo* de la arginina (Forni et al., 1983; Rabier & Kamoun, 1995). Esto podría ser la razón por la cual la citrulina se ha sido

identificado como un marcador potencial de la función renal (Bahri et al., 2013). En un estudio se demostró que el hígado humano es capaz de absorber una cantidad sustancial de citrulina obtenida intestinalmente (Tomasi et al., 1987; Varela-Moreiras et al., 1995).

La concentración de citrulina en plasma permaneció de manera uniforme durante las primeras seis semanas de tratamiento con CCl₄, pese a esto, la concentración de citrulina disminuyó en la octava y décima semana de tratamiento. Por otro lado, en las ratas tratadas con SP no se observaron cambios significativos con respecto al grupo control (gráfica 15).

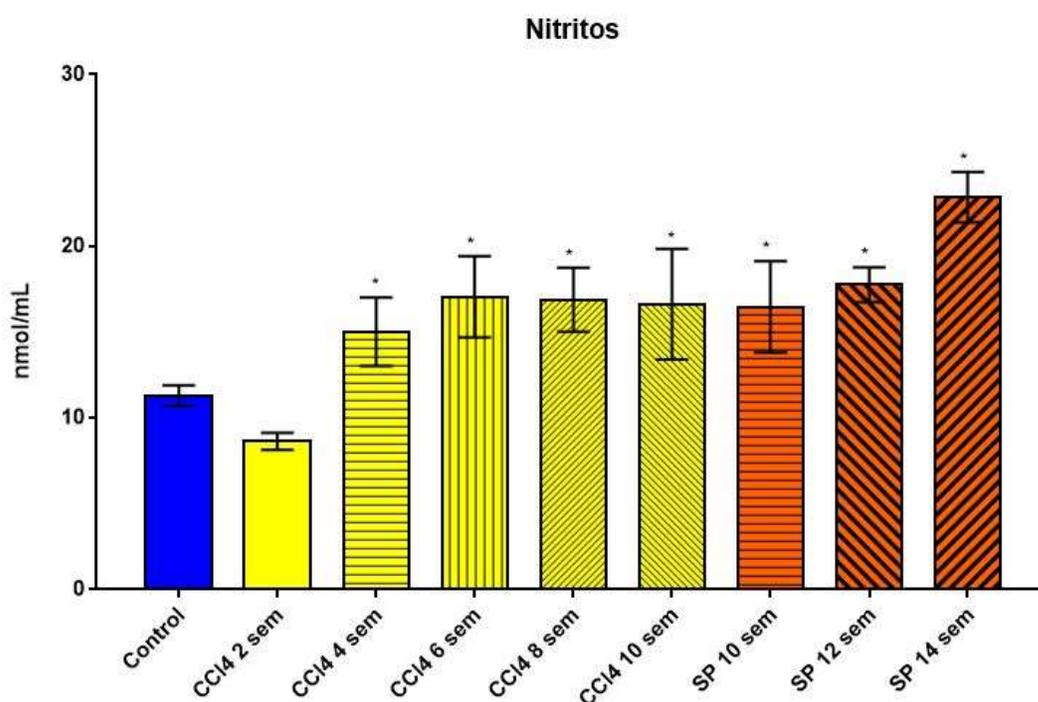


Gráfica 15. Citrulina (nM/mL). Los grupos tratados con CCl₄ en la concentración del aminoácido, con respecto del grupo control, este cambio comenzó en la sexta semana y continuó durante las semanas posteriores al comparar con el grupo control. Las ratas tratadas con SP, mantuvieron su concentración de citrulina cercana a los del grupo control. ($p < 0.05$)

Nitritos

El nitrito puede ser un marcador de enfermedad hepática cuando ocurre un incremento considerable en orina y suero, además que se ha relacionado con enfermedades autoinmunes, renales y del sistema sanguíneo (Ellis et al., 1998). En este trabajo se observaron altas concentraciones de nitritos en ratas tratadas con

CCl₄ y este incremento fue constante desde la cuarta y hasta la décima semana de tratamiento. En ratas tratadas con SP, se encontraron altas concentraciones de nitritos y un incremento de nitritos durante toda la temporalidad del tratamiento. Se compararon los últimos grupos de cada tratamiento y no se observaron diferencias significativas (gráfica 16).



Gráfica 16. **Nitritos (nmol/mL)**. A partir de la cuarta semanas de tratamiento con CCl₄ hubo cambios significativos en la concentración de nitritos y se prolongó hasta la décima semana de tratamiento. Las ratas tratadas con SP mantuvieron una alta concentración de nitritos desde la décima y continuó hasta la decimocuarta semana de tratamiento. (*p<0.05 a 0.01)

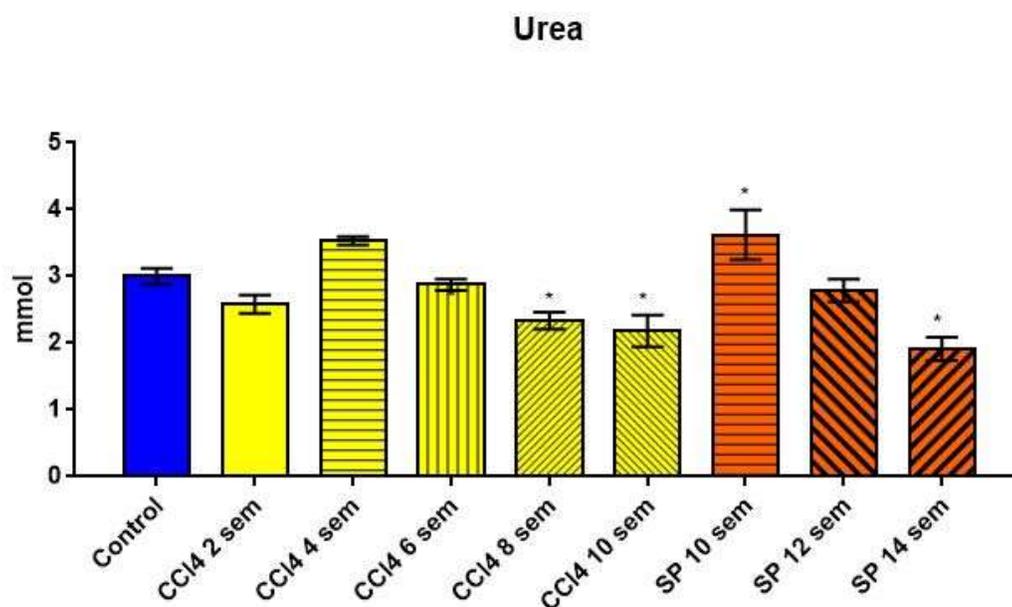
Se ha observado un incremento de la concentración de nitritos, en ratas con cirrosis inducida con CCl₄ (Ali, 2010), y este dato coincide con lo observado en este trabajo referente a las ratas tratadas con CCl₄ y SP. Por otra parte, se sabe que los nitritos son inestables, además de que pueden oxidarse y reducirse fácilmente. Existen varios mecanismos para formar óxido nítrico (*NO) a partir de nitritos y de manera contraria, tales como las vías NO sintasa, xantina oxidoreductasa y nitrito reductasa (Lundberg et al., 2008). En mamíferos se han observado altos niveles de nitritos y nitrosos, asociados a problemas enfermedades hepáticas y principalmente a cirrosis (Ergün et al., 2011; Smuckler & Benditt, 1965; Tsuji et al., 1990). En enfermedades

inflamatorias sistémicas, la concentración de nitritos y nitratos aumenta debido a la inducción masiva de iNOS (Lundberg et al., 2008).

Urea

La síntesis de urea es una función vital del hígado, y su regulación a la baja compromete la homeostasis metabólica reduciendo la capacidad de desintoxicación de amoníaco (Nielsen et al., 2007).

En este trabajo se observó que las concentraciones séricas de urea en ratas tratadas con CCl₄ fueron variables con pocos cambios aparentes durante las primeras seis semanas de tratamiento. Sin embargo, la concentración de urea disminuyó por debajo de los grupos control (*p<0.05) en la octava y décima semana. Mientras tanto, en las ratas tratadas con SP se observó un incremento de la concentración de urea en la décima semana de tratamiento, la cual disminuyó por debajo del grupo control a la decimocuarta semana de administración (gráfica 17).



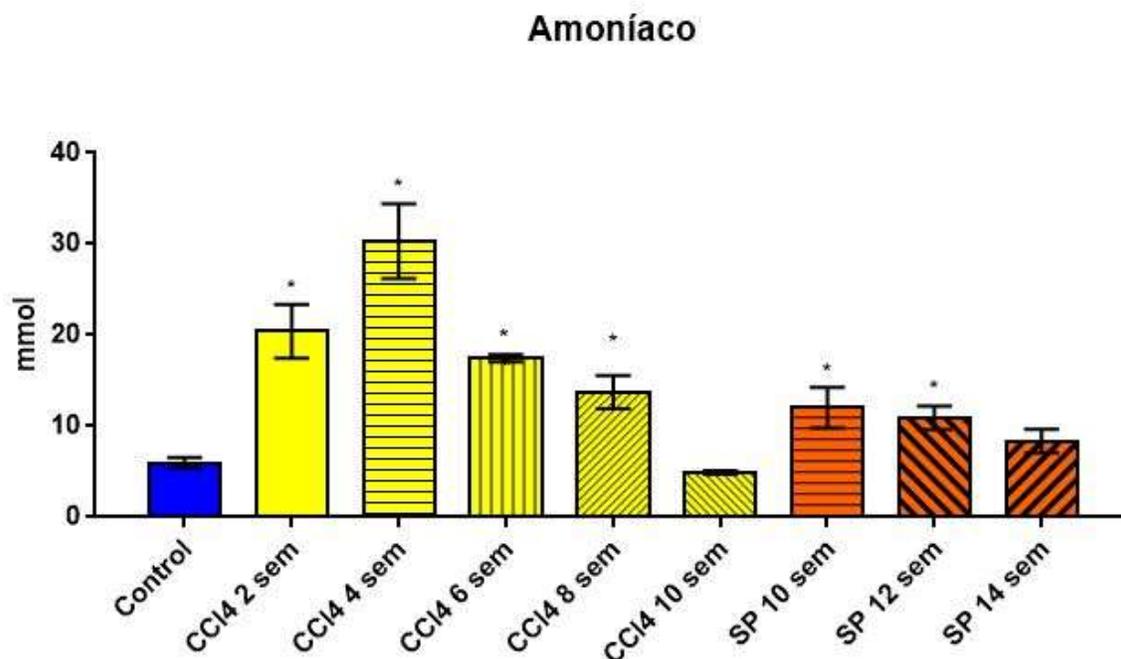
Gráfica 17. Urea (nmol/L). En la octava y décima semana de tratamiento con CCl₄ ocurrió una disminución de la concentración de urea. En los grupos tratados con SP aumentó la concentración de urea en la décima semana para posteriormente ir disminuyendo y mantenerse por debajo del grupo control en semana catorce. (*p<0.05 a 0.01)

Ali y colaboradores en 2010, observaron un incremento de la concentración de urea durante el tratamiento con CCl₄, y dicho aumento se asoció al daño renal. Sin

embargo, en un trabajo anterior se encontró que en un modelo de cirrosis inducido por CCl₄ (Uličná et al., 2003), la disminución en la síntesis de urea, y estos resultados se asemejan más a lo observado en la presente investigación. Para corroborar lo anterior, sería recomendable seguir cada uno de los pasos del ciclo de la urea y las vías relacionadas al metabolismo de nitrógeno.

Amoníaco

La concentración sérica de amoníaco permaneció elevada desde la segunda semana y hasta la octava semana de administración de CCl₄, e interesantemente a la décima semana de tratamiento los niveles de amonio fueron similares a la presentada por el grupo control (*p<0.05). Por otro lado, las ratas tratadas con SP tuvieron concentraciones altas de amoníaco con respecto al grupo control durante la décima y doceava semana de tratamiento; sin embargo, el amoníaco disminuyó a la catorceava semana (gráfica 18).



Gráfica 18. Amoníaco (nmol/L). Los grupos tratados con CCl₄, Se observó incremento de la concentración de amoníaco a partir de la segunda semana y continuó hasta la octava semana de tratamiento. En las ratas tratadas con SP a partir de la décima y doceava semana ocurrió incremento de la concentración de amoníaco para posteriormente disminuir en la semana catorce. (*p<0.05)

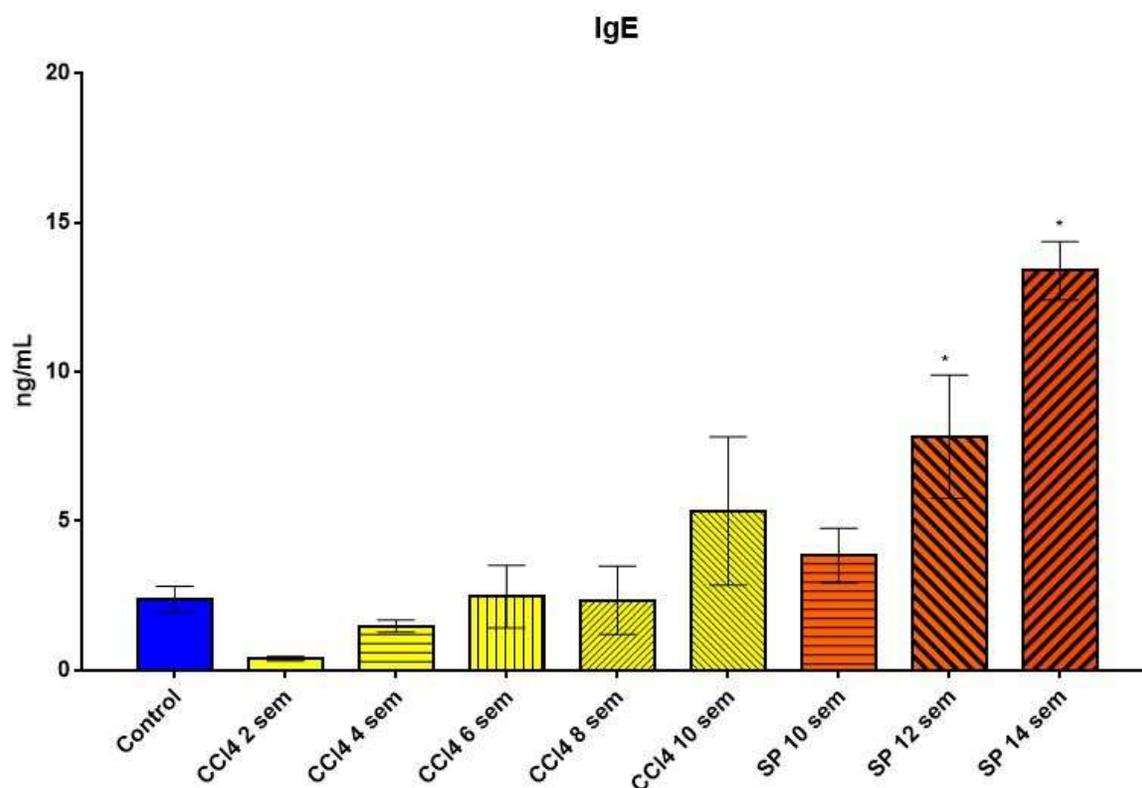
Al inicio del presente estudio, se observaron altas concentraciones de amoníaco, sin embargo, se ha descrito que el incremento de amoníaco en el estudio de la encefalopatía hepática en el modelo de cirrosis inducida por CCl₄ no suele ser un buen parámetro pues en estados crónicos de la enfermedad, no hay una disminución severa de las actividades enzimáticas del ciclo de la urea (Díaz-Gómez et al., 2011). En general, la hiperamonemia es la principal causa de disfunción hepática (cirrosis, hepatitis, intoxicación alcohólica y encefalopatía hepática) (Kosenko & Kaminsky, 2010; Takanashi et al., 2002).

Anticuerpos y citocinas

Inmunoglobulina E

Las ratas tratadas con CCl₄ no mostraron cambios significativos en los títulos de IgE, sin embargo, en la décima semana un aumento de ésta fue notorio, aunque no significativo. En cambio, en las ratas tratadas con SP se observó un incremento de los títulos de IgE desde la décima semana y continuó aumentando en la

decimocuarta semana de administración de SP. Esto podría sugerir que el SP genera una reacción de hipersensibilidad en las ratas (gráfica 19).



Gráfica 19. IgE (ng/mL). En las ratas tratadas con CCl₄, aumentaron los títulos de IgE a partir de la cuarta semana mantuvo hasta la décima semana, sin embargo, este cambio no fue significativo. Por otro lado, en las ratas tratadas con SP ocurrió incremento en la concentración de IgE en la decimosegunda y decimocuarta semana. (*p<0.05 a 01)

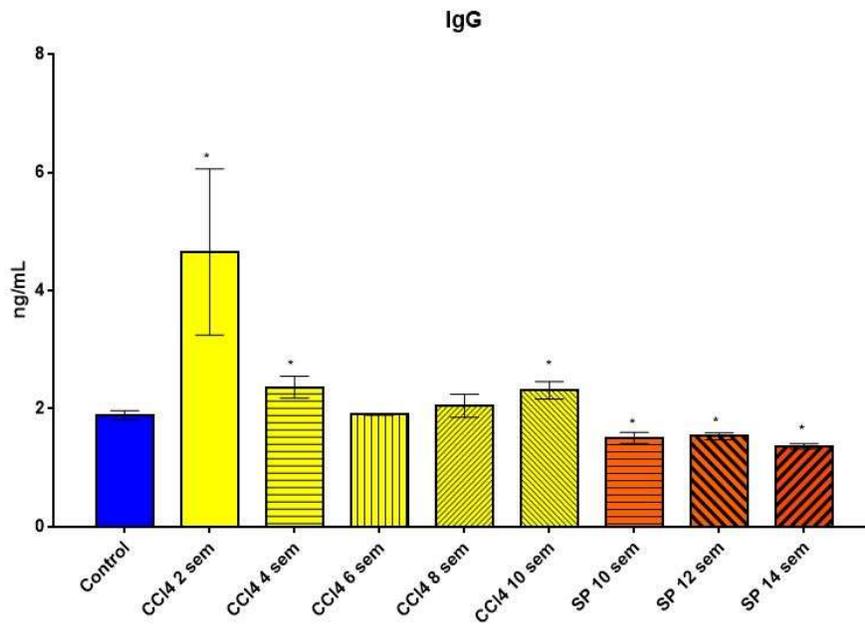
Baba y colaboradores en el 2005, encontraron títulos elevados de IgE en ratas tratadas con SP al igual que en el presente trabajo. El incremento de los títulos de IgE podría indicar la presencia y activación de basófilos y mastocitos (importantes en procesos inflamatorios), ya que estos presentan receptores FcεRI que guardan una alta afinidad con IgE, además, en otros trabajos previos se encontraron altas concentraciones de IgE y IgG en ratones BALB/c tratados con SP (Honjo & Doi, 2000). Si se considera la relación cercana entre IgE y FcεRI, se puede especular acerca de la vía que puede seguir el modelo de SP para el desarrollo de la fibrosis/cirrosis. La liberación de IgE está mediada por células Th2 en respuesta al estímulo de citocinas IL-4 y IL-10 (P. Sun et al., 2008), y la IgE se une a la región “γ” del receptor de FcεRI (FcεRIγ) presente en eosinófilos, basófilos y mastocitos,

los cuales son conocidos por ser protagonistas en reacciones de hipersensibilidad tipo I (alergia), por lo que los mastocitos pueden ser mediadores de la respuesta autoinmune (Benoist & Mathis, 2002).

Inmunoglobulina G

Durante el primer mes de tratamiento los títulos de IgG en ratas tratadas con CCl₄ se mantuvieron elevados, disminuyendo en la sexta semana y repuntando nuevamente en la octava y décima semana, siendo esto último estadísticamente significativo (* $p < 0.05$), esto se ha observado en enfermedad hepática alcohólica (Vhtala et al., 1997), recordemos que el modelo de CCl₄ conserva cierta semejanza con la cirrosis producida por el consumo de alcohol.

Por otro lado, en ratas tratadas con SP los títulos de IgG se mantuvieron por debajo de los grupos control (gráfica 20). En otros trabajos, el incremento específico de los títulos de IgG1 y IgG2a se observó en ratas tratadas con SP (Baba et al., 2005). En otros estudios relacionados con la hepatitis B, se ha observado que la IgG es detectable después la aparición de la hepatitis aguda o durante la infección crónica (Liaw & Chu, 2009; Trépo et al., 2014). La elevación selectiva de los niveles de IgG con niveles normales de IgM e IgA es un indicador de hepatitis autoinmune (HAI) (Hennes et al., 2008).



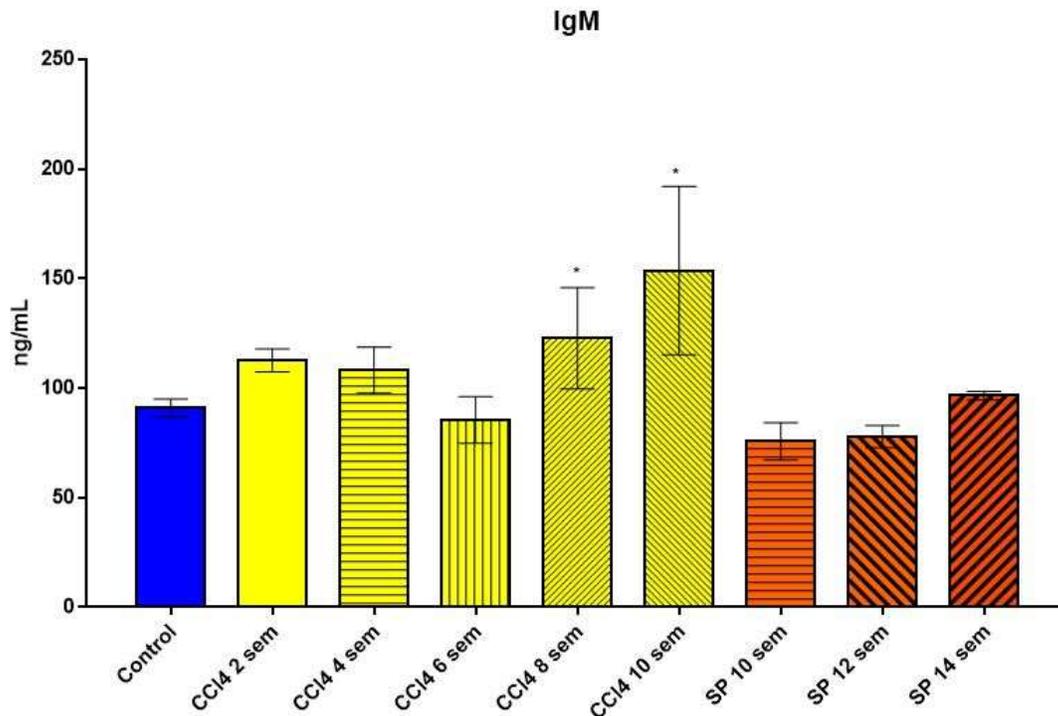
Gráfica 20. IgG (ng/mL). En las ratas tratadas con CCl₄, los títulos de IgG fueron elevados con respecto a los grupos control, con excepción de la sexta semana donde se mantuvo al mismo nivel que el grupo control. Los grupos tratados con SP mantuvieron concentraciones de IgG por debajo del grupo control. (*p<0.05)

Inmunoglobulina M

En ratas tratadas con CCl₄ y SP se cuantificaron los títulos de IgM, y en el primer grupo se observaron incrementos importantes a partir de la octava y décima semana de administración de CCl₄. Si bien, este incremento fue estadísticamente significativo en CCl₄ con respecto al grupo control. (*p<0.05); en ratas tratadas con SP los cambios fueron apenas perceptibles y no fueron estadísticamente significativos con respecto al grupo control (gráfica 21).

En infecciones por virus de hepatitis B (VHB), el incremento de IgM está relacionado con la infección aguda en hígado, sin embargo, parece disminuir cuando los niveles de ALT llegan a sus puntos máximos (Liaw & Chu, 2009; Xu et al., 2006). Por otro lado, en interpretaciones clínicas la IgM puede encontrarse elevadas durante una exacerbación de infección crónica por VHB (Trépo et al., 2014). Es importante destacar que no se observó el incremento de los títulos de IgM al inicio del tratamiento con SP en este trabajo y comenzó el incremento alrededor de la semana

catorce, a pesar de ello, no fue significativo como el presentado en un estudio previo donde a partir de la octava semana aumentaron los títulos de esta inmunoglobulina (Baba et al., 2005).



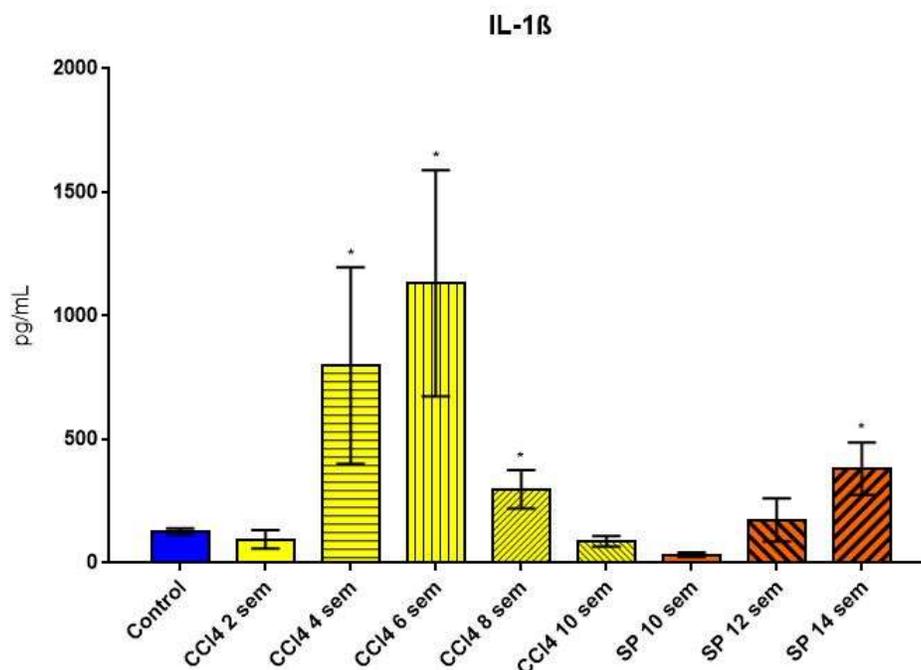
Gráfica 21. IgM (ng/mL). Se observaron incrementos en los títulos de IgM en las ratas tratadas con CCl₄ en la octava y décima semana de tratamiento. Por otro lado, en las ratas tratadas con SP no se observaron cambios en las concentraciones de IgM. (*p<0.05)

Citocinas

Interleucina 1 β (IL-1 β)

Se cuantificaron los títulos de citocinas observándose que la IL-1 β en ratas tratadas con CCl₄ tuvo un incremento interesante durante la cuarta semana y alcanzando su punto máximo a la sexta semana para posteriormente decaer a la octava y décima semana de tratamiento. Por otro lado, en ratas tratadas con SP el cambio ocurrió gradualmente y continuó en la decimocuarta semana, donde también se observó el

mayor incremento, y este cambio fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control (* $p < 0.05$) (gráfica 22).

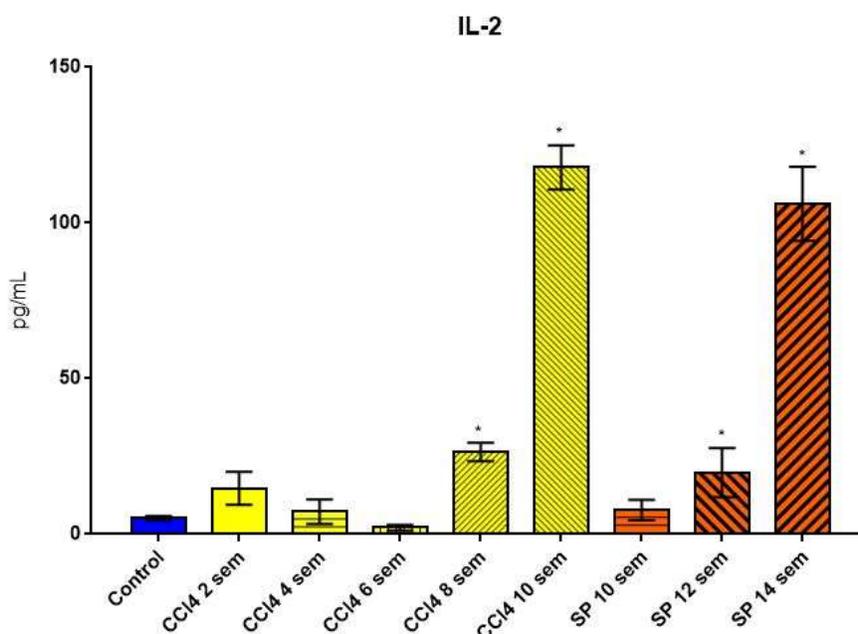


Gráfica 22. IL-1 β (pg/mL). Los grupos tratados con CCl₄ tuvieron cambios de los títulos de la citocina IL-1 β , los cuales tuvieron un incremento en la cuarta semana y disminución en la octava y décima semana con respecto al grupo control. Los grupos tratados con SP tuvieron incremento en la semana catorce. (* $p < 0.05$)

El incremento de la IL-1 β en las ratas tratadas con SP sugiere la importancia de ésta como una promotora importante de la síntesis de colágena, donde un probable mecanismo sea mediante el efecto estimulante que esta tiene sobre los miofibroblastos junto con TNF α (Okuno et al., 2002; Tiggelman et al., 1995). Esta misma combinación de citocinas parece estar relacionada con la expresión de IL-6. Por otro lado, se ha mencionado que en la hepatitis autoinmune se caracteriza por la presencia de títulos elevados de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF α), las cuales llevan a los hepatocitos a la apoptosis (Verweij et al., 2001). La IL-1 β proviene de células de Kupffer activadas, y su liberación provoca la secreción de otras citocinas mediadoras, que tendrán como resultado la inflamación crónica, fibrosis y finalmente la cirrosis (Perez-Cabeza de Vaca, 2012).

Interleucina 2 (IL-2)

Se cuantificó la IL-2, observándose un incremento durante el primer mes de tratamiento con CCl₄, sin embargo, ésta fue decayendo en la sexta semana para posteriormente volver a incrementar en la octava y décima semana donde alcanzó su concentración máxima con respecto al control (*p<0.05). Por otra parte, en ratas tratadas con SP el incremento de las concentraciones de IL-2 estuvo por encima del grupo control durante la decimosegunda y decimocuarta semana (*p<0.05) (gráfica



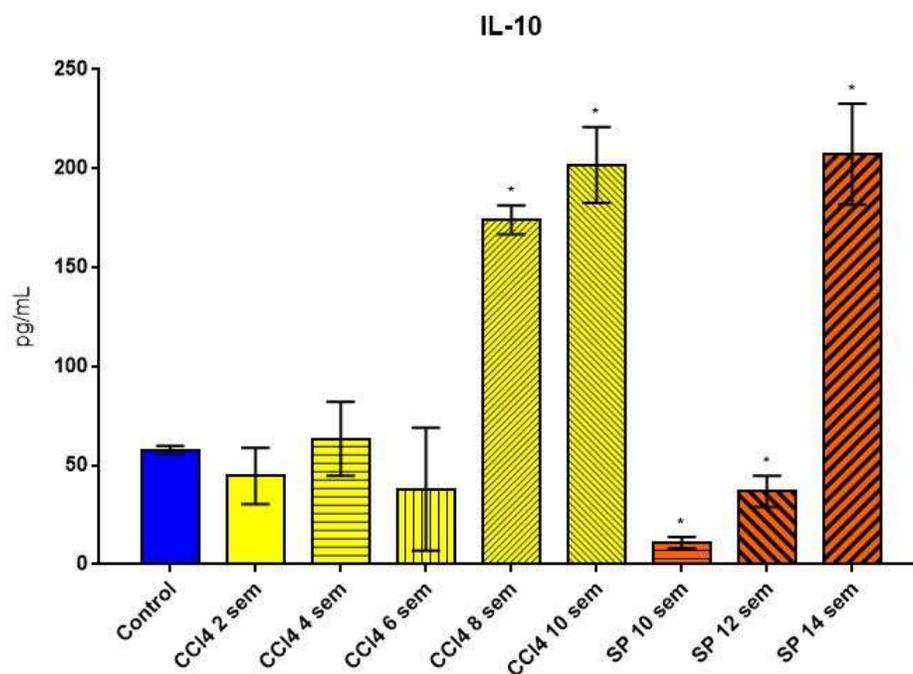
Gráfica 23. IL-2 (pg/mL). Los grupos tratados con CCl₄ tuvieron un incremento considerable en la octava y décima semana con respecto. Los grupos tratados con SP tuvieron incremento en las concentraciones de IL-2 en la semana doce y catorce de tratamiento. (*p<0.05)

23).

En este trabajo se observaron incrementos importantes en los títulos de IL-2 en ambos modelos, lo cual comúnmente está relacionado con el proceso inflamatorio. Sin embargo, la mayor deficiencia de IL-2 en ratones y humanos está asociada con el desarrollo de autoinmunidad e inmunodeficiencias (Lan et al., 2008). Por otro lado, dependiendo del estímulo provocado por IL-2, este favorecerá la respuesta Treg: Th1(macrófagos) y Th2 (eosinófilos, basófilos y células cebadas) (Murphy & Weaver, 2017).

Interleucina 10 (IL-10)

Durante el tratamiento de ratas con CCl₄ se cuantificaron los títulos de IL-10, observándose cambios notables en la octava y décima semana. Por su parte, en las ratas a las que se les administró el SP, arrojaron datos interesantes a las décima y decimosegunda semanas de tratamiento observándose decaimientos en las concentraciones de IL-10 por debajo de las concentraciones del grupo control. Esto cambio en la decimocuarta semana donde el incremento fue significativo (*p<0.05 a 0.01) (gráfica 24).



Gráfica 24. IL-10 (pg/mL). Los grupos tratados con CCl₄ tuvieron incremento en los títulos de IL-10 en la octava y décima semana con respecto del grupo control. Los grupos tratados con SP mantuvieron concentraciones de IL-10 por debajo del grupo control. Sin embargo, en la decimocuarta semana de tratamiento incremento la concentración de IL-10. (*p<0.05)

Por un lado, parte de este incremento en los títulos de IL-10 junto con la arginasa (arginasa-1) son críticos para la resolución a una respuesta fibrótica (Duffield et al., 2013). Sin embargo, se ha reportado que como consecuencia de la inducción de cirrosis con CCl₄, se favorece la producción de IL-10 por diferentes tipos celulares, que a su vez, esta se encamina hacia una respuesta Th2, la cual está asociada a la presencia de macrófagos (M2c) los cuales tienen comportamiento profibrogénico,

aunque son considerados antiinflamatorios (Perez-Cabeza de Vaca, 2012). Por su parte, Osuna-Martínez en el 2012 observó el incremento de IL-10 en un modelo de fibrosis inducida por SP, lo cual también podría sugerir que se favorece una respuesta Th2.

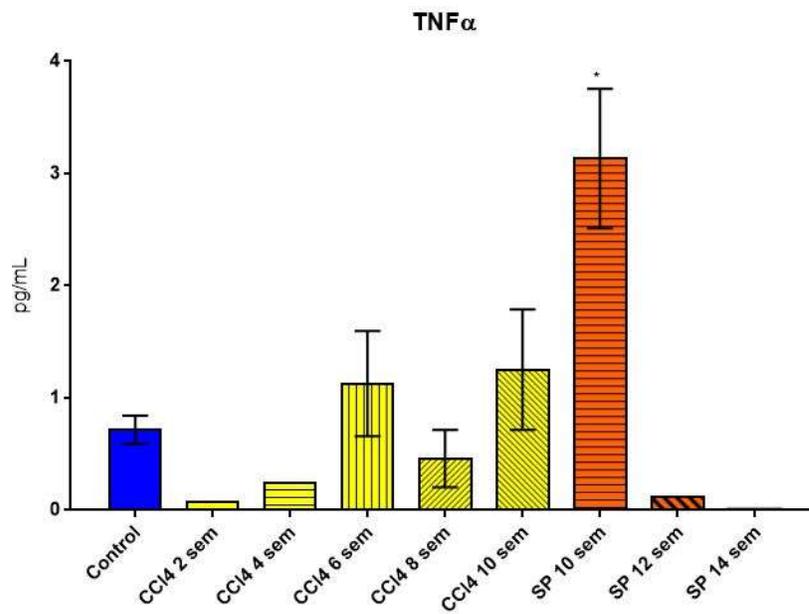
Es importante mencionar que la producción de la IL-10 no está limitada a un tipo celular, ya que se ha observado que células de Kupffer (H. J. Li et al., 2015) las células sinusoidales endoteliales también la producen (Albillos et al., 2014), así como CEH (Winau et al., 2008). Por otro lado, al parecer la IL-10 parece contrarrestar la acción de TNF α (Weber et al., 2003).

Factor de Necrosis Tumoral (TNF α)

En ratas tratadas con CCl₄, no se observaron cambios significativos a pesar de que en algunas semanas de la temporalidad la concentración de TNF α estuvo por encima de la concentración del grupo control. En las ratas tratadas con SP se observaron altas concentraciones en la décima semana; sin embargo, estas altas concentraciones fueron decayendo a incluso casi desaparecer o estar por debajo del grupo control (gráfica 25).

Finalmente podemos considerar que en los modelos de SP y CCl₄ se presenta incremento de citocinas muy similares entre ambos modelos. Sin embargo, las principales diferencias localizadas se ubican en el modelo de SP y la producción de TNF α , el incremento de esta citocina se ve disminuido al incrementar los títulos de IL-10 (H. J. Li et al., 2015). El TNF α puede tener efectos de protectores o dañinos durante la hepatotoxicidad inducida por CCl₄ (Weber et al., 2003).

Las citocinas proinflamatorias como TNF α , pueden contribuir a la apoptosis y la activación de CEH (E. Seki & Schwabe, 2015), pero es importante mencionar que su presencia junto con IL-1 β no significa el favorecimiento hacia la respuesta Th1. De hecho, TNF α ha sido observado en fibrosis causada por infección vírica, inducida por alcohol y cirrosis biliar primaria (Bataller & Brenner, 2005).



Gráfica 26. TNFα (pg/mL). Los grupos tratados con CCl₄ no tuvieron cambios significativos en las concentraciones de TNFα con respecto del grupo control. Los grupos de ratas tratadas con SP tuvieron incremento en las concentraciones de TNFα en la décima semana de tratamiento. (*p<0.05)

Histología

Se observaron las fibras de colágena, citoplasma y núcleo se mediante la tinción tricrómica de Masson (TCM). También los cortes histológicos de hígado se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE) con el propósito de localizar DNA/RNA (ácidos-hematoxilina) y estructuras básicas (Eosina), de forma complementaria esta tinción se usó para observar células inflamatorias (no se muestran).

En los tejidos de ratas de los grupos control de los diferentes tiempos no se observaron daños, ni la presencia de fibras de colágena (figura 5). En los hígados de ratas de los grupos tratados con CCl₄ y SP; particularmente en el modelo de CCl₄ fue posible observar los hepatocitos de manera irregular, rodeados de fibras de colágena a partir de la segunda semana de tratamiento, en la octava y décima semana los septos formados por las fibras de colágena fueron más grandes, en este punto las fibras de colágena conectaban la vena central y vena porta; vena central y vena central, vena porta y vena porta (región periférica), a partir de la décima semana se puede considerar cirrosis, debido al formación de pequeñas vesículas de grasa, las cuales son indicadoras de esteatosis; la congestión moderada de las sinusoides, grandes cantidades de fibras de colágena y los cambios bioquímicos e inmunológicos presentes. El modelo de CCl₄ se caracteriza por la aparición de depósitos de colágena alrededor de la triada portal, así como nódulos de hepatocitos rodeados de bandas de colágena de tamaño variable (Muriel et al., 2005), formación de septos y pseudo-lóbulos en las etapas más avanzadas de tratamiento (Wang et al., 2012).

Por su parte, los grupos correspondientes a los tratamientos con SP, también presentaron fibras finas de colágena que delimitan lóbulo hepático; es decir, se observaron fibras de colágena de vena porta-vena porta. Esto se ha observado en otros trabajos (Osuna-Martínez et al., 2011), además que no hubo la presencia de necrosis y la vena central se encuentra rodeada de fibras de colágena (Liu et al., 2009; Sakaida et al., 1998). En la decimocuarta semana de tratamiento se observaron la formación de pseudo-lóbulos.

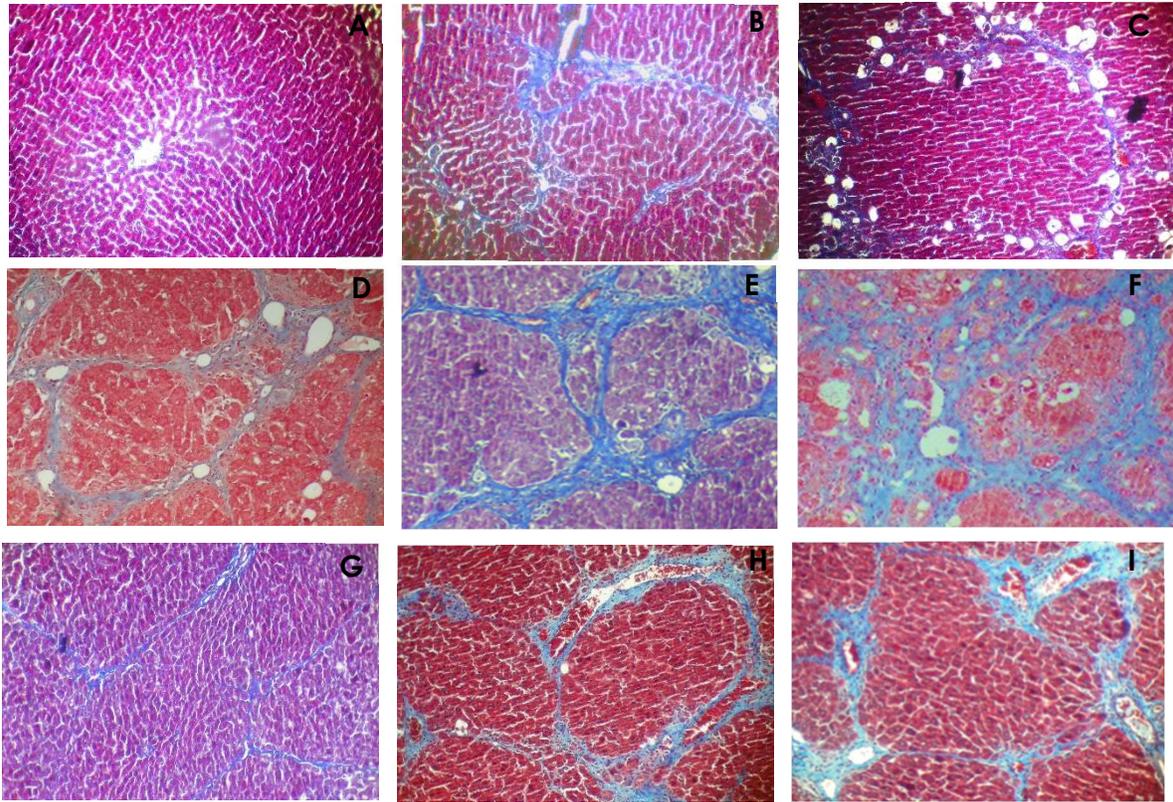


Figura 5. Cortes histológicos de hígado 40x (TCM). Los cortes histológicos de hígado corresponden a los grupos Control (A), CCl₄ 2sem (B), CCl₄ 4sem (C), CCl₄ 6sem (D), CCl₄ 8sem (E) y CCl₄ 10 sem (F) y SP 10sem (G), SP 12sem (H) y SP 14 sem (I). El tejido conjuntivo fue teñido de color rojo (estructuras oxidadas y citoplasma), las fibras de colágena se tiñeron de color azul y en color marrón/lila el núcleo.

A manera de síntesis, la siguiente tabla muestra los cambios observados en los tratamientos de CCl₄ y SP. En dichos resultados destacan únicamente los cambios estadísticamente significativos (Tabla 2).

Los cambios encontrados en este trabajo en los organismos tratados con CCl₄ sugieren que el principal mecanismo por el cual se produce el daño en el hígado es a través de la formación de radicales libres, pues estos, pueden reaccionar con proteínas y fosfolípidos de membrana generando la muerte celular y liberando componentes metabólicos como las relacionadas con el ciclo de la urea.

La presencia de septos entre la zonas portal y ventral en el hígado en conjunto con la cuantificación de la hidroxiprolina muestran que el daño hepático es severo alrededor de las ocho y diez semanas de tratamiento con CCl₄ (Wang et al., 2012).

Por otro lado, se debe dilucidar el mecanismo por el cual las moléculas proinflamatorias influyen en la progresión de la cirrosis ya que no está completamente descrito (Marques et al., 2012).

En el modelo de SP, el mecanismo principal parece estar relacionado con procesos inflamatorios, pues algunos autores sugieren la formación de complejos inmunológicos después del tratamiento con sueros xenogénicos (Hasegawa-Baba & Doi, 2011; Paronetto & Popper, 1966), estos complejos podrían provocar la secreción de moléculas proinflamatorias a partir del primer contacto con las células de Kupffer que a su vez generan la activación de las células estrelladas hepáticas implicadas en la progresión de la fibrosis.

Es importante destacar que la formación de septos es a partir de las venas centrales a diferencia de lo observado en el modelo de CCl₄, de igual manera, fue escasa la presencia células necróticas en el modelo de SP (no se muestra), lo anterior refuerza que el estímulo para la formación de las fibras de colágena se debe a una respuesta inmunitaria. La presencia de IL10 en ambos tratamientos puede deberse a la capacidad para modular la progresión de la fibrosis (Zhou et al., 2014), sin embargo, el mecanismo para promover la secreción de ésta citocina debe tener diferentes vías de activación aún no descritas.

Finalmente, el incremento de los títulos de IgG y IgM están relacionados con la progresión de la cirrosis en el modelo de SP (Baba et al., 2005). Por lo tanto, se puede sugerir que el incremento de los títulos de IgG puede usarse como marcador de cirrosis (Laschtowitz et al., 2021).

Tabla 2. Análisis Bioquímico e Inmunológico

	CCl ₄					SP			
	sem 2	sem 4	sem 6	sem 8	sem 10	sem 10	sem 12	sem 14	
Peso hígado									
Peso bazo									
Hidroxiprolina	5.34 ± 0.27	5.45 ± 0.55	4.99 ± 0.63	6.59 ± 0.73	9.17 ± 0.80	1.47 ± 0.18	1.67 ± 0.20	2.36 ± 0.23	
TGO	60.43 ± 2.72	51.95 ± 2.33	56.25 ± 5.43	18.21 ± 2.11	190.3 ± 9.72				
TGP	99.21 ± 4.46	51.06 ± 2.86	50.59 ± 2.59	52.98 ± 2.86	46.36 ± 3.86	24.05 ± 1.7	27.38 ± 2.19	21.57 ± 2.20	
Albumina									
Bilirrubina						8.02 ± 0.94		4.20 ± 0.16	
LDH	1.69 ± 0.20					0.61 ± 0.15	0.43 ± 0.13	0.47 ± 0.16	
Triglicéridos		69.22 ± 6.42	84.38 ± 6.30	94.20 ± 6.79					
Arginasa (en plasma)	59.38 ± 3.62	29.53 ± 3.56	63.47 ± 6.18	54.10 ± 3.38	26.51 ± 3.54	28.14 ± 4.72	38.02 ± 5.95	60.18 ± 4.04	
Arginasa (en homogenado)		1.37 ± 0.12	0.70 ± 0.09						
Arginina		12.16 ± 0.56	12.05 ± 0.48	14.73 ± 0.45	17.05 ± 1.08				
Ornitina	17.93 ± 0.65	19.33 ± 0.80	17.03 ± 0.79	17.9 ± 0.56	1.87 ± 0.18	16.20 ± 0.69			
OTC (en plasma)				4.00 ± 2.37	5.83 ± 2.63				
OTC (en homogenado)				13.6 ± 0.84					
Citrulina				515.8 ± 19.13	453.0 ± 33.65				
Nitritos		15.02 ± 1.57	17.05 ± 1.65	16.88 ± 1.67	16.63 ± 1.89	16.47 ± 1.73	17.76 ± 1.17	22.85 ± 1.62	
Urea				2.34 ± 0.23	2.18 ± 0.33	3.62 ± 0.30		1.91 ± 0.29	
Amoniaco	1.87 ± 0.18	1.87 ± 0.18	1.87 ± 0.18	1.87 ± 0.18		1.87 ± 0.18	1.87 ± 0.18		
IgE							7.82 ± 1.52	13.39 ± 1.12	
IgM					122.6 ± 13.25	153.6 ± 16.71			
IgG	4.65 ± 0.53	2.36 ± 0.21			2.31 ± 0.20	1.50 ± 0.12	1.53 ± 0.11	1.36 ± 0.20	
IL-1β		798.4 ± 177.7	1131 ± 234.3	298.1 ± 44.58				381.6 ± 69.36	
IL-2				26.46 ± 2.12	117.8 ± 3.06	19.78 ± 4.10	106.1 ± 7.15		
IL-10				17.40 ± 5.64	201.7 ± 8.06	10.89 ± 3.51	36.85 ± 7.12	207.1 ± 14.91	
TNF-α						3.13 ± 0.39			

Tabla 2. Resultados expresados en media ± error estándar. Cinco ratas por grupo CCl₄ cada dos semanas y cuatro individuos cada dos semanas para el grupo control. Nueve ratas cada dos semanas por grupo SP y cuatro animales cada dos semanas para el grupo control. Únicamente se muestran los datos estadísticamente significativos.

CONCLUSIONES

Los organismos tratados con CCl₄ tienen una pérdida de la homeostasis hepática desde comienzo del tratamiento a diferencia del modelo de SP donde ocurren algunos cambios a nivel bioquímico y posteriormente se regulan nuevamente.

El daño generado por el CCl₄, produce un incremento en las concentraciones de la colágena generando cambios morfo-fisiológicos en la estructura del hígado, presencia de vacuolas lipídicas y células necróticas. En el modelo de SP a nivel morfológico se observaron conexiones entre las venas porta-porta lo cual podría ser crucial en la comprensión de este modelo.

A nivel inmunológico, las mediciones indican que el mecanismo por el cual el tratamiento con SP provoca el daño hepático puede estar mediado por células del sistema inmune (células de Kupffer), citocinas e inmunoglobulinas las cuales actúan de manera sinérgica con células hepáticas provocando cambios fisiológicos. Por su parte, en el tratamiento con CCl₄ los cambios pueden estar relacionados con cambios bioquímicos producidos por la formación de radicales libres y no con una respuesta inmunológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel Aziz, M. T., Atta, H. M., Mahfouz, S., Fouad, H. H., Roshdy, N. K., Ahmed, H. H., Rashed, L. A., Sabry, D., Hassouna, A. A., & Hasan, N. M. (2007). Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clinical Biochemistry*.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.04.017>
- Al-Ghamdi, M. S. (2003). Protective Effect of Nigella sativa Seeds Against Carbon Tetrachloride-induced Liver Damage. *American Journal of Chinese Medicine*.
<https://doi.org/10.1142/S0192415X03001399>
- Albillos, A., Lario, M., & Álvarez-Mon, M. (2014). Cirrhosis-associated immune dysfunction: Distinctive features and clinical relevance. In *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.08.010>
- Ali, S. A. (2010). Protective role of Juniperus phoenicea and Cupressus sempervirens against CCl₄. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v1.i6.123>
- Ali, S. A., Faddah, L., Abdel-Baky, A., & Bayoumi, A. (2010). Protective effect of l-carnitine and coenzyme Q10 on CCL₄-induced liver injury in rats. *Scientia Pharmaceutica*. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1006-02>
- Baba, Y., Saeki, K., Onodera, T., & Doi, K. (2005). Serological and immunohistochemical studies on porcine-serum-induced hepatic fibrosis in rats. *Experimental and Molecular Pathology*.
<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2005.08.007>
- Baba, Y., Uetsuka, K., Nakayama, H., & Doi, K. (2004). Rat strain differences in the early stage of porcine-serum-induced hepatic fibrosis. *Experimental and Toxicologic Pathology*. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00336>
- Badger, D. A., Sauer, J. M., Hoglen, N. C., Jolley, C. S., & Sipes, I. G. (1996). The role of inflammatory cells and cytochrome P450 in the potentiation of CCl₄-

induced liver injury by a single dose of retinol. *Toxicology and Applied Pharmacology*. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0316>

Bahri, S., Zerrouk, N., Aussel, C., Moinard, C., Crenn, P., Curis, E., Chaumeil, J. C., Cynober, L., & Sfar, S. (2013). Citrulline: From metabolism to therapeutic use. In *Nutrition*. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.07.002>

Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. In *Nature*. <https://doi.org/10.1038/32588>

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

Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., Bao, X. R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R. L., Kotliansky, V., & Mootha, V. K. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, *476*(7360), 341–345. <https://doi.org/10.1038/nature10234>

Benoist, C., & Mathis, D. (2002). Mast cells in autoimmune disease. In *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature01324>

Bergmeyer, H.-U., & Bernt, E. (1965). *Methods of Enzymathic Analysis* (Elsevier (ed.)).

Bergmeyer, H., & Beutler, H. (1984). Ammonia. In H. Bergmeyer, J. Bergmeyer, & M. Grassl (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis* (vol. 7, pp. 454–461). Verlag Chemie.

Bergmeyer, H. U., & Bernt, E. (1974). UV-Assay with Pyruvate and NADH. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Second Edi). Verlag Chemie GmbH. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-091302-2.50010-4>

Bickel, M., Barinchaus, K. H., Gerl, M., Günzler, V., Kanta, J., Schmidts, L., Stapf, M., Tschank, G., Weidmann, K., & Werner, U. (1998). Selective inhibition of hepatic collagen accumulation in experimental liver fibrosis in rats by a new prolyl 4-hydroxylase inhibitor. *Hepatology*.

<https://doi.org/10.1002/hep.510280217>

- Bishayi, B., Roychowdhury, S., Ghosh, S., & Sengupta, M. (2002). Hepatoprotective and immunomodulatory properties of *Tinospora cordifolia* in CCl₄ intoxicated mature albino rats. *Journal of Toxicological Sciences*, 27(3), 139–146. <https://doi.org/10.2131/jts.27.139>
- Björnsson, Ó. G., Bourgeois, C. S., & Gibbons, G. F. (1998). Varying very low-density lipoprotein secretion of rat hepatocytes by altering cellular levels of calcium and the activity of protein kinase C. *European Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.1998.00354.x>
- Boll, M., Weber, L. W. D., Becker, E., & Stampfl, A. (2001). Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. <https://doi.org/10.1515/znc-2001-7-826>
- Boyle, J. (2005). Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. <https://doi.org/10.1002/bmb.2005.494033010419>
- Bruck, R., Genina, O., Aeed, H., Alexiev, R., Nagler, A., Avni, Y., & Pines, M. (2001). Halofuginone to prevent and treat thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Hepatology*, 33(2), 379–386. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.21408>
- Celton-Morizur, S., & Desdouets, C. (2010). Polyploidization of liver cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6199-0_8
- Cerioti, G. (1983). Ornithine carbamoyl transferase. In H. Bergmeyer, J. Bergmeyer, & M. Grassl (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*. (pp. 319–332.). Verlag Chemie.
- Chagoya de Sánchez, V., Martínez-Pérez, L., Hernández-Muñoz, R., & Velasco-Loyden, G. (2012). Recovery of the Cell Cycle Inhibition in CCl₄ - Induced Cirrhosis by the Adenosine Derivative IFC-305. *International Journal*

of *Hepatology*. <https://doi.org/10.1155/2012/212530>

- Crispe, I. N. (2003). Hepatic T cells and liver tolerance. In *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri981>
- D'Amico, G., Garcia-Tsao, G., & Pagliaro, L. (2006). Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. In *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.10.013>
- Da Silva, C. M. L., Spinelli, E., & Rodrigues, S. V. (2015). Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay. *Food Chemistry*, 173, 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.073>
- Díaz-Gómez, D., Jover, M., del-Campo, J. A., Galindo, A., & Romero-Gómez, M. (2011). Experimental models for hepatic encephalopathy. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082011001000006>
- Duffield, J. S., Luper, M., Thannickal, V. J., & Wynn, T. A. (2013). Host responses in tissue repair and fibrosis. In *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-163930>
- Ellis, G., Adatia, I., Yazdanpanah, M., & Makela, S. K. (1998). Nitrite and nitrate analyses: A clinical biochemistry perspective. *Clinical Biochemistry*, 31(4), 195–220. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(98\)00015-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(98)00015-0)
- Ergün, Y., Kurutaş, E. B., Özdil, B., Güneşçar, R., & Ergün, Y. (2011). Evaluation of nitrite/nitrate levels in relation to oxidative stress parameters in liver cirrhosis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2010.12.009>
- Fausto, N., Campbell, J. S., & Riehle, K. J. (2006). Liver regeneration. In *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.20969>
- Forni, L. G., Packer, J. E., Slater, T. F., & Willson, R. L. (1983). Reaction of the trichloromethyl and halothane-derived peroxy radicals with unsaturated fatty acids: A pulse radiolysis study. *Chemico-Biological Interactions*. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(83\)90066-2](https://doi.org/10.1016/0009-2797(83)90066-2)

- Fortea, J. I., Fernández-Mena, C., Puerto, M., Ripoll, C., Almagro, J., Bañares, J., Bellón, J. M., Bañares, R., & Vaquero, J. (2018). Comparison of Two Protocols of Carbon Tetrachloride-Induced Cirrhosis in Rats - Improving Yield and Reproducibility. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27427-9>
- Fowler, J. S. (1969). Carbon tetrachloride metabolism in the rabbit. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1969.tb08512.x>
- Friedman, S. L. (2005). Mac the knife? Macrophages - The double-edged sword of hepatic fibrosis. In *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI200523928>
- Fujimoto, J., & Kaneda, Y. (1999). Reversing liver cirrhosis: impact of gene therapy for liver cirrhosis. *Gene Therapy*, 6(3), 305–306.
- Fujiwara, K., Ogata, I., Ohta, Y., Hayashi, S., Mishiro, S., Takatsuki, K., Sato, Y., Yamada, S., Hirata, K., Oka, H., Oda, T., Kawaji, H., Matsuda, S., Niiyama, Y., & Tsukuda, R. (1988). Decreased collagen accumulation by a prolyl hydroxylase inhibitor in pig serum-induced fibrotic rat liver. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.1840080418>
- Gabr, S. A., Alghadir, A. H., Sherif, Y. E., & Ghfar, A. A. (2016). Hydroxyproline as a Biomarker in Liver Disease. *Exposure and Health*, 2016(December). https://doi.org/10.1007/978-94-007-7742-2_26-1
- Gäde, G. (1983). Arginine and arginine phosphate. In H. Bergmeyer, J. Bergmeyer, & M. Grassl (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*. (pp. 425–431). Verlag Chemie.
- Gorham, J. D. (2007). Adaptive immunity in the liver. In *Liver Immunology: Principles and Practice*. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-518-3_6
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126(1), 131–138.

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)

Haouzi, D., Lekéhal, M., Moreau, A., Moulis, C., Feldmann, G., Robin, M. A., Lettéron, P., Fau, D., & Pessayre, D. (2000). Cytochrome P450-generated reactive metabolites cause mitochondrial permeability transition, caspase activation, and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*.

<https://doi.org/10.1053/jhep.2000.9034>

Hasegawa-Baba, Y., & Doi, K. (2011). Changes in TIMP-1 and -2 expression in the early stage of porcine serum-induced liver fibrosis in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.02.011>

Hennes, E. M., Zeniya, M., Czaja, A. J., Parés, A., Dalekos, G. N., Krawitt, E. L., Bittencourt, P. L., Porta, G., Boberg, K. M., Hofer, H., Bianchi, F. B., Shibata, M., Schramm, C., De Torres, B. E., Galle, P. R., McFarlane, I., Dienes, H. P., & Lohse, A. W. (2008). Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.22322>

Hernández-Muñoz, R., Díaz-Muñoz, M., López, V., López-Barrera, F., Yáñez, L., Vidrio, S., Aranda-Fraustro, A., & Chagoya De Sánchez, V. (1997). Balance between oxidative damage and proliferative potential in an experimental rat model of CCl₄-induced cirrhosis: Protective role of adenosine administration. *Hepatology*, 26(5), 1100–1110. <https://doi.org/10.1002/hep.510260503>

Hernández-Muñoz, R., Díaz-Muñoz, M., Suárez-Cuenca, J. A., Trejo-Solís, C., López, V., Sánchez-Sevilla, L., Yáñez, L., & De Sánchez, V. C. (2001). Adenosine reverses a preestablished CCL₄-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.27949>

Hernández-Muñoz, R., Sánchez-Sevilla, L., Martínez-Gómez, A., & Dent, M. A. R. (2003). Changes in mitochondrial adenine nucleotides and in permeability transition in two models of rat liver regeneration. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50145>

Honjo, K., & Doi, K. (2000). Foreign serum-induced bile duct lesion (BDL) in

athymic BALB/c nude mice. *Histology and Histopathology*.

- Huang, Y. H., Chen, Y. X., Zhang, L. J., Chen, Z. X., & Wang, X. Z. (2014). Hydrodynamics-based transfection of rat interleukin-10 gene attenuates porcine serum-induced liver fibrosis in rats by inhibiting the activation of hepatic stellate cells. *International Journal of Molecular Medicine*.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1831>
- Iredale, J. P., Benyon, R. C., Pickering, J., McCullen, M., Northrop, M., Pawley, S., Hovell, C., & Arthur, M. J. P. (1998). Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis: Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *Journal of Clinical Investigation*.
<https://doi.org/10.1172/JCI1018>
- Issa, R., Zhou, X., Trim, N., Millward-Sadler, H., Krane, S., Benyon, C., & Iredale, J. (2003). Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl₄-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0494fje>
- Jeong, D. H., Lee, G. P., Jeong, W. Il, Do, S. H., Yang, H. J., Yuan, D. W., Park, H. Y., Kim, K. J., & Jeong, K. S. (2005). Alterations of mast cells and TGF- β 1 on the silymarin treatment for CCl₄-induced hepatic fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i8.1141>
- Kayali, Z., Herring, J., Baron, P., Franco, E., Ojogho, O., Smith, J., Watkins, G., Smith, D., Lamin, V., Hoang, T., Sharma, R., Mathahs, M., Sowers, L., Brown, K. E., & Schmidt, W. N. (2009). Increased plasma nitric oxide, L-arginine, and arginase-1 in cirrhotic patients with progressive renal dysfunction. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05757.x>
- Kerscher, L., & Ziegenhorn, J. (1983). Urea. In H. Bergmeyer, J. Bergmeyer, & M.

- Grassl (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*. (pp. 444–453). Verlag Chemie.
- Kosenko, E. A., & Kaminsky, Y. G. (2010). Activation of amp deaminase and adenosine deaminase in the liver during ammonia poisoning and hepatitis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s10517-010-1061-6>
- Lan, R. Y., Selmi, C., & Gershwin, M. E. (2008). The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2). In *Journal of Autoimmunity*. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2008.03.002>
- Laschtowitz, A., Zachou, K., Lygoura, V., Pape, S., Derben, F., Jaeckel, E., Oller-Moreno, S., Weidemann, S., Krech, T., Piecha, F., Schön, G., Liebhoff, A. M., Al Tarrach, M., Heneghan, M., Drenth, J. P. H., Dalekos, G., Taubert, R., Lohse, A. W., & Schramm, C. (2021). Histological activity despite normal ALT and IgG serum levels in patients with autoimmune hepatitis and cirrhosis. *JHEP Reports*, 3(4). <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100321>
- Li, H. J., Zhai, N. C., Song, H. X., Yang, Y., Cui, A., Li, T. Y., & Tu, Z. K. (2015). The role of immune cells in chronic hbv infection. In *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2015.00026>
- Li, Y., Wang, R., Xiong, S., Wang, X., Zhao, Z., Bai, S., Wang, Y., Zhao, Y., & Cheng, B. (2019). Cancer-associated fibroblasts promote the stemness of CD24 + liver cells via paracrine signaling. *Journal of Molecular Medicine*, 97(2), 243–255. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1731-9>
- Liaw, Y. F., & Chu, C. M. (2009). Hepatitis B virus infection. In *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60207-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60207-5)
- Lieber, C. S. (2004). Alcoholic fatty liver: Its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.07.008>
- Liu, H., Wei, W., Sun, W. yi, & Li, X. (2009). Protective effects of astragaloside IV on porcine-serum-induced hepatic fibrosis in rats and in vitro effects on

- hepatic stellate cells. *Journal of Ethnopharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.01.035>
- Long, R. M., & Moore, L. (1986). Elevated cytosolic calcium in rat hepatocytes exposed to carbon tetrachloride. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.
- Lu, B., Yin, L., Xu, L., & Peng, J. (2011). Application of proteomic and bioinformatic techniques for studying the hepatoprotective effect of dioscin against CCl₄-induced liver damage in mice. *Planta Medica*. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250461>
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., & Gladwin, M. T. (2008). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. In *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd2466>
- Marques, T. G., Chaib, E., da Fonseca, J. H., Lourenço, A. C. R., Silva, F. D., Ribeiro, M. A. F., Galvão, F. H. F., & D'Albuquerque, L. A. C. (2012). Review of experimental models for inducing hepatic cirrhosis by bile duct ligation and carbon tetrachloride injection. *Acta Cirurgica Brasileira*, 27(8), 589–594.
<https://doi.org/10.1590/S0102-86502012000800013>
- McClain, C. J., Barve, S., Deaciuc, I., Kugelmas, M., & Hill, D. (1999). Cytokines in Alcoholic Liver Disease. *Seminars in Liver Disease*, 19(2), 205–219.
- Michalopoulos, G. K. (2007). Liver regeneration. In *Journal of Cellular Physiology*.
<https://doi.org/10.1002/jcp.21172>
- Moreira, R. K. (2007). Hepatic stellate cells and liver fibrosis. In *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.5858/2007-131-1728-hscalf>
- Morris, S. M. (2012). Arginases and arginine deficiency syndromes. In *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*.
<https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32834d1a08>
- Murayama, H., Fukuda, Y., Tsunekawa, S., Ikemoto, M., & Nagata, A. (2007).

Ratio of serum ornithine carbamoyltransferase to alanine aminotransferase as a potent indicator for hepatocellular carcinoma. *Clinical Biochemistry*, 40(13–14), 1077–1080. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.05.001>

Muriel, P., Moreno, M. G., Hernández, M. D. C., Chávez, E., & Alcantar, L. K. (2005). Resolution of liver fibrosis in chronic CCl₄ administration in the rat after discontinuation of treatment: Effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicinic acid. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_06.x

Murphy, K., & Weaver, C. (2017). Janeway's Immunobiology 9Th Edition. In *America*.

Naito, M., Hasegawa, G., Ebe, Y., & Yamamoto, T. (2004). Differentiation and function of Kupffer cells. In *Medical Electron Microscopy*. <https://doi.org/10.1007/s00795-003-0228-x>

Nakamura, T., Sakai, K., Nakamura, T., & Matsumoto, K. (2011). Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 26(SUPPL. 1), 188–202. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06549.x>

Napodano, C., Marino, M. P., Stefanile, A., Pocino, K., Scatena, R., Gulli, F., Rapaccini, G. L., Delli Noci, S., Capozio, G., Rigante, D., & Basile, U. (2020). Immunological Role of IgG Subclasses. *Immunological Investigations*, 00(00), 1–18. <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1775643>

Nielsen, S. S., Grøfte, T., Tygstrup, N., & Vilstrup, H. (2007). Cirrhosis and endotoxin decrease urea synthesis in rats. *Hepatology Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00076.x>

Okuno, T., Andoh, A., Bamba, S., Araki, Y., Fujiyama, Y., Fujimiya, M., & Bamba, T. (2002). Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1080/003655202317284228>

- Osuna-Martínez, U., Reyes-Esparza, J. A., Petricevich, V. L., Hernández-Pando, R., & Rodríguez-Fragoso, L. (2011). Protective effect of thymic humoral factor on porcine serum-induced hepatic fibrosis and liver damage in wistar rats. *Annals of Hepatology*. [https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)31523-6](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)31523-6)
- Oyagi, S., Hirose, M., Kojima, M., Okuyama, M., Kawase, M., Nakamura, T., Ohgushi, H., & Yagi, K. (2006). Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl₄-injured rats. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.10.026>
- Parola, M., Albano, E., Autelli, R., Barrera, G., Biocca, M. E., Paradisi, L., & Dianzani, M. U. (1990). Inhibition of the high affinity Ca²⁺-ATPase activity in rat liver plasma membranes following carbon tetrachloride intoxication. *Chemico-Biological Interactions*. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(90\)90111-Y](https://doi.org/10.1016/0009-2797(90)90111-Y)
- Paronetto, F., & Popper, H. (1966). Chronic liver injury induced by immunologic reactions. Cirrhosis following immunization with heterologous sera. *American Journal of Pathology*.
- Perez-Cabeza de Vaca, R. (2012). *Efecto del hepatoprotector IFC-305 en células de Kupffer en un modelo experimental de cirrosis inducida por CCl₄*.
- Pérez-Carreón, J. I., Martínez-Pérez, L., Loredó, M. L., Yañez-Maldonado, L., Velasco-Loyden, G., Vidrio-Gómez, S., Ramírez-Salcedo, J., Hernández-Luis, F., Velázquez-Martínez, I., Suárez-Cuenca, J. A., Hernández-Muñoz, R., & de Sánchez, V. C. (2010). An adenosine derivative compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a pre-established CCl₄-induced rat cirrhosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.11.005>
- Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Mentink-Kane, M. M., Wilson, M. S., Kasmi, K. C. E., Smith, A. M., Thompson, R. W., Cheever, A. W., Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2009). Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathogens*.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000371>

- Pronzato, M. A., Domenicotti, C., Rosso, E., Bellocchio, A., Patrone, M., Marinari, U. M., Melloni, E., & Poli, G. (1993). Modulation of rat liver protein kinase C during "in vivo" CC14-induced oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1868>
- Rabier, D., & Kamoun, P. (1995). Metabolism of citrulline in man. In *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/BF00807268>
- Ramasamy, P., Subhapradha, N., Shanmugam, V., & Shanmugam, A. (2014). Protective effect of chitosan from *Sepia kobsiensis* (Hoyle 1885) cuttlebone against CCl₄ induced hepatic injury. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.009>
- Ramírez-Zamora, S., Méndez-Rodríguez, M. L., Olguín-Martínez, M., Sánchez-Sevilla, L., Quintana-Quintana, M., García-García, N., & Hernández-Muñoz, R. (2013). Increased Erythrocytes By-Products of Arginine Catabolism Are Associated with Hyperglycemia and Could Be Involved in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066823>
- Recknagel, R. O., Glende, E. A., Dolak, J. A., & Waller, R. L. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology and Therapeutics*. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(89\)90050-8](https://doi.org/10.1016/0163-7258(89)90050-8)
- Rusu, M. A., Tamas, M., Puica, C., Roman, I., & Sabadas, M. (2005). The hepatoprotective action of ten herbal extracts in CCl₄ intoxicated liver. *Phytotherapy Research*. <https://doi.org/10.1002/ptr.1625>
- Sadri, A. R., Jeschke, M. G., & Amini-Nik, S. (2016). Advances in liver regeneration: Revisiting hepatic stem/progenitor cells and their origin. In *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2016/7920897>
- Sakaida, I., Uchida, K., Matsumura, Y., & Okita, K. (1998). Interferon gamma treatment prevents procollagen gene expression without affecting transforming

- growth factor- β 1 expression in pig serum-induced rat liver fibrosis in vivo. *Journal of Hepatology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(98\)80322-X](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(98)80322-X)
- Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C., & Weiskirchen, R. (2015). The carbon tetrachloride model in mice. *Laboratory Animals*. <https://doi.org/10.1177/0023677215571192>
- Seki, E., & Schwabe, R. F. (2015). Hepatic inflammation and fibrosis: Functional links and key pathways. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.27332>
- Seki, S., Habu, Y., Kawamura, T., Takeda, K., Dobashi, H., Ohkawa, T., & Hiraide, H. (2000). The liver as a crucial organ in the first line of host defense: The roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. In *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0528.2002.017404.x>
- Shahjahan, M., Sabitha, K. E., Jainu, M., & Shyamala Devi, C. S. (2004). Effect of *Solanum trilobatum* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats. *Indian Journal of Medical Research*.
- Shiga, A., Shbrota, K., Ikeda, T., & Nomura, Y. (1997). Morphological and Immunohistochemical Studies on Porcine Serum-Induced Rat Liver Fibrosis. *Journal of Veterinary Medical Science*. <https://doi.org/10.1292/jvms.59.159>
- Slater, T. F., Cheeseman, K. H., & Ingold, K. U. (1985). Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.1985.0169>
- Smuckler, E. A., & Benditt, E. P. (1965). Studies on Carbon Tetrachloride Intoxication. III. A Subcellular Defect in Protein Synthesis. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi00880a009>
- Starkel, P., & Leclercq, I. A. (2011). Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.02.004>

- Suárez-Cuenca, J. A., De Sánchez, V. C., Aranda-Fraustro, A., Sánchez-Sevilla, L., Martínez-PÉrez, L., & Hernández-Muñoz, R. (2008). Partial hepatectomy-induced regeneration accelerates reversion of liver fibrosis involving participation of hepatic stellate cells. *Experimental Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.3181/0709-RM-247>
- Sun, F., Hamagawa, E., Tsutsui, C., Ono, Y., Ogiri, Y., & Kojo, S. (2001). Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(00\)00098-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(00)00098-3)
- Sun, H., Che, Q. M., Zhao, X., & Pu, X. P. (2010). Antifibrotic effects of chronic baicalein administration in a CCl₄ liver fibrosis model in rats. *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.01.002>
- Sun, P., Li, D., Li, Z., Dong, B., & Wang, F. (2008). Effects of glycinin on IgE-mediated increase of mast cell numbers and histamine release in the small intestine. *Journal of Nutritional Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.08.007>
- Takanashi, J., Kurihara, A., Tomita, M., Kanazawa, M., Yamamoto, S., Morita, F., Ikehira, H., Tanada, S., & Kohno, Y. (2002). Distinctly abnormal brain metabolism in late-onset ornithine transcarbamylase deficiency. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.59.2.210>
- Taub, R. (2004). Liver regeneration: From myth to mechanism. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm1489>
- Tiggelman, A. M. B. C., Boers, W., Linthorst, C., Sala, M., & Chamuleau, R. A. E. M. (1995). Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 β , IL-4, TGF β and IFN gamma. *Journal of Hepatology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(95\)80010-7](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(95)80010-7)
- Tomasi, A., Albano, E., Banni, S., Botti, B., Corongiu, F., Dessi, M. A., Iannone, A., Vannini, V., & Dianzani, M. U. (1987). Free-radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondria. A study of the mechanism of activation.

Biochemical Journal. <https://doi.org/10.1042/bj2460313>

- Trépo, C., Chan, H. L. Y., & Lok, A. (2014). Hepatitis B virus infection. In *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60220-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60220-8)
- Tsuji, M., Kodama, K., & Oguchi, K. (1990). Protective Effect of S-Adenosyl-L-Methionine against CCl₄-Induced Hepatotoxicity in Cultured Hepatocytes. *The Japanese Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1254/jjp.52.209>
- Uličná, O., Greksák, M., Vančová, O., Zlatoš, L., Galbavý, Š., Božek, P., & Nakano, M. (2003). Hepatoprotective effect of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on CCl₄-induced liver damage in rats. *Physiological Research*.
- Unanue, E. R. (2007). Ito Cells, Stellate Cells, and Myofibroblasts: New Actors in Antigen Presentation. In *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.001>
- Varela-Moreiras, G., Alonso-Aperte, E., Rubio, M., Gasso, M., Deulofeu, R., Alvarez, L., Caballeria, J., Rodes, J., & Mato, J. M. (1995). Carbon tetrachloride-induced hepatic injury is associated with global dna hypomethylation and homocysteinemia: Effect of s-adenosylmethionine treatment. *Hepatology*. [https://doi.org/10.1016/0270-9139\(95\)90644-4](https://doi.org/10.1016/0270-9139(95)90644-4)
- Velasco-Loyden, G., Pérez-Carreón, J. I., Agüero, J. F. C., Romero, P. C., Vidrio-Gómez, S., Martínez-Pérez, L., Yáñez-Maldonado, L., Hernández-Muñoz, R., Macías-Silva, M., & de Sánchez, V. C. (2010). Prevention of in vitro hepatic stellate cells activation by the adenosine derivative compound IFC305. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.08.017>
- Verweij, C. L., Bayley, J. P., Bakker, A., & Kaijzel, E. L. (2001). Allele specific regulation of cytokine genes: Monoallelic expression of the IL-1A gene. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0685-0_17
- Vhtala, K., Israel, Y., Blake, J. E., & Niemelä, O. (1997). Serum IgA, IgG, and IgM antibodies directed against acetaldehyde- derived epitopes: Relationship to

- liver disease severity and alcohol consumption. *Hepatology*, 25(6), 1418–1424. <https://doi.org/10.1002/hep.510250619>
- Wan, J., Benkdane, M., Teixeira-Clerc, F., Bonnafous, S., Louvet, A., Lafdil, F., Pecker, F., Tran, A., Gual, P., Mallat, A., Lotersztajn, S., & Pavoine, C. (2014). M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: A protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 59(1), 130–142. <https://doi.org/10.1002/hep.26607>
- Wang, R., Yu, X. Y., Guo, Z. Y., Wang, Y. J., Wu, Y., & Yuan, Y. F. (2012). Inhibitory effects of salvianolic acid B on CCl₄-induced hepatic fibrosis through regulating NF- κ B/I κ B α signaling. *Journal of Ethnopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.09.048>
- Weber, L. W. D., Boll, M., & Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. In *Critical Reviews in Toxicology*. <https://doi.org/10.1080/713611034>
- Winau, F., Quack, C., Darmoise, A., & Kaufmann, S. H. (2008). Starring stellate cells in liver immunology. In *Current Opinion in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.10.006>
- Wu, J., & Norton, P. A. (1996). Animal models of liver fibrosis. In *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.3109/00365529609036901>
- Xu, D., Fu, J., Jin, L., Zhang, H., Zhou, C., Zou, Z., Zhao, J.-M., Zhang, B., Shi, M., Ding, X., Tang, Z., Fu, Y.-X., & Wang, F.-S. (2006). Circulating and Liver Resident CD4 + CD25 + Regulatory T Cells Actively Influence the Antiviral Immune Response and Disease Progression in Patients with Hepatitis B. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.739>
- Yang, Z., & Ming, X. F. (2014). Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: Impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. In *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00533>

Zhang, F., Gu, J. X., Zou, X. P., & Zhuge, Y. Z. (2016). Protective effects of S-adenosylmethionine against CCl₄- and ethanol-induced experimental hepatic fibrosis. *Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1134/S0026893316020278>

Zhou, W. C., Zhang, Q. B., & Qiao, L. (2014). Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(23), 7312–7324. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7312>

ANEXO 1



CICUAL IFC



Instituto de
Fisiología
Celular

DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ

Investigador del Departamento de
Biología Celular y Desarrollo.
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Presente.

Por este conducto me permito informar a Usted que su Protocolo Número **RHM85-16**,
Titulado **“Estudio de los mecanismos de auto-inmunidad por administración de
suero heterólogo en los procesos de regeneración hepática y fibrogénesis, durante
la instalación y progresión de cirrosis en ratas”** está aprobado por el Comité
Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología
Celular con una vigencia al mes de noviembre de 2016.

Ciudad de México, a 27 de Abril de 2016.


MVZ Claudia V. Rivera Cerecedo
Presidente del CICUAL-IFC

c.c.p. archivo

*Recibido original
16/05/2016
[Firma]*



REGLAMENTO PARA USUARIOS DEL ÁREA DE RATONES TRANSGÉNICOS DEL BIOTERIO

1. Esta sala es exclusiva para colonias de reproducción de roedores, no se permite la estancia de animales en protocolo experimental.
2. Para ingresar a la sala de ratones en el bioterio es indispensable NO haber estado ese mismo día trabajando con animales en el laboratorio ni haber visitado a los animales del Vivarium.
3. Solo se permitirá el ingreso a la sala de ratones transgénicos a los estudiantes que hayan tomado el Taller de Manejo de Animales de Laboratorio impartido en el IFC.
4. Solo se permite el ingreso a la sala de un máximo de 2 personas por laboratorio, preferentemente las asignadas por el Investigador.
5. Únicamente se permite el ingreso de dos personas a la vez en la sala de ratones transgénicos.
6. Los usuarios deben lavarse las manos antes de ingresar al bioterio.
7. Para ingresar a la sala deberán utilizar la bata, el gorro y el cubrebocas que le proporcionaran en el bioterio. Al terminar el trabajo la bata se coloca en el cesto en la gaveta de y el cubre bocas junto con los guantes en el bote de residuos especiales.
8. Por el bienestar de los animales, los procedimientos como corte toma de biopsias, marcaje (con arete o muesca), curaciones, etc. deberán realizarse en el cuarto de procedimientos del bioterio y nunca dentro de la sala de ratones transgénicos.
9. Los bolígrafos, tarjetas y libretas que se utilizan deben ser de uso exclusivo para el área y nunca deben ser llevados a otras áreas que alojen animales.

10. Como una medida de bioseguridad en caso de que un roedor escape de la caja y merodee por el piso se le deberá aplicar eutanasia y de ninguna manera debe ser reintroducido a la caja
11. No se deben ingresar a la sala mesas de trabajo ajenas al cuarto.
12. Antes de empezar a trabajar es necesario limpiar y desinfectar la mesa de acero inoxidable con el aspersor y las toallas de papel que se encuentran en el cuarto.
13. Al terminar el trabajo deberá nuevamente limpiar y desinfectar la mesa de acero inoxidable.
14. El alimento que se ha utilizado en los comederos de ratones debe desecharse.
15. Las cajas sucias y los bebederos que ya no se ocupen deben ser colocados en el área de lavado.
16. Queda prohibido sacar del bioterio las cajas microaisladoras.
17. Queda prohibido ingresar al bioterio cajas provenientes del vivarium, del laboratorio o de bioterios externos.
18. Queda prohibido ingresar teléfonos celulares a la sala de ratones.
19. Por razones de bioseguridad queda prohibido ingresar de manera permanente o temporal animales que provengan de otros bioterios.
Cuando por alguna razón se requiera comprar o recibir animales que provengan de otra institución será necesaria la revisión clínica de los animales, la presentación de certificado de salud y la aprobación del MVZ Jefe de la Unidad Académica Bioterio. En caso de aprobar su ingreso, los animales permanecerán en el área de cuarentena durante cuatro semanas.

Infracciones:

El incumplimiento de este reglamento implicará sanciones que van desde un reporte con el Investigador Principal, la restricción en el ingreso al área de forma temporal o permanente dependiendo de la gravedad de la falta hasta la cancelación del protocolo registrado para uso de animales en la Institución ante el CICUAL-IFC de acuerdo con la Tabla de incidencias y sanciones aprobada por el CICUAL-IFC.