



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

·  
·  
·

FACULTAD DE FARMACIA

## TESIS

### *“Efecto de la $\beta$ -Hidroxifosfocarnitina en la fibrosis hepática”*

Para obtener el grado de:  
Licenciado en Farmacia

Presenta:

Abner Guzman Casarrubias

Director de tesis

Dra. María de Lourdes Rodríguez Fragoso

Co Director de tesis

Dr. Erick Ayala Calvillo

## ÍNDICE

CONTENIDO	PÁG
<b>ABREVIATURAS</b> .....	6
<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	10
<b>2.- FIBROSIS HEPÁTICA</b> .....	11
2.1 EL HÍGADO: CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	11
2.2 ENFERMEDADES QUE ALTERAN LA INTEGRIDAD HEPÁTICA.....	13
2.3 PATOGÉNESIS DE LA FIBROSIS HEPÁTICA.....	16
2.4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO DE LA FIBROSIS HEPÁTICA.....	21
<b>3.- ANTECEDENTES</b> .....	23
3.3 TRATAMIENTOS EMPLEADOS EN LA FIBROSIS HEPÁTICA.....	23
3.2 $\beta$ - HIDROXIFOSFOCARNITINA.....	25
3.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE FÁRMACOS SOBRE LA FIBROSIS HEPÁTICA.....	29
3.4 MODELOS DE FIBROSIS HEPÁTICA.....	31
<b>4.- JUSTIFICACIÓN</b> .....	34
<b>5.- HIPÓTESIS</b> .....	35
<b>6.- OBJETIVOS</b> .....	35
<b>7.- MÉTODOS</b> .....	36
<b>8.- RESULTADOS</b> .....	41

8.1 EFECTO DE LA $\beta$ -HIDROXIFOSFOCARNITINA SOBRE LAS FIBRAS DE COLÁGENA EN UN MODELO DE FIBROSIS INDUCIDA <i>IN VIVO</i> .....	41
8.2 EFECTO DE LA $\beta$ -HIDROXIFOSFOCARNITINA SOBRE LAS CELULAS ESTELARES HEPÁTICAS EN UN MODELO DE FIBROSIS INDUCIDA <i>IN VIVO</i> .....	43
8.3 EFECTO DE LA $\beta$ -HIDROXIFOSFOCARNITINA SOBRE LA ARQUITECTURA HEPÁTICA EN UN MODELO DE FIBROSIS INDUCIDA <i>IN VIVO</i> .....	45
8.4 EFECTO DE LA $\beta$ -HIDROXIFOSFOCARNITINA SOBRE LA FUNCIÓN HEPÁTICA EN UN MODELO DE FIBROSIS INDUCIDA <i>IN VIVO</i> .....	49
<b>8.- DISCUSIÓN</b> .....	52
<b>9.- CONCLUSIONES</b> .....	58
<b>10. REFERENCIAS</b> .....	59

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>PÁG.</b>
Figura 1. Funciones del hígado.....	11
Figura 2. Arquitectura microscópica del hígado.....	12
Figura 3. Factores de riesgo de daño hepático.....	15
Figura 4. Patogénesis de la fibrosis hepática.....	17
Figura 5. Papel de los hepatocitos en la fibrosis hepática.....	19
Figura 6. Estructura química de la L-carnitina.....	25
Figura 7. Síntesis representativa de $\beta$ -Hidroxifosfocarnitina.....	27
Figura 8. Cambios estructurales entre L-carnitina y $\beta$ -Hidroxifosfocarnitina.....	27
Figura 9. Tratamiento aplicado en grupos experimentales (Modelo).....	37
Figura 10. Efecto de $\beta$ -Hidroxifosfocarnitina sobre la fibrosis en ratas con daño hepático.....	42
Figura 11. Efecto de $\beta$ -Hidroxifosfocarnitina sobre los hepatocitos.....	44
Figura 12. Efecto de $\beta$ -Hidroxifosfocarnitina sobre las células estelares.....	45
Figura 13. Cambios macroscópicos en el hígado en la fibrosis hepática.....	46
Figura 14. Efecto de $\beta$ -Hidroxifosfocarnitina sobre la arquitectura hepática en ratas con fibrosis.....	48
Figura 15. Efecto de $\beta$ -Hidroxifosfocarnitina sobre la arquitectura hepática en ratas con fibrosis.....	49
Figura 16. Nivel de aspartato aminotransferasa en ratas Wistar con daño hepático.....	51

## **ÍNDICE DE TABLAS**

**PÁG.**

Tabla 1. Fármacos empleados en el tratamiento  
de la fibrosis hepática de distintas etiologías

23

Tabla 2.- Pruebas bioquímicas realizadas  
en distintos grupos de ratas Wistar.

50

## Abreviaturas

Especies reactivas de oxígeno -- ERO

Células estelares hepáticas -- CEH

Factor de crecimiento transformante- $\beta$  – (por sus siglas en inglés) TGF- $\beta$

Factor de crecimiento derivado de plaquetas – (por sus siglas en inglés) PDGF

Metaloproteasas de matriz -- MMP

Inhibidores tisulares de las metaloproteasas de matriz -- (por sus siglas en inglés) TIMP

$\alpha$ -actina de músculo liso -- (por sus siglas en inglés)  $\alpha$ -SMA

Miofibroblastos -- MFB

Enfermedad del hígado graso no alcohólico -- HGNA

Esteatohepatitis no alcohólica -- EHNA

Patrones moleculares asociados a daños -- (por sus siglas en inglés) DAMP

Células endoteliales sinusoidales hepáticas -- (por sus siglas en inglés) LSEC

$\beta$ -Hidroxifosfocarnitina --  $\beta$ -HFC

Triglicéridos -- TG

Alanina aminotransferasa -- ALT

Aspartato aminotransferasa -- AST

Fosfatasa alcalina -- ALP

Gamma glutamil transferasa – GGT

Células endoteliales sinusoidales hepáticas -- (por sus siglas en inglés) LSEC

Células NK -- Natural killer

Factor de crecimiento transformante  $\beta$ -1 -- (por sus siglas en inglés) TGF- $\beta$ 1

Carcinoma hepatocelular – CHC

Dietilnitrosamida – DEN

Tetracloruro de carbono – CCl<sub>4</sub>

## RESUMEN

La fibrosis hepática es una enfermedad multifactorial que puede ser causada por diversas etiologías que producen daño crónico, entre las más comunes están los trastornos genéticos, las infecciones víricas, el abuso de alcohol, los trastornos metabólicos y el abuso de fármacos u otras sustancias químicas. A pesar de ser una enfermedad cada vez más común, hasta el momento se carece de fármacos aprobados para el tratamiento de la fibrosis hepática, debido a esta problemática se sigue en la búsqueda de moléculas antifibróticas. La  $\beta$ -Hidroxfosfocarnitina ( $\beta$ -HFC) es un análogo de la L-carnitina que ha demostrado tener poder hepatoprotector, así como favorables propiedades farmacocinéticas y un margen de seguridad elevado. El objetivo del presente proyecto fue identificar si la  $\beta$ -HFC tiene efecto en la fibrosis hepática inducida con DEN/ $\text{CCl}_4$  en ratas Wistar. Para ello se utilizaron 16 ratas Wistar divididas en 4 grupos: 1. Control sin tratamiento; 2.  $\beta$ -HFC: ratas tratadas con  $\beta$ -HFC 100 mg/Kg, v.o. por 3 sem.; 3. Fibrosis: ratas tratadas con DEN 7 mg/100 g dosis única y  $\text{CCl}_4$  1.5 ml/ kg, 2 veces por sem., ambas por inyección subcutánea y 4. Fibrosis+ $\beta$ -HFC: ratas con fibrosis y tratadas con  $\beta$ -HFC, en dosis antes señaladas. Se analizaron cortes histológicos teñidos con Tricrómica de Masson y H & E para identificar fibras de colágena y alteraciones en la arquitectura hepática, además, las muestras fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión para observar cambios ultraestructurales y se realizaron pruebas de función hepática. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la administración de  $\beta$ -HFC reduce la cantidad de fibras de colágena, así como de células estelares en estado activado en el hígado de ratas con fibrosis hepática. También,  $\beta$ -HFC demostró no ser hepatotóxico al no alterar la arquitectura ni función hepática en el hígado sano e incluso desempeñó función hepatoprotectora al restaurar las alteraciones en la morfología y función hepática causada por DEN/ $\text{CCl}_4$ . Como conclusión, la administración de  $\beta$ -HFC modificó favorablemente las alteraciones histopatológicas asociadas a la fibrosis hepática.  $\beta$ -HFC redujo las fibras de colágena, redujo el número de CEH, con lo que mejoró la arquitectura y función hepática.

## ABSTRACT

Liver fibrosis is a multifactorial disease that can be caused by a variety of aetiologies that produce chronic damage, the most common of which include genetic disorders, viral infections, alcohol abuse, metabolic disorders and the abuse of drugs or other chemical substances. Despite being an increasingly common disease, so far there is a lack of approved drugs for the treatment of liver fibrosis, and the search for anti-fibrotic molecules continues.  $\beta$ -Hydroxyphosphocarnitine ( $\beta$ -HPC) is an analogue of L-carnitine that has been shown to have hepatoprotective potency, as well as favourable pharmacokinetic properties and a high safety margin. The aim of the present project was to identify whether  $\beta$ -HFC has an effect on DEN/CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in Wistar rats. Fibrosis: rats treated with DEN 7 mg/100 g single dose and CCl<sub>4</sub> 1.5 ml/kg, 2 times per week, both by subcutaneous injection and 4. Fibrosis+ $\beta$ -HPC: rats with fibrosis and treated with  $\beta$ -HPC, at the doses indicated above. Histological sections stained with Masson's Trichrome and H&E were analysed to identify collagen fibres and alterations in liver architecture, and samples were analysed by transmission electron microscopy for ultrastructural changes and liver function tests were performed. The results obtained in this work indicate that the administration of  $\beta$ -HFC reduces the amount of collagen fibres as well as stellate cells in an activated state in the liver of rats with liver fibrosis. Also,  $\beta$ -HFC proved not to be hepatotoxic by not altering liver architecture and function in healthy liver and even played a hepatoprotective role by restoring the alterations in liver morphology and function caused by DEN/CCl<sub>4</sub>. In conclusion,  $\beta$ -HFC administration favourably modified the histopathological alterations associated with liver fibrosis.  $\beta$ -HFC reduced collagen fibres, reduced the number of HSCs, thereby improving liver architecture and function.

## 1.- Introducción

Las distintas enfermedades hepáticas se han convertido en los últimos años en un problema de salud a nivel mundial (Asrani et al., 2019). Cada una con un agente etiológico específico asociado a su frecuencia, por ejemplo: las hepatitis virales, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), la hepatitis autoinmune y las causadas por el abuso de bebidas alcohólicas (Hernandez-Gea & Friedman, 2011), que, de manera crónica, tienen la capacidad de desarrollar fibrosis hepática (Caligiuri et al., 2021).

La fibrosis hepática se caracteriza por la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular (MEC), entre ellas principalmente colágena fibrilar producidas por las células estelares hepáticas (CEH) en estado activado (Berumen et al., 2021). La fibrosis puede dividirse en fases, iniciando con una ligero aumento de fibras de colágena, que puede avanzar hasta una mayor invasión del hígado, para progresar hasta la cirrosis hepática. Esta última está relacionada con la insuficiencia hepática, que a su vez predispone a quien la padece a poder desarrollar carcinoma hepatocelular, por lo tanto, una fase de fibrosis avanzada aumenta la mortalidad en las personas que la padecen (Wong et al., 2017).

En la actualidad no existen fármacos aprobados contra la fibrosis hepática, por lo que, es indispensable la búsqueda de nuevas moléculas que puedan ser útiles para controlar o revertir procesos fisiopatológicos de la enfermedad (Tan et al., 2021). En el LFTI de la Facultad de Farmacia de la UAEM, atendimos a esta problemática y desarrollamos modelos preclínicos *in-vivo* de distintas enfermedades hepáticas para la evaluación de fármacos con potencial poder antifibrótico.

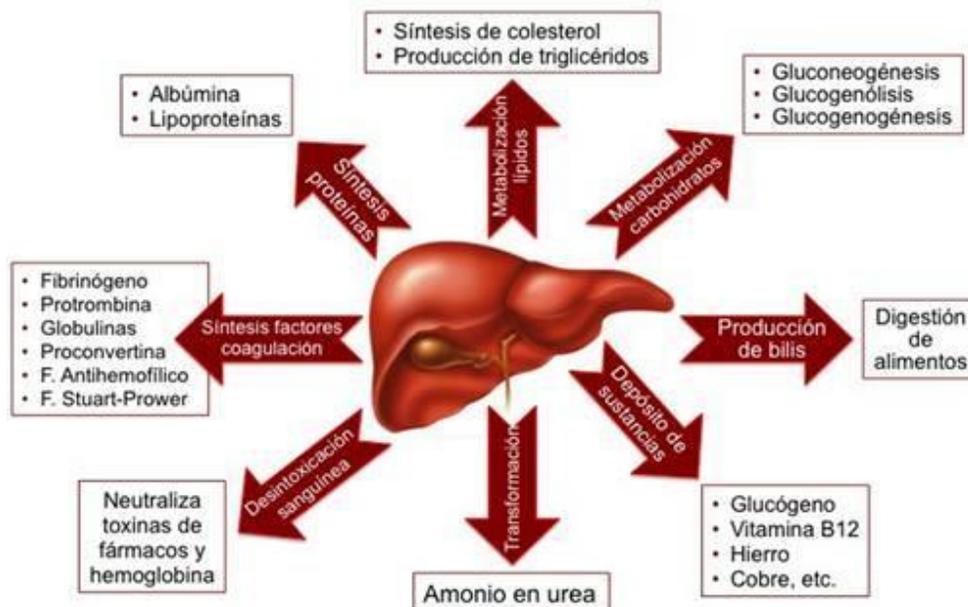
La L-carnitina ha sido evaluada ampliamente en enfermedades asociadas a la alteración de procesos metabólicos, pero recientemente distintos estudios demuestran su potencial efecto hepatoprotector en distintas enfermedades hepáticas.  $\beta$ -Hidroxifosfocarnitina ( $\beta$ -HFC) es un análogo de la L-carnitina que conserva su efecto terapéutico, pero tiene características farmacocinéticas, mejores a la de su precursor, así como de un margen de seguridad elevado. Por lo que, en

el presente estudio evaluamos el efecto de la  $\beta$ -HFC sobre la fibrosis hepática inducida en un modelo in vivo

## 2.- Fibrosis hepática

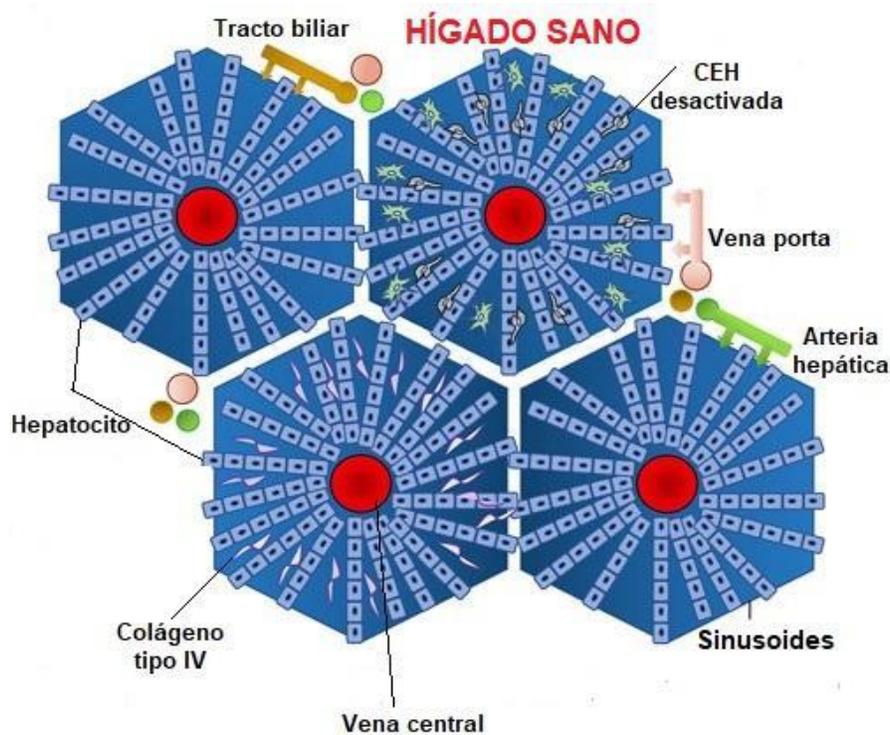
### 2.1 El hígado: características generales

El hígado es el órgano más grande y uno de los más relevantes del cuerpo humano, su peso oscila entre los 1.4 a 1.8 kg en el hombre y 1.2 a 1.4 kg en la mujer, se trata de un órgano único debido a su doble suministro de sangre desde la vena porta (75%) y la arteria hepática (25%) (Bismuth, 2013). El hígado es un órgano multifuncional (**Fig. 1**), lo que quiere decir que cumple una gran cantidad de funciones en el organismo, todas ellas vitales para un correcto funcionamiento del cuerpo humano; por ejemplo, metabolismo, inmunidad, digestión, desintoxicación, almacenamiento de vitaminas, entre otras (Ríos-López et al., 2020).



**Figura 1. Funciones del hígado.** El hígado es un órgano indispensable, que cumple con una gran cantidad de procesos vitales para el ser humano. Imagen tomada de (Manterola et al., 2017)

A nivel microscópico, la estructura hepática se puede dividir en acino y lóbulo. El nombre que recibe la unidad funcional del hígado es “lóbulo hepático”, que está compuesto por los hepatocitos, distribuidos de manera radial alrededor de la vena central, revestidos por células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC) (Steadman et al., 2019). El lóbulo hepático (**Figura 2**) posee una forma hexagonal y mide aproximadamente 1 x 2 mm, dentro de ellos se extienden los sinusoides hepáticos que salen de la vena central y se distribuyen hasta las triadas portales (vena porta, arteria hepática, conducto biliar) que se encuentran en las esquinas del lóbulo (Cheng et al., 2021). El acino es la unidad funcional más pequeña, este se divide en tres zonas, la primer zona rodea el tracto porta y la tercera zona rodea la vénula hepática. La sangre del tracto porta fluye a través de estas zonas hacia la vénula con un gradiente decreciente de oxígeno y nutrientes (Steadman et al., 2019).



**Figura 2. Arquitectura microscópica del hígado.** Esquema representativo de la unidad funcional del hígado “Lóbulo”, Los hepatocitos salen de la vena central, el espacio entre hepatocitos se llama sinusoides hepáticos, La sangre fluye desde la vena porta hasta la vena central,. Imagen modificada de (Acharya et al., 2021).

Ya se han mencionado un gran número de características del hígado, sin embargo, existe una que destaca entre todas al ser única del hígado, está es su capacidad de regeneración tras una lesión o corte parcial. Los expertos mencionan que al hígado se le puede extirpar hasta dos tercios de su volumen total y este es capaz de regenerarse por completo (Olthoff, 2003). El hígado puede llevar a cabo dos tipos de regeneración cada una de ellas dependiendo del tiempo que dura el daño celular; la primera de ellas se presenta cuando se realiza una extirpación de una pequeña porción del hígado y se conoce como “regeneración aguda”. Por otro lado “la regeneración crónica” se presenta en respuesta a enfermedades hepáticas que se prolongan por tiempo prolongado (virales, autoinmunes, etc.) (Stoelting & Hillier, 2012).

## **2.2 Enfermedades que alteran la integridad hepática**

Para que cualquier persona pueda gozar de una buena calidad de vida es indispensable la preservación del hígado, sin embargo, existen diversas etiologías que pueden desarrollar un daño crónico con potencial evolución a fibrosis (**Figura 3**), entre las más comunes están los trastornos genéticos, las infecciones víricas, el abuso de alcohol, trastornos metabólicos y el abuso de fármacos u otras sustancias químicas. (Weiskirchen et al., 2018).

### **A) Enfermedad del hígado por trastornos genéticos:**

Existe la posibilidad de que algunas personas puedan nacer con mutaciones en genes que pueden predisponer a padecer enfermedades hepáticas. Los padres pueden transmitir estos cambios genéticos a sus hijos, de generación en generación (Taddei et al., 2008). Estas enfermedades disminuyen la capacidad del hígado de procesar nutrientes y eliminar toxinas. La evolución del daño hepático puede variar con la edad y tipo de afectación, algunos de los trastornos genéticos más comunes son los siguientes: deficiencia de alfa-1 antitripsina, enfermedad de Wilson, hemocromatosis hereditaria, deficiencia de argininosuccinato liasa, síndrome de Alström, intolerancia hereditaria a la fructosa, entre otras (Scorza et al., 2014).

*B) Enfermedad del hígado por infecciones víricas:*

El hígado es propenso a sufrir afectaciones por agentes virales, que tiende afinidad por el hígado, estos son conocidos como “virus de la hepatitis” (Spengler et al., 2012). Entre las hepatitis víricas tenemos a la hepatitis A, hepatitis B y hepatitis C, que han aumentado su prevalencia en los últimos años, por lo que se han vuelto un importante problema de salud pública (Bataller et al., 2004; Trépo et al., 2014). Estos virus tienen la capacidad de atacar a las células hepáticas, las cuales, al estar infectadas, sufren dentro de sí replicación del virus, lo que provoca cascadas inflamatorias, producción de colágeno y fibrosis (Wang et al., 2023).

*C) Enfermedad del hígado graso no alcohólico (HGNA):*

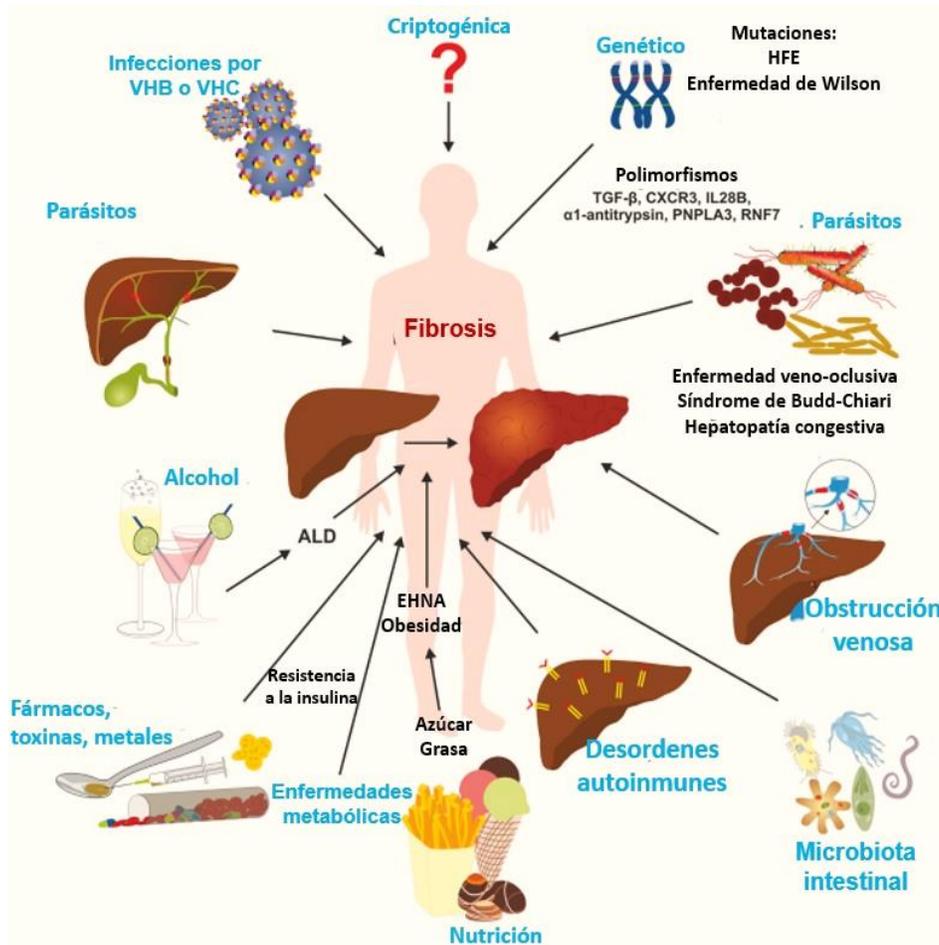
Consecuencia de un alto consumo de alimentos con grandes cantidades de grasas y azúcares acompañado de un gasto pobre de energía, el HGNA se caracteriza por la presencia de esteatosis en más del 5% de los hepatocitos (European Association for the Study of the Liver (EASL) et al., 2016). El HGNA engloba un continuo de enfermedades que incluye la esteatosis con o sin inflamación leve (HGNA), un subtipo necro inflamatorio (esteatohepatitis no alcohólica o EHNA), y la presencia de lesión hepatocelular (abombamiento de los hepatocitos).

*D) Daño hepático inducida por fármacos:*

La hepatotoxicidad generada por compuestos exógenos es de relevancia médica, debido a su prevalencia y a la alta importancia del hígado par el organismo (Teschke et al., 2008). La automedicación, así como el abuso de medicamentos puede predisponer a una persona a sufrir hepatotoxicidad. La hepatotoxicidad inducida por fármacos es muy frecuente en pacientes con lesión hepática aguda, debido a la falta de educación respecto a la correcta medicación (Björnsson, 2016).

Por lo anterior, existen una gran cantidad de factores que pueden dañar al hígado (Figura 3), pero independientemente de la etiología, todas estos tienen la capacidad de conducir a fibrosis hepática y poseen mecanismos moleculares similares entre sí, como la muerte de los hepatocitos, la inflamación crónica con liberación de

citocinas, la activación de las CEH y la alteración de la barrera epitelial o endotelial (Dhar, Baglieri, Kisseleva y Brenner, 2020) .



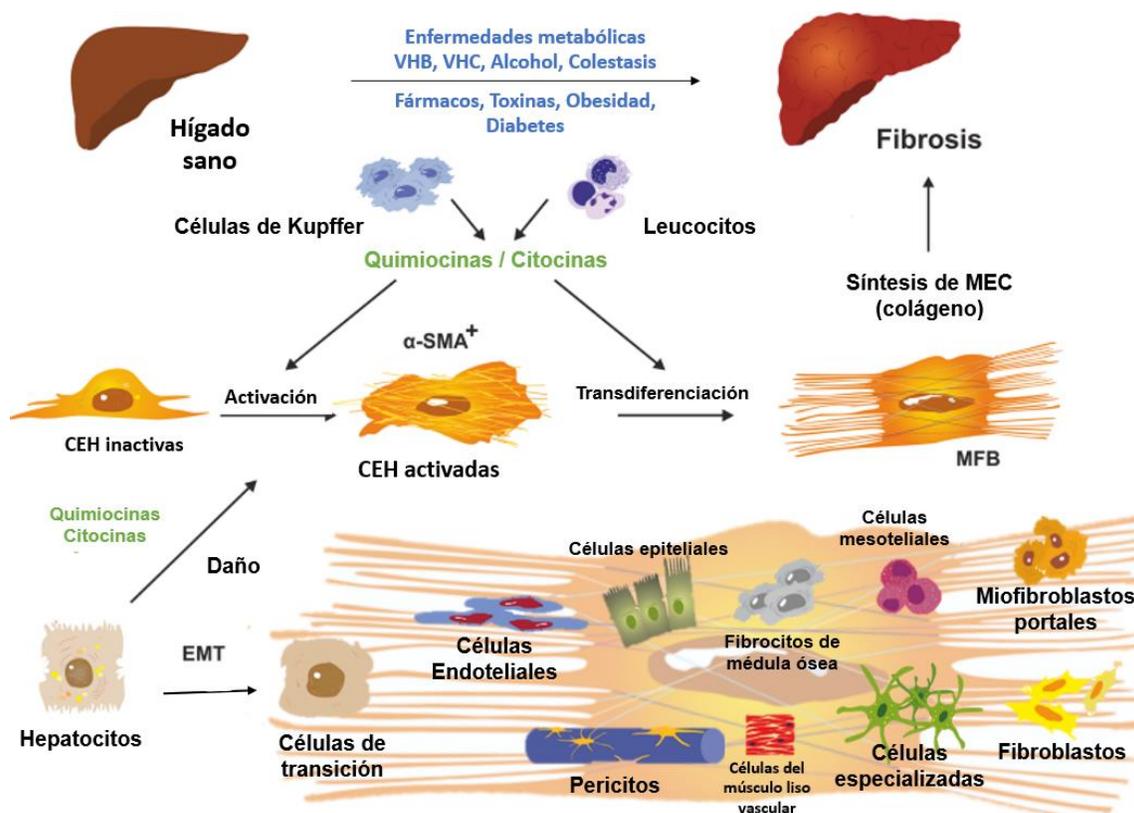
**Figura 3. Factores de riesgo de daño hepático.** En el hígado, las alteraciones genéticas, los trastornos metabólicos, la colestasis, las infecciones víricas, los parásitos, los fármacos, las toxinas, el abuso del consumo de alcohol, una amplia variedad de otros compuestos nocivos y factores ambientales pueden provocar el inicio y la progresión de la fibrosis (Modificado de (Weiskirchen et al., 2018).

### 2.3 Patogénesis de la fibrosis hepática

La fibrogénesis es una respuesta normal en el organismo ante las lesiones tisulares. Cualquier tipo de lesión que causa daño hepatocelular activa las vías fibrogénicas (**Figura 4**). Durante el daño hepatocelular se produce la liberación de señales, como las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las interacciones intercelulares, estas conducen a la diferenciación de las CEH a miofibroblastos (MFB). Los miofibroblastos se caracterizan por su capacidad de producir colágeno y favorecer la contracción de una lesión, por lo tanto, al ser activadas las CEH se convierten en una fuente importante de proteínas de la MEC. Los hepatocitos dañados también activan células inflamatorias como lo son los macrófagos y linfocitos para generar múltiples tipos de citoquinas, como el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), claves también en la activación y diferenciación de las CEH (Lambrecht et al., 2020). Cuando se activan estas vías, en el espacio de Disse se da una secreción de componentes de la MEC, estos componentes tienen como objetivo el encapsulamiento y aislamiento de la porción de tejido que está dañada para su posterior reparación (Bataller et al., 2004). Durante la encapsulación, se da también una infiltración de células inmunitarias que eliminan los restos celulares y comienzan la reparación del tejido dañado. En el hígado normal, la MEC presente en el espacio de Disse está conformada por glicoproteínas (fibronectina y laminina), colágeno tipo IV (no fibrótico) y proteoglicanos. La MEC tiene importancia biológica ya que proporciona soporte mecánico a las células hepáticas, así como señales moleculares para su correcto funcionamiento. En condiciones normales las características de la MEC se mantienen y no cambian, no es hasta que existe un daño celular, donde su composición y densidad se modifican: su producción se eleva siendo de hasta 6 a 8 veces mayor, el colágeno de tipo IV (no fibrilar) generado se sustituye por colágeno de tipo I y II (fibrilar), también hay una secreción adicional de fibronectina, ácido hialurónico y  $\alpha$ -actina de músculo liso (Iredale et al., 2013).

La fibrogénesis es un proceso rápido hablando de lesiones agudas y leves. Con una lesión hepática a corto plazo, no se producirá fibrosis hepática. Sin embargo,

cuando se produce una lesión hepática prolongada, la membrana de los hepatocitos se destruye, provocando su necrosis y una activación crónica de la fibrogénesis, se rompe la homeostasis entre la fibrogénesis y la fibrinólisis, lo que se ve reflejado en un mayor depósito de colágeno en el hígado o mejor conocido como “fibrosis” (Hernandez-Gea & Friedman, 2011).



**Figura 4. Patogénesis de la fibrosis hepática.** Las CEH quiescentes se activan por algunos mediadores (quimiocinas y citocinas) que son liberados por las células de Kupffer, células infiltradas y los hepatocitos que han sufrido algún tipo de daño. Las CEH activadas son positivas para la  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Los MFB son la fuente predominante de síntesis y depósito de colágeno. El conjunto de MFB productores de MEC aumenta con diferentes tipos celulares como los fibroblastos residentes, las células mesoteliales, los fibrocitos circulantes (médula ósea), las células epiteliales, las células endoteliales, los pericitos, las células musculares lisas vasculares y otros tipos celulares especializados que adquieren actividades profibrogénicas y son capaces de expresar componentes de la MEC (Modificado de Weiskirchen et al., 2018).

La fibrosis hepática es la respuesta de cicatrización sostenida ante una lesión hepática (Dhar et al., 2020). Se caracteriza principalmente por la acumulación excesiva de MEC, especialmente fibras de colágeno (Reeves & Friedman, 2002). El depósito de grandes cantidades de proteínas de la MEC alrededor de los lobulillos y dentro del espacio sinusoidal altera la disposición radial de los hepatocitos, interfiriendo en el flujo de nutrientes y moléculas de señalización de la sangre a través de las sinusoides a los hepatocitos, lo que altera la función hepática (Iwakiri, 2014).

Si se da solución al agente causante de la lesión hepatocelular la fibrosis puede ser reversible, siempre y cuando se encuentre en las primeras etapas, en el caso de que la afección se encuentre avanzada la reversibilidad se vuelve más difícil e incluso en algunos casos no puede ser posible, esto debido a la sustitución del parénquima hepático por colágeno, lo que hace que la reversibilidad sea un desafío imposible (Toosi, 2015).

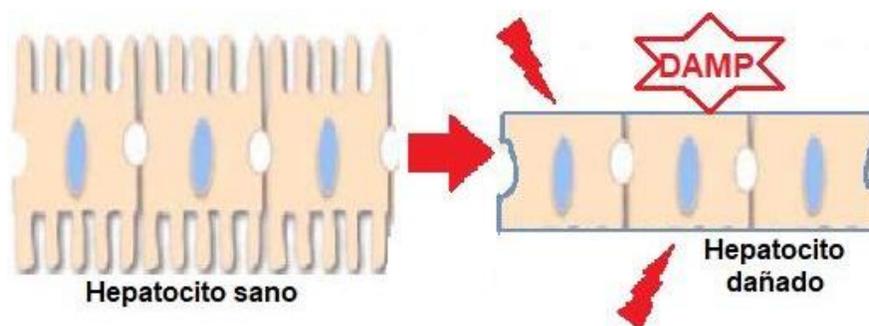
#### A) Células estelares hepáticas y su transformación a miofibroblasto:

Las células responsables de los procesos fibróticos constituyen del 5 al 10 % de las células totales del hígado (Khomich et al., 2019). En el hígado normal, las CEH se encuentran en un estado “quiescente” o “desactivadas” y cumplen algunas funciones fisiológicas que están relacionadas con el almacenamiento y metabolismo de la vitamina A, también secretan cantidades adecuadas de proteínas de la MEC como colágeno no fibrilar y laminina. Además, las CEH secretan enzimas proteolíticas degradativas llamadas metaloproteinasas de matriz (MMP), como MMP-1, que promueve la degradación de la MEC. De igual manera las CEH producen inhibidores tisulares de metaloproteinasas de matriz (TIMP), como el TIMP-1 y el TIMP-2 (Benyon & Arthur, 2001; Carloni et al., 1996; Geerts, 2001; Roeb et al., 1997; Yoneda et al., 2016). Una correcta interacción entre MMPs y TIMPs está asociada con la renovación de la matriz hepática y el mantenimiento de la homeostasis y arquitectura hepáticas (Murphy et al., 2002). Al presentarse daño hepatocelular se da la activación de las CEH, en donde se da su diferenciación a

miofibroblastos (MF), esto en respuesta a estímulos como las citoquinas y células inflamatorias (Friedman et al., 2013). Las citoquinas sobreproducidas actúan sobre los miofibroblastos para mantenerlos activados, lo que lleva a la producción de grandes agregados de MEC. Debido a todo lo anterior, podemos decir que las CEH activadas son las principales células del hígado fibrótico. En consecuencia, las CEH activadas son las células diana de los agentes antifibróticos (Chen et al., 2019).

B) Hepatocitos:

Los hepatocitos son la célula más abundante en el hígado, en el hígado sano constituyen aproximadamente el 80% de la población celular total (Si-Tayeb et al., 2010). En condiciones fisiológicas desempeñan una gran cantidad de funciones, entre las más conocidas están la desintoxicación de la sangre, la secreción de bilis, proteínas y lípidos (Wolf et al., 2014). En todas las enfermedades hepáticas se presenta muerte de hepatocitos (**Figura 5**), los hepatocitos muertos liberan compuestos intracelulares denominados patrones moleculares asociados a daños (DAMP) que envían señales a las células estelares hepáticas y a las células de Kupffer para su activación, por lo tanto, desempeñan un papel importante en el desarrollo de la fibrosis y la inflamación (Gaul et al., 2021).



**Figura 5. Papel de los hepatocitos en la fibrosis hepática.** Las enfermedades hepáticas dañan directamente a los hepatocitos, ante esta situación estas células liberan patrones moleculares asociados a daño (DAMP) los cuales están involucradas en la activación de las CEH y el desarrollo de fibrosis.

### C) Células inflamatorias:

Una característica de las enfermedades hepáticas crónicas es la presencia de inflamación. Las células inflamatorias se activan por la liberación de señales (como las especies reactivas de oxígeno) de las células dañadas, algunas células inflamatorias son: macrófagos, linfocitos, células NK (Jaeschke, 2011).

Los macrófagos hepáticos o también conocidos como células de Kupffer juegan un papel importante, siendo los reguladores en el proceso de la fibrosis hepática (Wynn & Barron, 2010). En respuesta al daño hepático, una gran cantidad macrófagos son reclutados en el hígado, dándose una liberación de citoquinas y atrayendo células NK y otras células inmunes. También se conoce que las células de Kupffer secretan el TGF- $\beta$ 1 y la PDGF que favorecen a la transdiferenciación de las CEH a MF (Karlmark et al., 2009; Reid et al., 2016). Los macrófagos hepáticos no solo pueden aliviar la inflamación y la fibrosis degradando la MEC, sino que también promueven la fibrosis hepática mediante la activación de las CEH (Duffield et al., 2005; Tacke & Zimmermann, 2014).

Las células NK en la enfermedad hepática crónica, cumplen una función proinflamatoria, reclutan neutrófilos y células mieloides, y promueven la activación de las CEH, lo que lleva a necrosis de hepatocitos, fibrosis e incluso carcinoma hepatocelular (CHC) (Jin et al., 2011; Wolf et al., 2014).

### D) Células endoteliales sinusoidales hepáticas:

En el tejido hepático normal, las células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC) favorecen a la homeostasis hepática, ya que tienen características vasodilatadoras, antiinflamatorias, antitrombóticas, antiangiogénicas y antifibróticas (Ding et al., 2010). Las LSEC son la principal fuente de óxido nítrico (NO) derivado del endotelio, que mantiene a las CEH en estado de reposo. En presencia de lesiones hepáticas, las CEBs se capilarizan, lo que no sólo puede reducir la producción de vasodilatadores sino también aumentar la producción de vasoconstrictores. Este desequilibrio no solo altera el fenotipo de las LSEC, sino que también contribuye a la activación de las CEH y promueve la inflamación y la fibrosis hepática (Deleve et

al., 2008; Xie et al., 2012; Poisson et al., 2017). También secreta TGF- $\beta$ , que pueden activar las CEH de forma paracrina y autocrina. Debido a las propiedades únicas de las LSEC, la terapia selectiva dirigida a LSEC parece ser una estrategia atractiva para el tratamiento de la fibrosis hepática (Gracia Sancho et al., 2021).

## **2.4 Características clínicas y diagnóstico de la fibrosis hepática**

### *a) Sintomatología de la fibrosis hepática*

Si hablamos de sintomatología, algo que vuelve peligrosa a esta enfermedad es la carencia de síntomas y que incluso suele pasar desapercibida en etapas temprana y avanzadas de fibrosis, no es hasta que el paciente sufre de cirrosis hepática que comienzan a presentarse las complicaciones en la salud debido a la pérdida de la funcionalidad hepática. Por lo tanto, cuando un paciente sufre una enfermedad hepática, es importante identificar si se encuentra en la etapa cirrótica o no, ya que de esto dependerá la eficacia del tratamiento (Wiegand & Berg, 2013). Sin embargo, no en todos los casos la fibrosis hepática pasa desapercibida, esta puede presentar sintomatología como: ictericia, pérdida de peso, encefalopatía portosistémica, fatiga e incluso sangrado digestivo.

### *b) Métodos de diagnóstico de la fibrosis hepática*

Como ya vimos, la gran mayoría de veces la fibrosis hepática no presenta síntomas de alerta haciendo que su diagnóstico pueda complicarse. Un historial clínico completo, chequeos rutinarios e incluso atender a la sospecha de sufrir una enfermedad hepática son puntos importantes para identificar la fibrosis de forma precoz (Shiple et al., 2019). Para el diagnóstico de la fibrosis hepática, el método estándar de oro sigue siendo la biopsia hepática; que consiste en la obtención de tejido hepático, para su posterior análisis en el microscopio, se puede utilizar algunas tinciones útiles para teñir las células e identificar la sobreproducción de las proteínas de la matriz extracelular. Los métodos de tinción más comunes para la evaluación de la fibrosis hepática son la tinción con hematoxilina-eosina, tricrómica de Masson o la tinción con rojo Sirio (Lo & Kim, 2017). Sin embargo, al ser un método invasivo puede generar dolor y riesgo de posibles complicaciones, por lo

que la biopsia hepática sólo se recomienda cuando el diagnóstico es incierto según la evaluación clínica o bioquímica y radiológica (Lucero & Brown, 2016; Wiegand & Berg, 2013).

En la práctica clínica se utilizan cada vez más métodos no invasivos para evaluar el estadio de la fibrosis hepática. Los métodos de imagen son de los más comunes, teniendo la elastografía mediante tecnología de ultrasonido y la resonancia magnética. La elastografía es un método preciso y recomendado para utilizarse en el diagnóstico de la fibrosis hepática, esta técnica utiliza ondas sonoras para crear imágenes del hígado, sin embargo, la precisión de la elastografía es limitada en pacientes obesos. La elastografía por resonancia magnética utiliza la propagación de ondas mecánicas para evaluar la rigidez del tejido y también se puede utilizar para evaluar la hipertensión portal y la rigidez del bazo simultáneamente (Schambeck et al., 2023; Taru et al., 2023).

Debido al riesgo de la biopsia hepática y a los altos costos de la elastografía, muchas personas eligen la utilización de marcadores serológicos como método de diagnóstico de fibrosis hepática, estas enzimas son marcadores indirectos de fibrosis hepática y reflejan si el hígado sufre daño, así como alteración en la función hepática. Las enzimas más importantes para el diagnóstico de la fibrosis hepática son las siguientes:

**Aminotransferasas:** En este grupo tenemos a la aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT). Todas las enfermedades hepáticas causan daño hepatocelular, lo que provoca un marcado aumento de la actividad de estas enzimas en el suero sanguíneo. Entre estas dos, la ALT es la enzima más específica para la agresión hepática (Giannini et al., 2003).

**Fosfatasa alcalina (ALP):** La elevación en los niveles de esta enzima, tiende a ser más notable en la obstrucción del tracto biliar y pueden aumentar de 10 a 12 veces el límite superior de referencia. **Gamma glutamil transpeptidasa (GGT):** La elevación de los niveles de GGT funge como un indicador de enfermedad hepática independientemente de la causa (Kwo et al., 2017).

### 3.- Antecedentes

#### 3.1 Tratamientos empleados para fibrosis hepática

Actualmente no hay fármacos específicos aprobados para el tratamiento de la fibrosis hepática, algunas modalidades de tratamiento están centradas en la eliminación control de los factores etiológicos, por ejemplo, se tiene a la terapia antiviral para pacientes con hepatitis vírica, el zinc para la enfermedad de Wilson, la flebotomía para la hemocromatosis, la abstinencia de alcohol para la enfermedad hepática alcohólica y el ácido ursodesoxicólico (UDCA) en el tratamiento de la colangitis biliar primaria (Powell y Klatskin, 1968; Marcellini et al., 2005; Takahashi et al., 2014; Bardou-Jacquet et al., 2020; Ye et al., 2020). También se ha demostrado gradualmente que los glucocorticoides, la vitamina E y los antagonistas de los receptores de angiotensina tienen efectos antifibróticos (Tabla 1).

**Tabla 1. Fármacos empleados en el tratamiento de la fibrosis hepática de distintas etiologías**

<b>Agente</b>	<b>Blanco antifibrótico</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Referencia</b>
Glucocorticoides	CEH Linfocitos	Reducción de la transmisión de factores de crecimiento transformantes. Debilitamiento de la actividad de las células estelares hepáticas. Inhibición de la proliferación de linfocitos.	(Bolkenius et al., 2004; Czaja, 2014)
Curcumina	Inflamación celular y respuesta inflamatoria	Bloqueo de la transición epitelio-mesénquima de los hepatocitos. Inhibición de la activación de las células de Kupffer. Inhibición de la regulación NF-κB y reducción de la angiogénesis sinusoidal.	(Iwaisako et al., 2014; Kong et al., 2020; Zhao et al., 2018)
Pioglitazona		Un agonista del receptor PPARγ	(Musso et al., 2017)
Ácido obeticólico		Un agonista de FXR, el FXR expresado en las células	(Mudaliar et al., 2013)

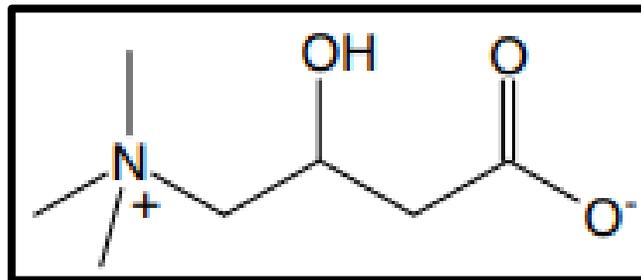
		estrelladas hepáticas tiene un efecto antifibrótico	
Nilotinib		Inhibición de la TK, la activación de la TK transforma las CEH en activas.	(Shaker et al., 2013)
Vitamina E	ROS	Efectos antioxidantes	
Losartan/ Candesartan	Receptor AT1	Bloqueando o atenuando el papel de la angiotensina II. La angiotensina II puede ejercer efectos profibróticos,	(Kim et al., 2012)
Antivirales de acción directa	VHC		
Análogos de nucleótidos	VHB	Supresión vírica (posible eliminación o pérdida sostenida del antígeno de superficie de la hepatitis B)	(European Association for the Study of the Liver (EASL) et al., 2016)
ácido ursodesoxicólico	Colangitis biliar primaria	Disminución de la lesión hepática, alivio de los síntomas; reducción de la hipertensión portal	(Wiencke & Boberg, 2011)

En la actualidad en el ámbito clínico no se han aprobado agentes antifibróticos que sean capaces de eliminar o reducir la fibrosis hepática (Shiple et al., 2019), pero se postulan varios blancos potenciales; disminución de las citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF), ausencia de señalización de TGF- $\beta$ , inactivación de CEH; inactivación de CEH; disminución de proteínas de MEC; elevación de metaloproteasas de matriz (Kisseleva & Brenner, 2021). Por lo tanto, es importante retomar la investigación referente a nuevas alternativas que sean viables y seguras para el tratamiento de la fibrosis hepática.

### 3.2 $\beta$ - Hidroxifosfocarnitina:

#### 3.2.1 L-carnitina en el tratamiento de enfermedades hepáticas

La carnitina es un aminoácido no esencial que posee dos estereoisómeros: L-carnitina y D-carnitina, de estas solo la L-carnitina tiene la capacidad de ser bioactiva (Almannai et al., 2019; Malaguarnera, 2012). Debido a estas características, la L-carnitina también se le conoce solo como "carnitina" (Adeva-Andany et al., 2017). Esta molécula (**Figura 6**) es biosintetizada en el hígado, riñón y cerebro a partir de la lisina y metionina (Pekala et al., 2011). El cuerpo humano contiene aproximadamente 300 mg/kg de L-carnitina, de estos un 98% es intracelular y se encuentra presente en distintas partes del cuerpo como en los músculos, en el tracto gastrointestinal y en el hígado (Adeva-Andany et al., 2017).



**Figura 6.** Estructura química de la L-carnitina

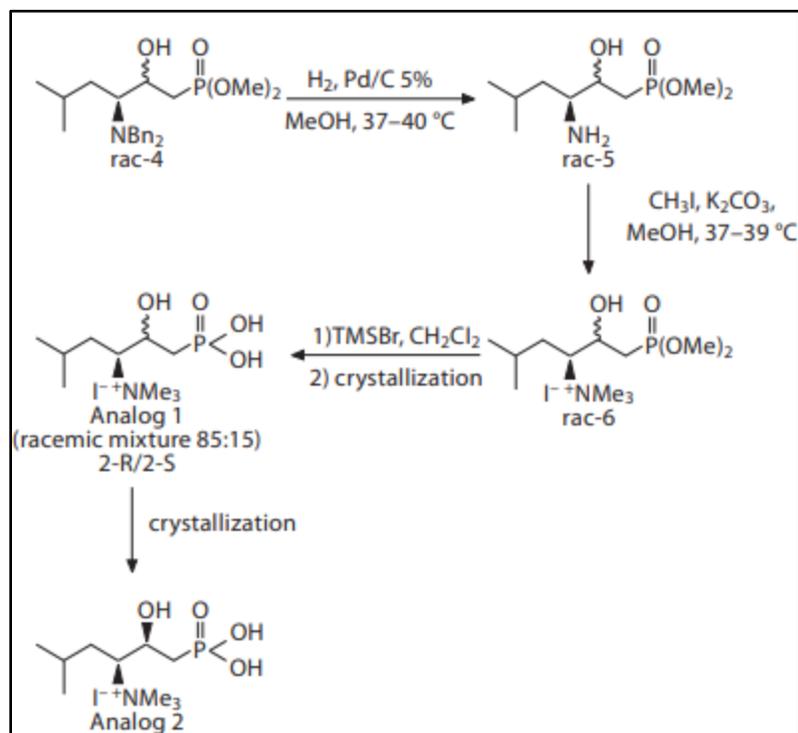
Por otro lado, L-carnitina cumple con varias funciones dentro del cuerpo humano, entre ellas tenemos: su implicación en la reducción del estrés oxidativo, en la resistencia a la insulina, en la expresión de citocinas proinflamatorias y en el transporte de ácidos grasos a la mitocondria para la obtención de energía (Almannai

et al., 2019; Malaguarnera, 2012). Interesantemente, normalmente los pacientes que sufren alguna enfermedad hepática crónica son propensos a padecer deficiencia de carnitina, que se asocia con la producción de factores inflamatorios, provocando la lesión y muerte de las células hepáticas (Li et al., 2015; Muriel & Gordillo, 2016; Serviddio et al., 2008). En los últimos años, diferentes estudios han demostrado que la suplementación con L-carnitina exógena, mejora de manera considerable la función hepática en distintas enfermedades hepáticas (Musso et al., 2010).

El potencial efecto hepatoprotector postula a la L-carnitina como una opción viable en el tratamiento de enfermedades hepáticas, sin embargo, existe un inconveniente con la carnitina exógena y es que no posee características farmacológicas favorables para su utilización, especialmente por su baja biodisponibilidad siendo de apenas el 20%. Por lo que se ha trabajado en la búsqueda de análogos que puedan mejorar sus propiedades farmacológicas y a su vez conservar efecto hepatoprotector; se han sintetizado varios análogos de la L-carnitina, siendo los análogos fosforados de aminoácidos naturales, los más adecuados para su evaluación (Jain & Williams, 2001; Mingorance et al., 2011; Westin et al., 2008).

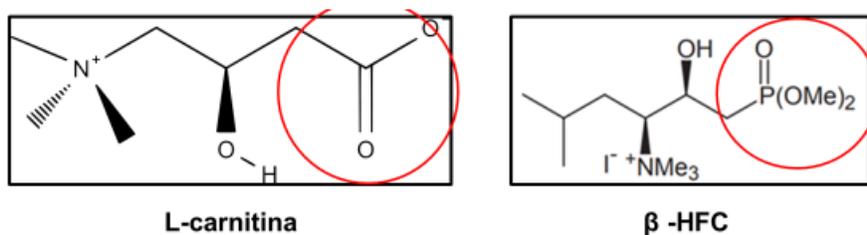
### **3.2.2 $\beta$ - Hidroxifosfocarnitina ( $\beta$ -HFC) un análogo de la L-carnitina**

En la búsqueda de análogos que pudieran mejorar las propiedades farmacológicas de la L-carnitina se obtuvo la  $\beta$ - Hidroxifosfocarnitina (Figura 7), la cual fue sintetizada por la empresa Nucitec S.A. de C.V., (Cordero et al., 2013).



**Figura 7.** Síntesis representativa de  $\beta$ -Hidroxifosfocarnitina

La  $\beta$ -HFC es un análogo de la L-carnitina, en el cual se sustituyó el ácido carboxílico por un fosfodiéster de la estructura original (**Figura 8**) (Gómez-Solís et al., 2011). Actualmente, varios estudios han evaluado las propiedades farmacocinéticas, así como la eficacia y seguridad de la  $\beta$ -HFC a nivel preclínico.



**Figura 8.** Cambios estructurales entre L-carnitina y  $\beta$ -HFC

### **3.2.3 Propiedades farmacológicas de $\beta$ -HFC**

Se tiene información previa sobre las propiedades farmacocinéticas de  $\beta$ -HFC tras su administración oral en ratas y conejos (Reyes-Esparza et al., 2014). Estos resultados mostraron una mayor eficacia de la  $\beta$ -HFC; tras su administración por vía oral en una dosis de 100 mg/kg dio lugar a concentraciones plasmáticas totales que superaron el rango de referencia de L -carnitina en ratas.  $\beta$ -HFC produjo una biodisponibilidad relativa estimada de más del 60%, este es un valor muy por encima de la reportada por L-carnitina en ratas. Los resultados indicaron que  $\beta$ -HFC tiene una mejor tasa de absorción, distribución y eliminación que la L -carnitina.

En relación a su eficacia farmacológica,  $\beta$ -HFC en una dosis de 100 mg/kg administrado por 14 semanas redujo significativamente los niveles de colesterol y triglicéridos en el suero y el hígado de ratas obesas; el mismo efecto se observó incluso en el hígado de ratas delgadas. Además, demostró una reducción importante de la esteatosis, que fue acompañada de una mejora de la arquitectura hepática y una reducción de las enzimas hepáticas en ratas Zucker fa/fa obesas.

### **3.2.4 Estudios toxicológicos realizados a $\beta$ -HFC**

Una vez evaluada la actividad farmacológica de la  $\beta$ -HFC, era necesario conocer la seguridad en su administración. Debido a esta incógnita fue preciso la realizaron estudios toxicológicos para identificar la toxicidad aguda y crónica la  $\beta$ -HFC (Jorge et al., 2016).

#### **A) Toxicidad aguda:**

Se aplicó  $\beta$ -HFC en grupos de animales en un procedimiento escalonado utilizando las dosis fijas de 5, 50 300, 5000 y 9000 mg/kg.  $\beta$ -HFC se administró una vez por vía oral a ratones, estos debían tener un previo ayuno de 18 h. Posterior a la aplicación, los roedores estudiados se mantuvieron en observación en busca de signos de toxicidad durante las primeras 24 h. Los resultados mostraron que todas las dosis administradas fueron bien toleradas por los animales, destacando que no se encontraron signos de toxicidad, por lo que todos los animales sobrevivieron, incluso el que recibió la dosis mas alta.

### Toxicidad crónica:

Se aplicaron dosis repetidas de  $\beta$ -HFC durante 24 semanas, se dividieron los animales en dos grupos, cada uno de ellos compuesto por 10 ratas. El grupo de control recibió una dieta controlada y agua, el grupo tratado recibió  $\beta$ -HFC 100 mg/kg de peso corporal/día p.o. en 500  $\mu$ L de agua. Todos los tratamientos se realizaron por 5 días a la semana durante 24 semanas.

Los resultados observados en este estudio no mostraron signos de toxicidad tras la administración de una dosis única ni tras la administración de dosis repetidas durante un plazo de 24 semanas, teniendo una DL50 > 9000 mg/Kg. Los estudios de toxicidad a dosis múltiples no mostraron alteraciones en ninguno de los parámetros analizados, sugiriendo que este fármaco podría utilizarse con seguridad en tratamientos a largo plazo.

### B) Estudios de embriotoxicidad y teratogenicidad:

Para estos estudios se utilizaron huevos de gallina fértiles, un total de 36 huevos que se dividieron en 6 grupos: el primer grupo sirvió de control y se consideró el control negativo. Los otros grupos recibieron  $\beta$ -HFC en diferentes concentraciones (60  $\mu$ g/mL, 120  $\mu$ g/mL, 240  $\mu$ g/mL y 480  $\mu$ g/mL) y el último grupo recibió cafeína (10 mg/mL) y se consideró el control positivo. Los resultados mostraron que durante la primera etapa (48 h de incubación), la  $\beta$ -HFC indujo un desarrollo embrionario acelerado; durante la última etapa (21 días de incubación), retrasó el desarrollo embrionario. Sin embargo, el  $\beta$ -HFC no causó malformaciones en los embriones. Este estudio demostró que la  $\beta$ -HFC no era teratogénica, pero si reducía el desarrollo de los pollos.

## **3.3 Evaluación del efecto de fármacos sobre la fibrosis hepática**

A lo largo del tiempo se han evaluado varias moléculas respecto al efecto que estas tienen sobre la fibrosis hepática, esto debido a la búsqueda de nuevas terapias efectivas contra la fibrosis hepática. Puntos clave en la búsqueda de agentes antifibróticos es la inhibición de la activación de las CEH y la disminución de las

fibras de colágeno. A continuación, se mencionan algunos trabajos realizados sobre los marcadores más significativos de la fibrosis hepática:

A) Efecto de la genisteína sobre la activación de células estelares hepáticas en un modelo de inducción de fibrosis hepática:

Se analizó el efecto de la genisteína sobre la fibrosis hepática (Leija Salas et al., 2007), para ello utilizaron el modelo de inducción a fibrosis similar: Se utilizó CCl<sub>4</sub> para inducir la hepatotoxicidad, en una dosis de 1,5 ml/kg diluido en aceite mineral, la administración fue intraperitoneal, 3 veces por semana durante 8 semanas. Los animales con fibrosis inducida mostraron degeneración de hepatocitos y aumento del infiltrado inflamatorio en las áreas necróticas y también desarrollaron fibrosis severa con distorsión completa de la arquitectura lobular. Los resultados mostraron que el tratamiento con genisteína redujo el colágeno en el hígado y también mejoró la función hepática. Al observar las fotografías tomadas en el microscopio electrónico, tenemos que existe una reducción en el número de CEH en el hígado inducido a fibrosis tratado con genisteína a comparación del no tratado. Estos resultados se asociaron

B) Efecto de D-carvona sobre la arquitectura hepática en un modelo de fibrosis hepática:

Se evaluó el efecto de D-carvona en la fibrosis hepática en un modelo de inducción con CCl<sub>4</sub> (Ogaly et al., 2022). La D-carvona es un monoterpeno natural que abunda en el aceite esencial de plantas aromáticas como la alcaravea y la menta verde. Los resultados mostraron que la administración de D-carvona mejoró significativamente las funciones hepáticas y también mejoró la arquitectura hepática. Estas mejoras se asociaron con la disminución de la fibrosis hepática. Los resultados antes mencionados revelan que D-carvona y sugieren que la D-carvona podría ser un candidato prometedor para la intervención terapéutica de la fibrosis y otras enfermedades hepáticas relacionadas con el estrés oxidativo.

C) Acción de  $\beta$ -HFC sobre marcadores de fibrosis y esteatohepatitis no alcohólica:

Se tiene evidencia que la administración de  $\beta$ -HFC modificó marcadores asociados a fibrosis hepática y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) en un modelo de inducción de daño hepático con  $\text{CCl}_4$  acompañado de un suministro en exceso de lípidos, este trabajo fue realizado en el laboratorio 6 de la facultad de farmacia perteneciente a la UAEM (Sánchez-Quevedo et al., 2022).

Los resultados mostraron que el tratamiento con  $\beta$ -HFC logró una reducción marcada de la expresión de la proteína  $\alpha$ -SMA, relacionándose directamente con la disminución de la activación de las células estelares hepáticas. Este estudio sugiere que  $\beta$ -HFC podría emplearse en el tratamiento de la EHNA.

### **3.4 Modelos de fibrosis hepática inducida**

Como hemos visto la fibrosis hepática es un proceso común que se produce en respuesta a distintos tipos de lesiones hepáticas. Se sabe que el uso y exposición a algunos agentes tóxicos o fármacos pueden causar lesiones en el hígado, la fibrosis hepática química es inducida por sustancias químicas que causan hepatotoxicidad.

En la investigación de la fibrosis, el trabajo experimental en roedores es actualmente el patrón oro para confirmar un mecanismo propuesto asociado a la enfermedad. Los sistemas de lectura de las alteraciones hepáticas son similares, y a veces incluso idénticos, en humanos y animales, e incluyen análisis de sangre, biopsias y técnicas de imagen no invasivas (Liedtke et al., 2013). En estos modelos las células hepáticas se dañan y, en consecuencia, se reparan, lo que resulta en el crecimiento anormal del tejido conectivo en el hígado. Los modelos de lesión hepática inducida por sustancias químicas generalmente se inyectan por vía intraperitoneal, lo que es relativamente fácil de realizar y da como resultado un desarrollo estable para su uso en estudios relacionados con la fibrosis hepática clínica (Bao et al., 2021).

A) Fibrosis hepática inducida con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>):

Desde hace ya muchos años se sabe que el tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) es una sustancia capaz de ser muy tóxica. CCl<sub>4</sub> es reconocido por tener características que lo hacen adecuado como agente modelo para estudiar la hepatotoxicidad. Estas características incluyen su fácil disponibilidad en forma pura, la reproducibilidad de sus efectos sobre el hígado en diferentes especies y la diversidad de efectos que puede producir en condiciones apropiadas.

La fibrosis hepática inducida por CCl<sub>4</sub> es un modelo experimental ampliamente utilizado para el estudio de la fibrosis hepática y para la investigación clínica de fármacos porque causa muchas alteraciones en el metabolismo del colágeno similares a las alteraciones en seres humanos (Afdhal & Nunes, 2004). Dosis repetidas de CCl<sub>4</sub> pueden provocar la aparición de cirrosis y, en determinadas condiciones, de tumores hepáticos (Slater et al., 1997). La administración de CCl<sub>4</sub> en ratones o ratas es el modelo más utilizado de fibrosis hepática experimental inducida por toxinas (Liedtke et al., 2013). El tratamiento con CCl<sub>4</sub> provoca la activación de las CEH, seguida de la deposición de MEC y el desarrollo de fibrosis hepática altamente reproducible después de 4 a 6 semanas desde la primera inyección de CCl<sub>4</sub>. El citocromo P450 2E1 (CYP2E1) en los hepatocitos centrilobulares metaboliza el CCl<sub>4</sub> para generar radicales tóxicos triclorometil (CCl<sub>3</sub>), que promueven la necrosis hepática (Slater, Cheeseman e Ingold, 1985). Curiosamente, la interrupción del tratamiento con CCl<sub>4</sub> provoca la regresión completa de la fibrosis hepática (Iredale et al., 1998; Kisseleva et al., 2012).

Es un veneno hepático típico, daña directamente las células hepáticas (principalmente células endoteliales y células del parénquima hepático en la región de la vena porta hepática) al alterar la permeabilidad de los lisosomas y las membranas mitocondriales (Weber et al., 2003), la toxicidad clásica CCl<sub>4</sub> es inducir lesión y fibrosis hepática (Dong et al., 2016). El mecanismo de la hepatotoxicidad inducida por CCl<sub>4</sub>, especialmente la necrosis y el hígado graso, ha sido durante mucho tiempo un tema desafiante para muchos investigadores de diversos campos en los últimos 50 años. Aunque los mecanismos de los daños tisulares son

diferentes entre las sustancias químicas y los tejidos afectados, el CCl<sub>4</sub> desempeña un papel clave en la lesión tisular (Gaul et al., 2021).

*B) Fibrosis hepática inducida con dietilnitrosamina (DEN)*

La toxicidad de varias nitrosaminas en animales y humanos está bien establecida, se sabe que pequeñas cantidades de DEN pueden causar lesiones hepáticas graves en un lapso de 7-18 semanas (Dong et al., 2016; Jo et al., 2020). La administración de DEN provoca como consecuencia una deposición excesiva de proteínas de la MEC en el hígado, por lo que, es un inductor apropiado para el estudio de la fibrosis hepática (George & Chandrakasan, 1996).

El DEN, también es un carcinógeno que provoca estrés oxidativo significativo y mutaciones del ADN, aumenta la lipotoxicidad y acelera la progresión de la fibrosis y la cirrosis. La administración única de DEN, 6 días por semana durante 15 semanas logró la aparición de fibrosis hepática en roedores, confirmando que la utilización de DEN es extremadamente eficaz en la inducción de fibrosis hepática, cirrosis y cánceres, provocando la pérdida de la función hepática (Yan et al., 2022).

#### 4.- Justificación

Las enfermedades hepáticas crónicas se han convertido en un problema importante de salud a nivel mundial, por la gran cantidad de factores que predisponen a la población a poder padecerlas. Normalmente este tipo de enfermedades pasan desapercibidas ya que no generan una sintomatología considerable, lo cual es un problema para su diagnóstico y correcto tratamiento.

Cabe destacar, que todas estas enfermedades hepáticas crónicas resultan en la formación de fibrosis hepática, que, si bien en un estadio temprano puede ser reversible, en la mayoría de los casos se detecta en estadios avanzados que imposibilita su correcto manejo. Esta evolución de la fibrosis avanzada puede llegar a su última fase que es conocida como “cirrosis hepática” caracterizada por la pérdida de la funcionalidad del hígado que puede ser mortal.

En la actualidad no hay tratamientos que sean efectivos y específicos contra la fibrosis hepática, los fármacos que son recomendados para tratar esta enfermedad son enfocados en la eliminación del agente causal de la lesión, más no en actuar sobre el mecanismo de la fibrosis.

Por lo anterior, se continúan desarrollando proyectos de investigación para evaluar alternativas en el tratamiento de la fibrosis hepática. Varios estudios postulan el potencial efecto de la L-carnitina sobre diversas enfermedades hepáticas,  $\beta$ -HFC es un análogo de la L-carnitina que conserva su efecto terapéutico, acompañado de mejores características farmacocinéticas a su antecesor, así como de un margen de seguridad elevado.

## **5.- Hipótesis**

La  $\beta$ -HFC reduce la fibrosis hepática en ratas Wistar macho.

## **6.- Objetivo general**

Evaluar el efecto de  $\beta$ -HFC en la fibrosis hepática inducida en un modelo *in vivo*

### **6.1.- Objetivos específicos**

- Evaluar si la  $\beta$ -HFC reduce las fibras de colágeno en el hígado de ratas con fibrosis hepática mediante tinción tricrómica de Mason.
- Evaluar si la  $\beta$ -HFC reduce las células estelares hepáticas mediante microscopía electrónica de transmisión.
- Analizar el efecto de  $\beta$ -HFC en la morfología hepática en ratas con fibrosis hepática mediante tinción H&E.
- Evaluar si la  $\beta$ -HFC modifica las enzimas marcadores de daño hepático en ratas con fibrosis hepática mediante la cuantificación de enzimas hepáticas.

## 7.- Métodos

### A) Material de ensayo y animales

$\beta$ -HFC se obtuvo de NUCITEC S.A. de C.V. (Qro., México). Para su administración se disolvió en agua desionizada las cantidades dependían de la dosis y cantidad a emplear. Para este modelo se decidió utilizar ratas Wistar macho todas ellas en edad adulta. Durante la primera semana los animales se aclimataron en condiciones controladas y se le dio una alimentación a base de pellets y agua potable. Los animales fueron tratados de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

### Modelo de fibrosis hepática inducida en ratas

Se eligió un total de 16 ratas las cuales fueron divididas en 4 grupos (**Fig. 9**):

1. **Control:** animales sin tratamiento (n=4)
2.  **$\beta$ -HFC:** ratas a las que solo se les administró el fármaco ( $\beta$ -HFC), con el fin de confirmar que no exista hepatotoxicidad (n=4)
3. **Fibrosis:** ratas a las que se les indujo el daño hepático (n=4)
4. **Fibrosis+ $\beta$ -HFC:** ratas a las que se les indujo daño hepático acompañado de un tratamiento con  $\beta$ -HFC (n=4)

**n= 16**

Los animales del **grupo 1** no recibieron ningún tratamiento, estos fueron alimentados de manera normal con una dieta estándar a base de pellets y agua potable a libre demanda (ad libitum).

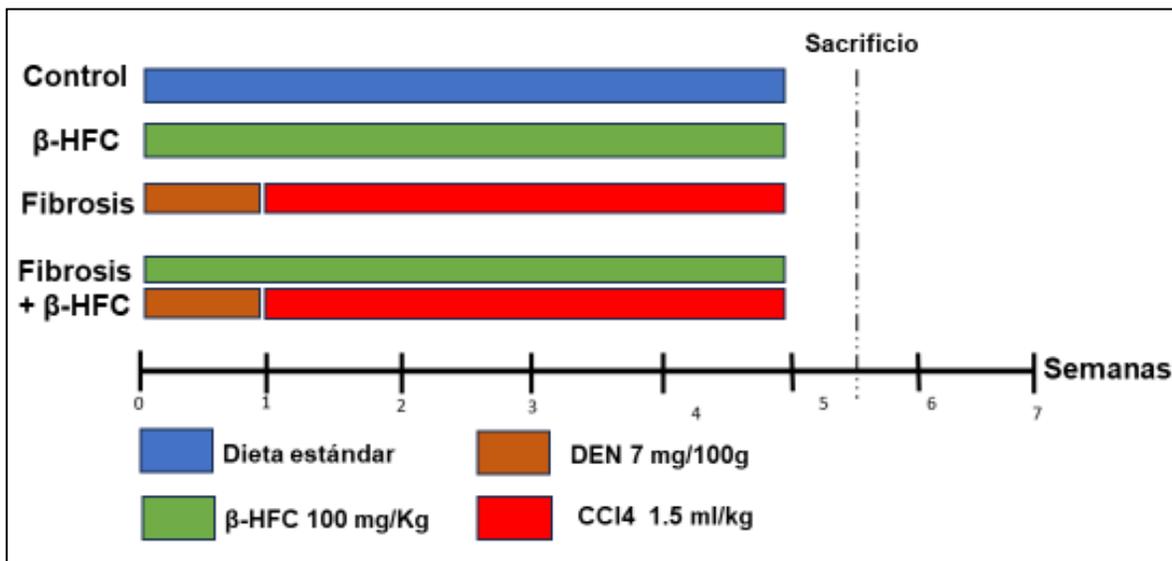
Las ratas pertenecientes al **grupo 2** fueron tratadas con  $\beta$ -HFC, este fármaco se suspendió en agua y se administró por vía oral a través de una cánula rígida en dosis de 100 mg/Kg. Cada dosis fue individualizada por peso de cada animal y ajustada semanalmente, el tratamiento con  $\beta$ -HFC se inició en la semana 3, y se administró durante las posteriores 4 semanas.

Para el grupo de daño hepático (**grupo 3**), se administró durante la primera semana (después de la semana de aclimatación) un tratamiento con Dietilnitrosamina (DEN) en una dosis de 7 mg por cada 100 gramos del animal, utilizando como diluyente o vehículo el PBS, este se aplicó dos veces a la semana por vía subcutánea. En la

siguiente semana se pauso el tratamiento con DEN y se sustituyó por CCl<sub>4</sub> al 30%, en una dosis de 1.5 ml/kg diluido en aceite de maíz, este se aplicó 2 veces a la semana por inyección subcutánea, y se llevó a cabo durante las posteriores 4 semanas. Ajustando la dosis por el peso de cada rata de manera semanal.

El tiempo total de inducción del daño hepático fue de 5 semanas. Una vez transcurridas estas 5 semanas, se consideró establecida la fibrosis hepática en las ratas estudiadas.

Finalmente, para el **grupo 4** se dio el mismo tratamiento que al **grupo 3**, con la diferencia de que a estas ratas se les aplicó simultáneamente la β-HFC en una dosis de 100 mg/Kg 5 veces por semanas durante las posteriores 4 semanas.



**Figura 9. Tratamiento aplicado en grupos experimentales.** La fibrosis hepática se indujo con DEN y CCl<sub>4</sub>, en la quinta semana se tuvo el daño deseado.

### Análisis histopatológico del hígado

Para el análisis histológico del tejido hepático se utilizó la técnica Tricrómica de Masson que nos permite observar fibras de colágeno, también se realizó la tinción de hematoxilina y eosina para poder observar la estructura del tejido y detectar cambios en la morfología hepática.

Para la tinción con **Tricrómica de Masson** el procedimiento fue el siguiente:

Se realizaron cortes al hígado de rata, de estos se obtuvieron cortes con un tamaño de 4 micrones, después estos se desparafinaron e hidrataron en agua destilada. Primero se fijó en solución de formaldehído y luego se realizó un montaje con líquido de Bouin durante 1 hora a 56-60 °C, se enfrió y lavó en agua destilada para quitar el color amarillo. Se realizó un teñido con hematoxilina férrica durante 10 minutos y se lavó en agua destilada durante 10 minutos. Luego se realizó teñido con la solución de escarlata fucsina ácida durante 2-5 minutos y se lavó con agua destilada. A continuación, se trató con la solución de ácido fosfomolibdico-fosfotungstico durante 10-15 minutos y luego se realizó el teñido con solución de azul de anilina 15 minutos. Se lavó en agua destilada, deshidrató, aclaró y montó en un portaobjeto.

Para la tinción con **hematoxilina-eosina** el procedimiento fue el siguiente:

Las muestras de hígado ya fijadas, incluidas en parafina y colocadas en portaobjetos se llevaron al tren de tinción, donde se quitó la parafina que estos pudieran tener en exceso, aplicando baños en xilol absoluto. Después se rehidrató la muestra con etanol absoluto posteriormente con etanol a diferentes concentraciones y por último con agua destilada (100, 95 y 80% etanol). El portaobjetos se tiñó en solución de hematoxilina de Mayer por un tiempo total de 8 minutos. Pasados los 8 minutos se lavó con agua corriente y se viró utilizando una solución de carbonato de litio. Lo que siguió fueron lavados con agua destilada para

después llevar el contraste con una solución de eosina por un tiempo de 2 minutos. Se repitió el proceso de deshidratación/aclaramiento. Por último, se realizó el montaje en resina sintética.

Tanto las histologías con TM y HE fueron observadas a aumentos de 10X y 40X. Se tomaron fotos representativas bajo un microscopio de luz (Olympus) y utilizando el analizador de imágenes Motic.

#### Análisis ultramicroscópico

Para el análisis ultraestructural, se fijaron bloques de tejido hepático (tejidos de 1 - 2 mm) con formaldehído al 4 % en buffer fosfato 0,1 mol/l (pH 7,2) durante 1 h, y se añadió OsO<sub>4</sub> al 1% para continuar la fijación (30 min a 27 °C y 30 min a 4 °C). Se deshidrato colocando concentraciones crecientes de alcohol etílico. Los bloques se incrustaron en resina epoxídica. Finalmente se cortaron secciones ultrafinas (80 nm) y se examinaron en el microscopio electrónico Libra 120 PLUS de la marca Zeiss utilizando el software Gatan Microscopy Suite.

#### Análisis de marcadores de daño hepático

Se obtuvo sangre por punción cardíaca y se colocó en un tubo rojo, posteriormente se centrifugó y obtuvo el suero, el cual se almacenó para cuantificar los niveles de:

- Alanina aminotransferasa (ALT)
- Aspartato aminotransferasa (AST)
- Fosfatasa alcalina (ALP)
- Gamma glutamil transferasa (GGT)

Todos estos se cuantificaron por colorimetría utilizando un kit comercial de reactivos de la compañía ELITech, México, siguiendo las especificaciones técnicas del proveedor. Finalmente se lee la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en un lector de placas (Victor X3 Multimode plate Perkin Elmer). Los valores obtenidos fueron agregados a una hoja de Excel y se reportaron.

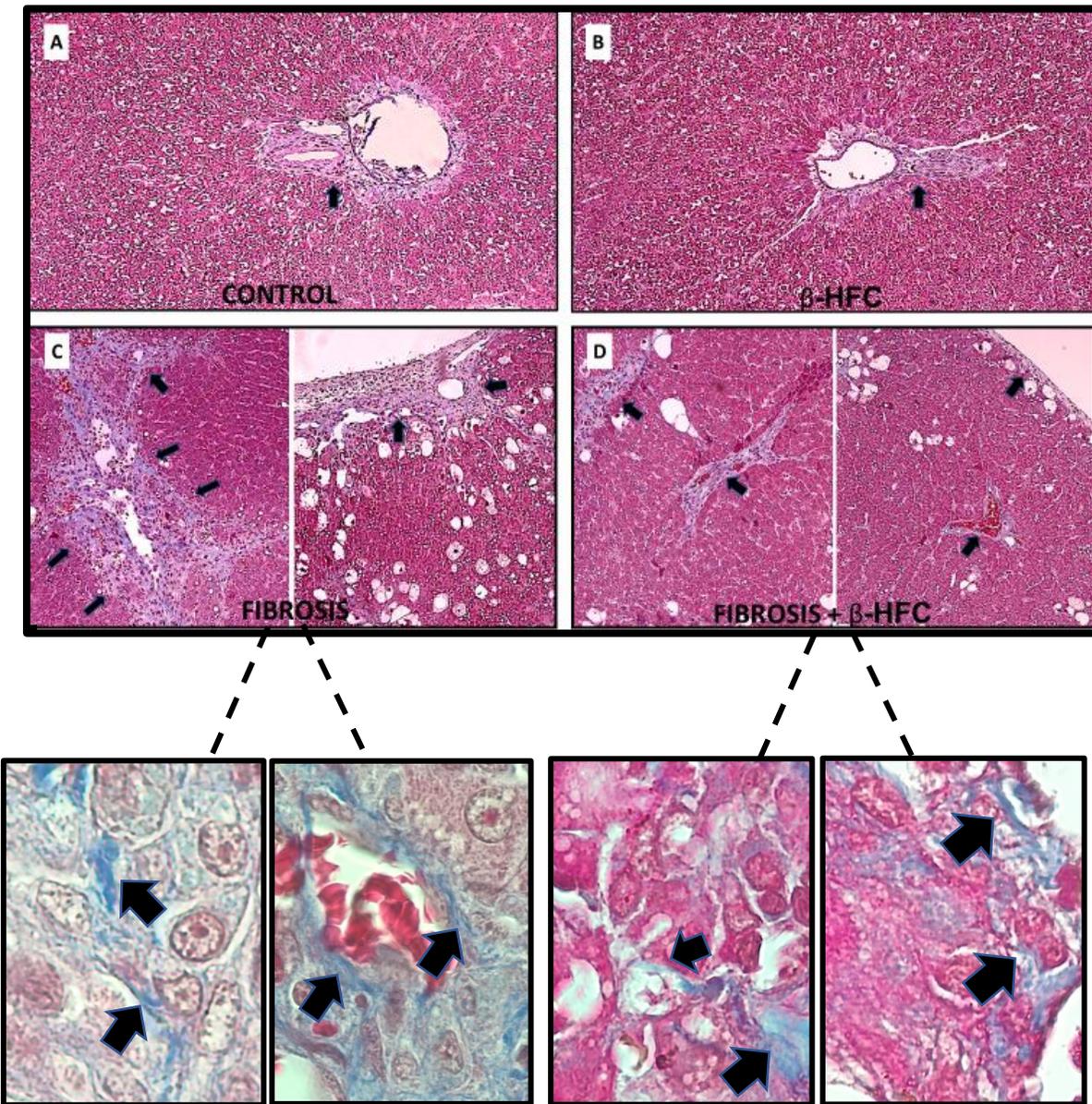
#### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía. Las diferencias individuales entre tratamientos se analizaron con la prueba post hoc de Tukey. Los resultados obtenidos se consideraron estadísticamente significativos cuando  $p < 0.05$ .

## 8. Resultados

### 8.1 Efecto de la $\beta$ -HFC sobre las fibras de colágeno en un modelo de fibrosis inducida *in-vivo*

En el presente proyecto evaluamos el efecto de la  $\beta$ -HFC en la fibrosis hepática, mediante la evaluación histológica de fibras de colágeno en tejido hepático teñido con la tinción tricrómica de Masson. Con esta técnica las fibras de colágeno se tiñen de color azul, permitiéndonos diferenciar las fibras de colágeno del resto de células hepáticas. En la **figura 10** podemos observar el efecto de  $\beta$ -HFC sobre la fibrosis hepática en los distintos grupos analizados. La figura 10**A** pertenece al grupo **control**, con los animales sin ningún tipo de tratamiento. En las muestras histológicas del hígado evaluadas en este grupo observamos una pequeña cantidad de tejido conectivo teñido en color azul que corresponde a fibras de colágeno rodeando los vasos sanguíneos, ubicación normal en tejido sano. En la figura 10**B**, observamos el tejido de una rata que fue tratada únicamente con la  $\beta$ -HFC, en este corte las fibras de colágeno se encuentran alrededor del vaso sanguíneo, muy similares al grupo control. En la figura 10**C**, observamos un corte histológico de animales con fibrosis hepática, se observa un aumento significativo o sobreproducción en las fibras de colágeno a lo largo del parénquima hepático indicando la presencia de fibrosis hepática. Finalmente, en la figura 10**D**, se observa que el tratamiento con  $\beta$ - produjo una disminución de la cantidad y extensión de las fibras de colágeno en el parénquima hepático de animales con fibrosis hepática. Estos resultados sugieren que la  $\beta$ -HFC reduce la producción de fibras de colágeno y disminuye la extensión del tejido conectivo asociados al desarrollo de fibrogénesis en ratas con fibrosis hepática inducida en un modelo *in vivo*.

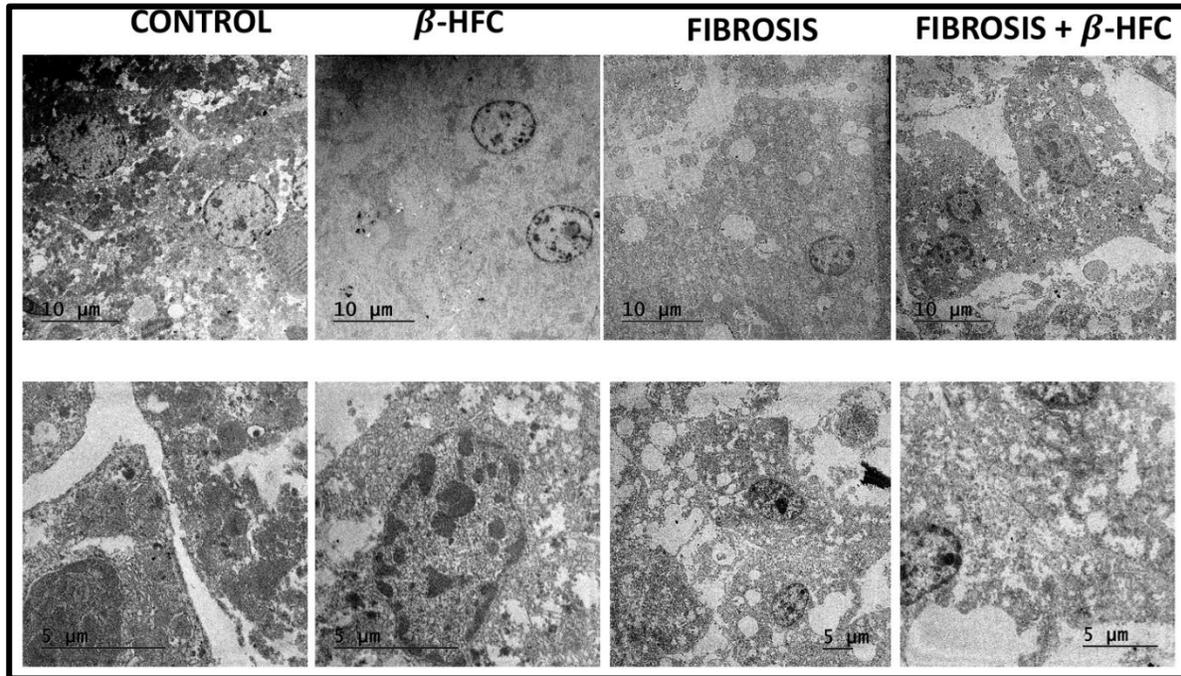


**Figura 10. Efecto de  $\beta$ -HFC sobre la fibrosis en ratas con daño hepático.** Cortes histológicos representativos de los grupos: **A)** Control, **B)**  $\beta$ -HFC, **C)** Fibrosis y **D)** Fibrosis +  $\beta$ -HFC. La fibrosis se puede observar en color azul (flechas) mientras que los hepatocitos se tiñen de color rosa. Tinción tricrómica de Masson. Amplificación 10X y 100 X.

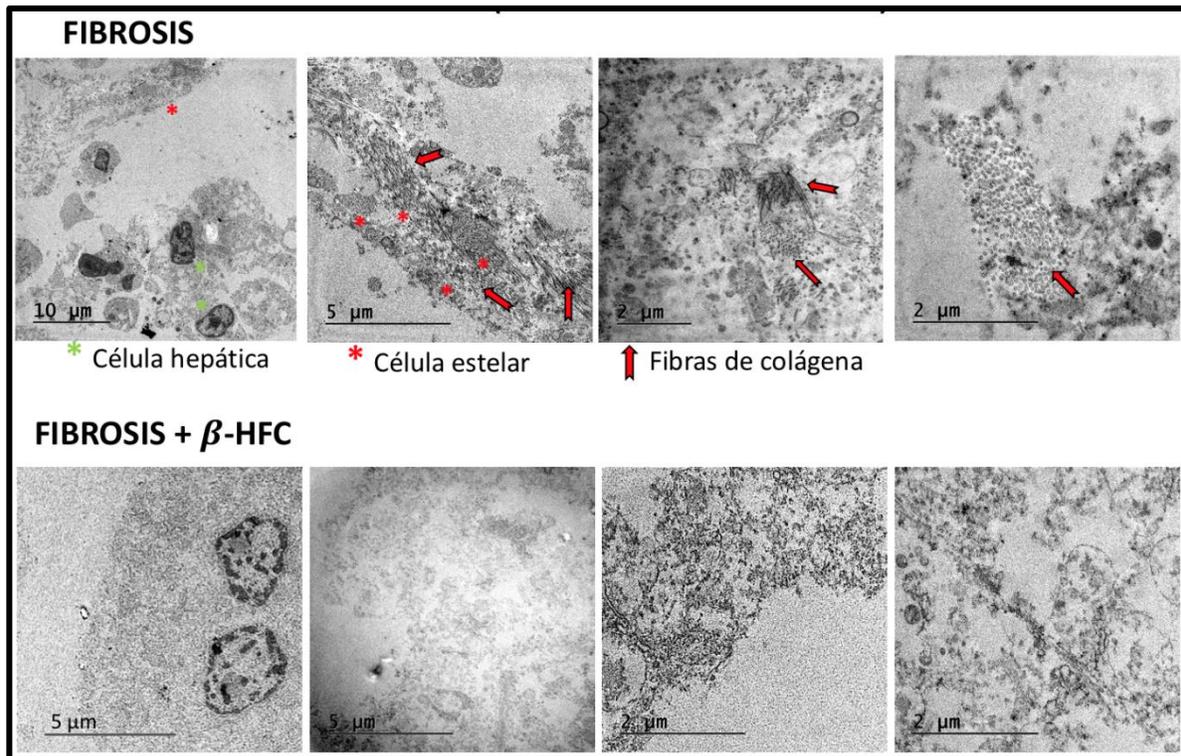
## 8.2 Efecto de $\beta$ -HFC sobre las células estelares hepáticas en un modelo de fibrosis hepática inducida *in-vivo*.

El daño crónico a los hepatocitos permite la activación de células estelares hepáticas (CEH), que inician el proceso de la fibrogénesis con la producción de colágeno fibrilar. Con la finalidad de evaluar el origen de las fibras de colágeno en nuestro modelo de fibrosis hepática inducida en ratas, analizamos la presencia de células estelares activadas (miofibroblastos), caracterizados por la presencia de forma alargada y fibrillas de colágena a su alrededor, la visualización se hizo mediante microscopía electrónica. En la **figura 11** se presentan imágenes tomadas a 650x y 2000x de áreas representativas del tejido hepático de los distintos grupos estudiados. Los hepatocitos mostrados en el grupo control y grupo de  $\beta$ -HFC no presentaron anomalías estructurales, en ellos se puede observar el tamaño y morfología normal nivel celular y nuclear sin la aparición de vacuolas. Los hepatocitos en el grupo con fibrosis hepática inducida por DEN/ $\text{CCl}_4$ , presentan notables cambios, así como aparición de vacuolas que se hacen notorias en estos aumentos.

Por otra parte, cada área fue analizada para cambios en la morfología de células estelares asociados con su activación y una sobreproducción de fibras de colágeno (figura 12). Cabe destacar que en los animales con fibrosis hepática inducida se pueden observar células estelares rodeadas de fibras de colágena, lo que indica su activación. Interesantemente,  $\beta$ -HFC permite una disminución importante de las fibras de colágena y reducción de la presencia de CEH activadas en las distintas zonas analizadas. Por lo tanto, estos resultados sugieren, que  $\beta$ -HFC disminuye la presencia de células estelares con una morfología asociada a su activación, reduciendo los niveles de fibras de colágena en ratas con fibrosis hepática inducida en un modelo *in vivo*.



**Figura 11. Efecto de la  $\beta$ -HFC sobre los hepatocitos.** Se presentan imágenes ultraestructurales representativas de los distintos grupos analizados. En las secciones pertenecientes al grupo **Control** y  **$\beta$ -HFC** podemos ver hepatocitos sanos, caracterizados por su tamaño, nula aparición de vacuolas en su interior y su núcleo en la parte central de la célula. En la sección del grupo con fibrosis detectamos hepatocitos dañados, estos presentan aumento de tamaño y acumulación de una gran cantidad de vacuolas dentro de ellos. Por último, en la sección del grupo de Fibrosis +  $\beta$ -HFC tenemos hepatocitos que presentan un menor daño a los observados en el grupo con Fibrosis. TEM Amplificación 650X y 2000X.

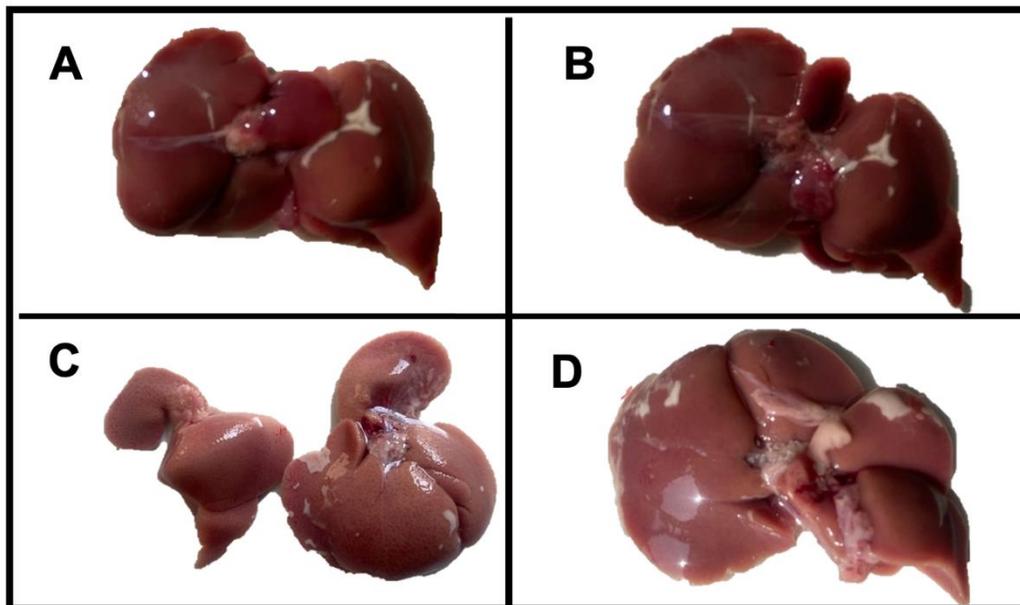


**Figura 12. Efecto de  $\beta$ -HFC sobre las células estelares.** La principal célula pro-fibrótica es la Célula estelar hepática. En la fibrosis estas células están activadas y sobre producen colágeno fibrilar. Por lo anterior, usualmente las CEH se encuentran en mayor cantidad en el hígado dañado. En la figura podemos detectar estas células en la sección perteneciente al grupo con fibrosis siendo marcadas por los asteriscos y rodeadas por fibras de colágena (Flechas). En el caso del grupo de Fibrosis +  $\beta$ -HFC, no se observan estas células e incluso se tiene una cantidad menor de fibras de colágena.

### 8.3 Efecto de la $\beta$ -HFC sobre la arquitectura hepática en un modelo de fibrosis inducida *in-vivo*

La administración de agentes exógenos al organismo puede causar hepatotoxicidad y por lo tanto provocar cambios estructurales tanto macroscópicos como microscópicos en el hígado. Para identificar estas alteraciones, analizamos los hígados en físico y en cortes teñidos con H&E en muestras de animales con fibrosis hepática. En la **figura 13** se presentan fotografías de hígados representativos de

los distintos grupos estudiados. Los hígados mostrados en los grupos control y tratados solo con  $\beta$ -HFC muestran características similares a las de un hígado “sano”, destacando su coloración rojiza y “viva”, así como su textura lisa y su tamaño normal sin señales de inflamación. Por otra parte, el hígado perteneciente al grupo con fibrosis hepática muestra una coloración más opaca, acompañado de un aumento de tamaño y una apariencia más “arrugada” a comparación de la figuras A y B. Finalmente en la figura D vemos que la  $\beta$ -HFC mantuvo la textura “lisa” del hígado, así como un tamaño y similar a la del tejido sano.

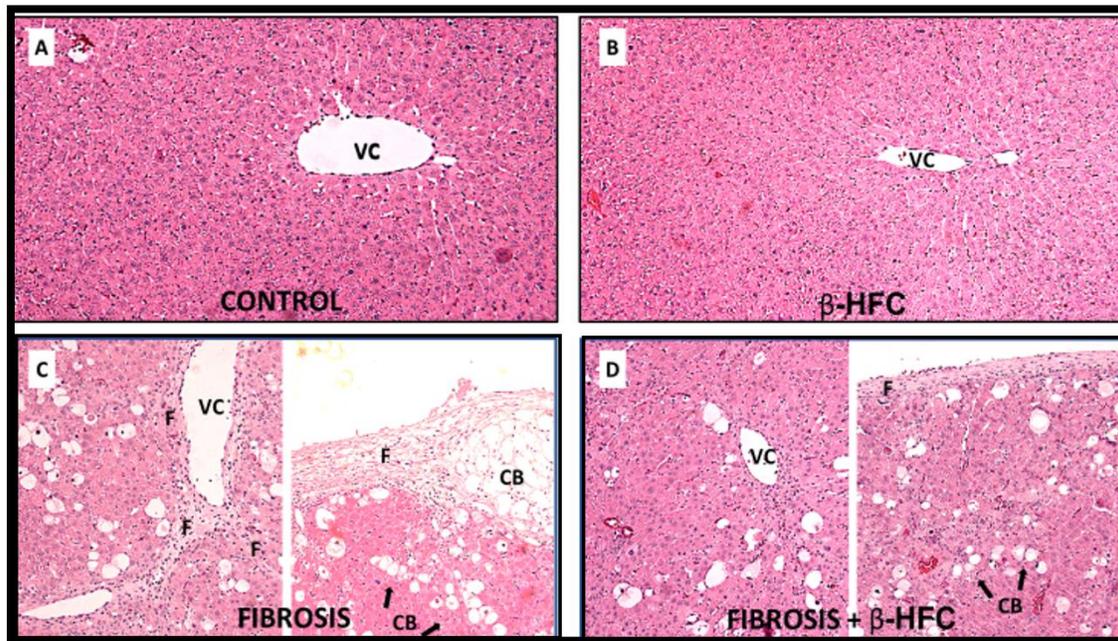


**Figura 13. Cambios macroscópicos en el hígado en la fibrosis hepática.** Hígados representativos de los grupos: A) control, B)  $\beta$ -HFC, C) Fibrosis, D)  $\beta$ -HFC. En la sección A y B tenemos 2 hígados sanos; caracterizados por una coloración rojiza, apariencia “lisa” y su tamaño normal, en la sección C vemos un hígado inducido a fibrosis, en donde el hígado pierde su coloración y se vuelve opaco, su textura se vuelve de “lisa” a “áspera” y su tamaño se ve modificado, por último, en la D tenemos un hígado con notable mejoría a comparación del grupo de fibrosis; la textura y tamaño se acercan más al del grupo control.

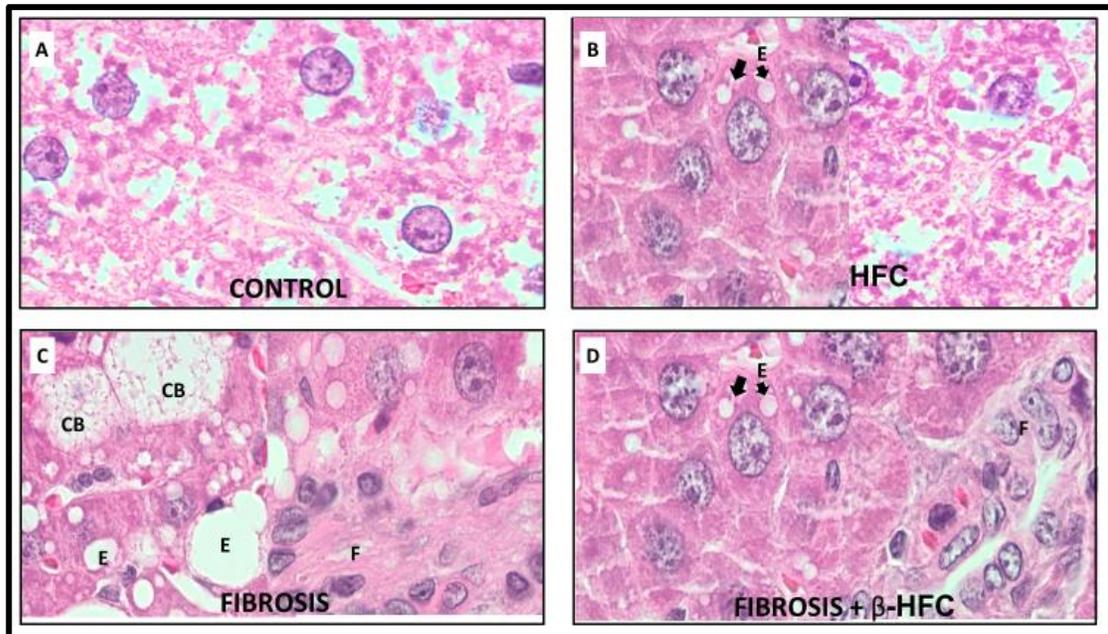
Para confirmar que la administración de  $\beta$ -HFC por sí sola no causa hepatotoxicidad y que sí mejoraba la arquitectura hepática del hígado dañado, analizamos cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (H&E) y se observaron bajo un microscopio con el objetivo de 10X (**figura 14**). En el grupo control se presenta la arquitectura hepática de un hígado sano, a este aumento podemos destacar los cordones formado por los hepatocitos sin ningún tipo de obstrucción en él, así como la formación tradicional de los mismos; en forma de "cordones" que salen de la vena central. En la figura 14B podemos vemos que la administración de  $\beta$ -HFC por sí sola no alteró la estructura hepática, siendo similar a la del grupo control. Sin embargo, el grupo con fibrosis hepática (**figura 14C**) se observó una muy marcada diferencia comparado con el grupo sano; ya no se observa el cordón de hepatocitos uniforme, este se ve invadido por hepatocitos balonizados y fibras de colágeno, por lo que tampoco se puede distinguir la formación tradicional de los hepatocitos alrededor de la vena central. Sorprendentemente, en la figura 14D podemos distinguir como el tratamiento con  $\beta$ -HFC, restauró la arquitectura hepática, vemos menor células balonizadas y fibras de colágeno en el parénquima, haciendo que la arquitectura hepática sea más parecida a la del grupo control.

Para detectar estos cambios morfológicos a nivel se analizaron histologías a 100X (**figura 15**). En la figura 15A y B los hepatocitos poseen características de tamaño normales como lo vimos en la imagen 15, a estos aumentos también se puede distinguir su núcleo bien formado. En la figura 15C se ve una notable diferencia en la morfología del hepatocito; este se encuentra completamente invadido por esteatosis microvesicular (vacuolas de grasa de distintos tamaños), estas vacuolas incluso han desplazado el núcleo hacia un costado. También en estos aumentos se observa esteatosis macrovesicular (vacuolas de grasa de mayor tamaño) en el parénquima del hígado, todo lo anterior mencionado nos confirma que existe un daño hepático. En la figura 15D podemos ver que la administración de  $\beta$ -HFC disminuyo en gran medida los hepatocitos invadidos por vacuolas, los hepatocitos tienen una morfología más cercana a los hepatocitos observados en el tejido sano, así como una disminución en la esteatosis comparado con la figura 15C. Por lo anterior, nuestros datos sugieren que la administración de  $\beta$ -HFC no produce

hepatotoxicidad al no alterar la arquitectura hepática en el hígado sano, por el contrario, su administración restaura la arquitectura hepática en un hígado con fibrosis hepática.



**Figura 14. Efecto de  $\beta$ -HFC sobre la arquitectura hepática en ratas con fibrosis. A) Control, B)  $\beta$ -HFC, C) Fibrosis y D) Fibrosis +  $\beta$ -HFC. La arquitectura hepática se ve alterada cuando existe daño hepatocelular. Puede aparecer fibrosis, células en balón y se ve alterada la formación de los hepatocitos. **CB: Células en balón, F: fibrosis, VC: vena central.** Tinción hematoxilina-eosina (HE). Amplificación 10X.**



**Figura 15. Efecto de  $\beta$ -HFC sobre la arquitectura hepática en ratas con fibrosis.** A) Control, B)  $\beta$ -HFC, C) Fibrosis y D) Fibrosis +  $\beta$ -HFC. Las células en balón se caracterizan por tener dentro de si acumulación de líquidos, por aumentar su tamaño y desplazar su núcleo. En el hígado dañado también se puede observar esteatosis y fibrosis. **CB: Células en balón, F: fibrosis, E: e.** Tinción hematoxilina-eosina (HE). Amplificación 100X.

#### 8.4 Efecto de $\beta$ -HFC sobre la función hepática en ratas con daño hepático

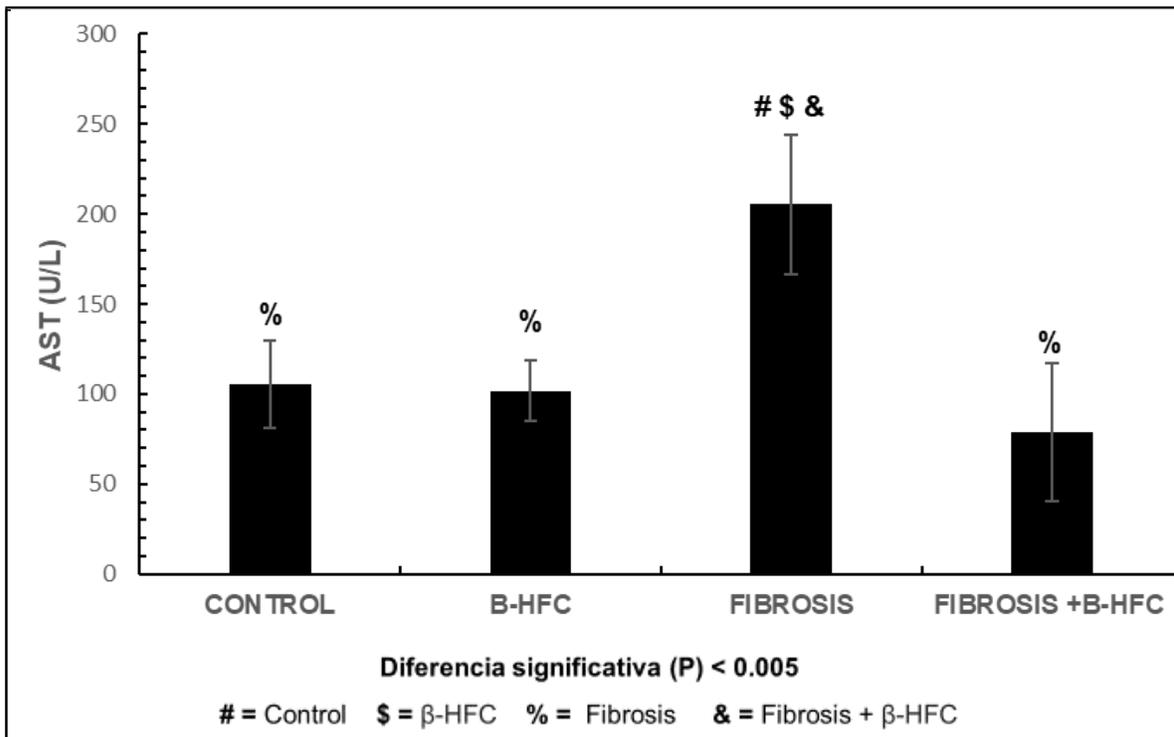
En la clínica existen una serie de pruebas que se realiza a pacientes con sospecha de enfermedad en el hígado, las llamadas pruebas de función hepática. Esas pruebas incluyen entre otras a las enzimas ALT, ALP, AST y GGT, que fungen como herramienta en la detección de daño y pérdida de la función hepática. Obtener niveles altos de dichas enzimas, podrían indicar una posible disminución de la función hepática. En este trabajo se determinaron las concentraciones de estos marcadores, en la Tabla 2 se colocaron los valores obtenidos. Cabe destacar que

los datos del grupo control fueron los considerados como referencia para el análisis de los distintos grupos. Los resultados obtenidos evidencian el aumento de los niveles enzimáticos en el grupo con fibrosis hepática. Mientras que en el grupo con fibrosis que recibió el tratamiento con  $\beta$ -HFC, se observó una marcada disminución de los valores enzimáticos del grupo de animales con fibrosis

**Tabla 2.-** Pruebas bioquímicas realizadas en distintos grupos de ratas Wistar macho

Enzima	Control	$\beta$ -HFC	Fibrosis	Fibrosis + $\beta$ -HFC
Aspartato aminotransferasa (AST)	105.5 $\pm$ 24.2	101.8 $\pm$ 16.4	<b>205.31 <math>\pm</math> 38.91</b>	78.8 $\pm$ 38.3
Alanina aminotransferasa (ALT)	2.75 $\pm$ 2.0	2.37 $\pm$ 1.0	<b>17.4 <math>\pm</math> 5.7</b>	14.2 $\pm$ 2.6
Fosfatasa alcalina (ALP)	209.35 $\pm$ 28.77	215.0 $\pm$ 29.9	<b>282.4 <math>\pm</math> 21.9</b>	269.02 $\pm$ 41.4
Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)	45.0 $\pm$ 6.83	43.3 $\pm$ 11.28	62.7 $\pm$ 16.16	51.25 $\pm$ 11.5

Para un mejor entendimiento, los valores de AST fueron graficados y presentados en la **Figura 16**. El nivel de AST del grupo de animales con fibrosis hepática aumentó dos veces más que el del grupo control. Por otro lado, el grupo con fibrosis que recibió el tratamiento con  $\beta$ -HFC mostró una disminución de más del 50% comparado con el grupo con fibrosis. Por último, cabe señalar que el grupo **control** y el grupo de  $\beta$ -HFC mostraron resultados muy similares, lo que sugiere que el fármaco por sí solo no altera la función hepática. Nuestros resultados sugieren que  $\beta$ -HFC cumple una función hepatoprotectora al disminuir los niveles de AST de manera significativa, mostrando ser eficaz en la disminución del daño hepático y ayudar en la recuperación de la función hepática.



**Figura 16. Nivel de AST en ratas Wistar con daño hepático.** Los niveles elevados de AST en la sangre pueden indicar que existe alguna enfermedad del hígado, la disminución de estos niveles se asocia a una mejoría de estas enfermedades y también a la restauración de la función hepática.

## 9. Discusión

Las enfermedades hepáticas continúan aumentando su prevalencia a nivel mundial, esto gracias a una gran cantidad de factores que favorecen a su desarrollo. Todas las enfermedades hepáticas son capaces de producir daño hepatocelular, que, si se mantiene de manera crónica puede llevar a la fibrosis hepática. La fibrosis hepática se caracteriza principalmente por la acumulación excesiva de proteínas de la MEC producidas por las CEH en estado activado, lo que compromete la funcionalidad del órgano y lleva a impactar negativamente en la mortalidad de las personas que padecen alguna enfermedad hepática (Berumen et al., 2021; Kisseleva & Brenner, 2021). A pesar de ser una condición cada vez más común, en la actualidad no existen fármacos aprobados contra la fibrosis hepática, por lo que, cada vez se investigan más moléculas con potencial poder hepatoprotector.

En este sentido, la L-carnitina se ha utilizado en el tratamiento de trastornos relacionados al síndrome metabólico, principalmente en la obesidad (Kim et al., 2012). En los últimos años se ha analizado el poder hepatoprotector de la L-carnitina exógena, mostrando que su administración, mejora la función y arquitectura hepática en pacientes con EHNA (Musso et al., 2010). Sin embargo, es importante mencionar que esta molécula no posee un perfil farmacocinético favorable para su prescripción; destacando una biodisponibilidad menor al 20%. Por lo que, en la búsqueda de nuevos análogos, en nuestro laboratorio evaluamos a la  $\beta$ -HFC, la cual demostró conservar similar efecto terapéutico, mejorando las propiedades farmacocinéticas y teniendo un margen de seguridad elevado (Gómez-Solís et al., 2011; Jorge et al., 2016; Reyes-Esparza et al., 2014).

En la actualidad, para el estudio y entendimiento de enfermedades humanas, así como para el desarrollo de nuevos medicamentos, se continúa utilizando los modelos en animales. En este sentido, para la fibrosis hepática existen algunos modelos de inducción como: los dietéticos, quirúrgicos, transgénicos e inmunes, sin embargo, uno de los modelos más eficaces y utilizados es la inducción por agentes químicos (Wu et al., 2023). Entre los agentes químicos capaces de provocar fibrosis hepática se puede destacar al  $\text{CCl}_4$  y la DEN, esto gracias a su efectividad, ya que

se sabe que tras la administración de CCl<sub>4</sub> 2 veces por semana puede producir fibrosis hepática (similar a la de un estadio 3 en humanos) entre las primeras 4 a 6 semanas (Scholten et al., 2015). Por su parte, la DEN es uno de los químicos con mayor hepatotoxicidad, capaz de producir necrosis hepatocelular y fibrosis desde la semana 3 a la semana 6 tras su única administración (Cheng et al., 2018; Ghufran et al., 2021; Rodríguez et al., 2021). Por lo tanto, mezclar estos 2 agentes en un tratamiento podría ser una estrategia útil para garantizar la aparición de fibrosis hepática, así como para agilizar el tiempo en el que esta aparezca, ya que la elección de otros agentes químicos puede alargar el tiempo de experimentación; casos como el etanol que produce fibrosis hasta la semana 8 pudiéndose extender hasta la semana 70 (Song et al., 2016), o la tioacetamida que produce fibrosis posterior a la semana 12 (Lee et al., 2019; Shin et al., 2018).

El objetivo de este trabajo es el análisis del efecto de la  $\beta$ -HFC en la fibrosis hepática inducida con CCl<sub>4</sub> y DEN. Las imágenes obtenidas en las diferentes histologías, así como las bioquímicas confirmaron la hepatotoxicidad del tratamiento con CCl<sub>4</sub> y DEN, al provocar alteraciones como: aumento significativo en la cantidad de fibras de colágena en el hígado, una marcada deformación de la arquitectura hepática, niveles elevados de enzimas asociadas a función hepática, así como de un posible aumento de CEH en estado activado (Bataller & Brenner, 2005), sucediendo todo esto en apenas 5 semanas. Por lo anterior, podemos decir que el modelo en conjunto del CCl<sub>4</sub> y DEN fue la mejor elección, al demostrar eficacia y eficiencia, al producir las alteraciones deseadas en un tiempo menor al propuesto en la literatura por otros modelos, teniendo incluso un gasto menor de recursos respecto a la alimentación y mantenimiento de las ratas analizadas.

Como hemos visto la principal característica de la fibrosis es la acumulación de MEC en el hígado, por lo que, la disminución de esta funge como un marcador de la reversión de dicha condición (Karsdal et al., 2017). Para determinar la disminución de las fibras de colágena, se analizaron histologías de ratas inducidas a fibrosis hepática tratadas con  $\beta$ -HFC, utilizando la tinción TM. Las histologías mostraron una marcada disminución en la cantidad de fibras de colágena tanto alrededor de los

vasos sanguíneos como en la periferia de las ratas inducidas a fibrosis hepática tratadas con  $\beta$ -HFC en comparación de las ratas con fibrosis hepática. Nuestros resultados son similares a los observados en el estudio de la evaluación del efecto de la mangiferina sobre la fibrosis hepática inducida con CCl<sub>4</sub> durante 8 semanas, en donde se observó reducción de la cantidad de fibras de colágena en el hígado de ratones inducidos a fibrosis hepática por el tratamiento del hepatoprotector mangiferina, siendo esta reducción alrededor de los vasos sanguíneos (Zhang et al., 2023), otro estudio con resultado similar es el análisis de la administración de propóleo en un modelo de fibrosis hepática, en este trabajo se observó la disminución tanto de tamaño como en cantidad de las fibras de colágena en el grupo inducido a fibrosis tratado con propóleo en comparación del grupo de fibrosis (Sayed et al., 2021). Al comparar estos resultados con los obtenidos por  $\beta$ -HFC, se puede resaltar la efectividad de la  $\beta$ -HFC para lograr la disminución de las fibras de colágena en el hígado, ya que se muestra una mayor evidencia de esta disminución, e incluso se muestra esta disminución en áreas diferentes como lo son las periferias, las cuales no se muestran en los otros trabajos.

Un acontecimiento que está estrictamente ligado al aumento de las fibras de colágena en el hígado es la activación de las CEH, una mayor cantidad de fibras de colágena indicará también una mayor activación de las CEH (Puche et al., 2013). La activación de estas células implica cambios en su morfología, en donde se pierde su particular forma “estrellada” adquiriendo una forma más redondeada similar a la del fibroblasto (Washabau & Day, 2013). Para poder evaluar el origen de las fibras de colágena se analizó la presencia y morfología de CEH mediante microscopía electrónica de transmisión a 2000 aumentos. Los resultados mostraron una nula aparición de estas células en el grupo control y  $\beta$ -HFC, lo cual se relaciona directamente con la pequeña cantidad de fibras de colágena observadas en la tinción TM. Por otro lado, en el análisis de las ratas con fibrosis hepática, encontramos la presencia de algunas células, que, por su morfología redondeada y ubicación en las áreas de mayor daño, podrían ser indicativos de que son las CEH en estado activado, este hallazgo explicaría también la gran cantidad de fibras de colágena observadas en la tinción TM, caso opuesto a las muestras de las ratas

inducidas a fibrosis hepática que fueron tratadas con  $\beta$ -HFC, en donde no se observaron indicios de estas células en las áreas analizadas, se sabe que la reversión de la fibrosis hepática implica una reducción total o parcial de CEH activadas, ya que son las principales células pro-fibroticas (Troeger et al., 2012), por lo que, al no existir un aumento considerable en las fibras de colágena en la tinción TM, tiene sentido no haberlas observado en este grupo. Resultados similares se observaron en el estudio de la evaluación de la genisteína sobre la fibrosis hepática inducida con CCl<sub>4</sub> (Leija Salas et al., 2007), en donde los resultados mostraron una reducción en el número de CEH activadas en el hígado fibrótico por el tratamiento con genisteína en comparación del no tratado, destacando el cambio en la morfología de las CEH, ya que estas en el hígado de los animales con fibrosis hepática se mostraban con un fenotipo proliferativo similar al de los miofibroblastos, encontrándose en las áreas más dañadas que eran caracterizadas por abundantes depósitos de colágena. Previamente, se había demostrado que el tratamiento con  $\beta$ -HFC disminuye la expresión de  $\alpha$ -SMA en un modelo de EHNA (Sánchez-Quevedo et al., 2022), la expresión de  $\alpha$ -SMA es un marcador de la activación de las CEH, por lo que este resultado observado en la microscopia electrónica de transmisión complementa la evidencia respecto a la interacción entre la  $\beta$ -HFC y la activación de las CEH.

Con el fin de encontrar alteraciones en la morfología hepática, se analizaron histologías teñidas con H&E. Los resultados evidenciaron que la administración única de  $\beta$ -HFC no genera ningún tipo de hepatotoxicidad al no producir ningún tipo de alteración en la arquitectura hepática, lo cual reafirma lo observado en la administración de  $\beta$ -HFC en un modelo de EHNA; nulos cambios en la arquitectura hepática respecto al grupo control (Sánchez-Quevedo et al., 2022), así como confirma el alto margen de seguridad de esta molécula, obtenido en estudios toxicológicos (Jorge et al., 2016). Por su parte, en las ratas con fibrosis hepática se observaron cambios notorios en la arquitectura hepática: el más evidente fue la aparición de las células en balón, estas células se caracterizan principalmente por un tamaño aumentado (debido a que dentro de si alojan liquido), la aparición de células en balón indica daño hepático. Por último, el grupo que fue tratado con  $\beta$ -

HFC mostró una marcada disminución en cuanto a la cantidad de células en balón presente en las áreas analizadas, logrando la restauración de la arquitectura hepática, lo cual se puede asociar a la disminución del daño hepático. Datos similares se presentan en muestras en la evaluación del efecto de D-carvona en la fibrosis hepática en un modelo de inducción con CCl<sub>4</sub> (Ogaly et al., 2022); la administración de D-carvona mejoró de manera notoria la arquitectura hepática, disminuyendo las células dañadas, lo cual fue relacionado con la disminución del estrés oxidativo. Por otro lado, el tratamiento con Paeonol (Wu et al., 2019) redujo significativamente las células hepáticas necróticas, disminuyendo las lesiones observadas en las histologías de los roedores con fibrosis hepática por CCl<sub>4</sub>, al igual que con la D-carvona este hecho se asoció con la mitigación del estrés oxidativo. Actualmente no se tiene un mecanismo de acción definido para la  $\beta$ -HFC, sin embargo, se conocen algunos estudios en donde la L-carnitina ha demostrado efecto antioxidante en diferentes enfermedades (Agarwal et al., 2018; Cao et al., 2014; Li et al., 2012; Maguiña-Alfaro et al., 2020), la similitud entre el efecto terapéutico de la L-carnitina con la  $\beta$ -HFC podría ser un indicativo de que la  $\beta$ -HFC logra la restauración del tejido hepático dañado por el CCl<sub>4</sub> por la disminución del estrés oxidativo.

Finalmente, para evaluar alteraciones en la función hepática de los distintos grupos analizados se realizaron pruebas bioquímicas correspondientes a enzimas marcadores de función hepática (ALT, AST, ALP, GGT). Los resultados mostraron que la administración única de  $\beta$ -HFC no altera la función hepática, obteniendo niveles enzimáticos similares a lo del grupo control, la función hepática se puede relacionar con el nivel de daño hepatocelular que sufre el hígado, entre más daño celular exista, menor será la capacidad de respuesta del hígado, por lo que, este resultado está acorde con lo observado en las histologías teñidas con HyE. En las ratas con fibrosis hepática se observó un aumento en los niveles de todas las enzimas analizadas en comparación con el grupo control, sin embargo, solo AST mostró diferencias significativas. AST es una enzima que se puede encontrar en mayor medida en el hígado, si las células hepáticas son dañadas, estas liberan el AST al torrente sanguíneo, por lo que un aumento en la concentración de esta

enzima está directamente relacionado al daño hepático. Por lo contrario, las ratas tratadas con  $\beta$ -HFC obtuvieron niveles séricos similares a los obtenidos en el grupo control, la disminución de los niveles de AST en el hígado dañado indica la recuperación de la función hepática. Resultados similares, fueron reportados en la evaluación de Maresin-1 en un modelo de fibrosis hepática inducida, en donde se observó una atenuación en los animales que recibieron el tratamiento de dicha molécula a comparación de los que no recibieron, observándose un acercamiento a los valores del grupo control y sirviendo como un indicativo de la disminución del daño hepático y la restauración de la función de este órgano (Rodríguez et al., 2021).

## 9. Conclusiones

### 9.1 Conclusión general

$\beta$ -HFC disminuyó la fibrosis hepática en un modelo de fibrosis hepática *in vivo*.

### 9.2 Conclusiones particulares

- La  $\beta$ -HFC disminuyó las fibras de colágena en el hígado de ratas con fibrosis hepática inducida por DEN/CCl<sub>4</sub>.
- La  $\beta$ -HFC redujo las CEH en estado activado en ratas con fibrosis hepática inducida por DEN/CCl<sub>4</sub>.
- La  $\beta$ -HFC mejoró la arquitectura hepática de ratas con fibrosis inducida por DEN/CCl<sub>4</sub>.
- La  $\beta$ -HFC mejoró la función hepática de ratas con fibrosis inducida por DEN/CCl<sub>4</sub>.

## 10. Referencias

- Acharya, P., Chouhan, K., Weiskirchen, S., & Weiskirchen, R. (2021). Cellular Mechanisms of Liver Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 12.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.671640>
- Adeva-Andany, M. M., Calvo-Castro, I., Fernández-Fernández, C., Donapetry-García, C., & Pedre-Piñeiro, A. M. (2017). Significance of l-carnitine for human health. *IUBMB Life*, 69(8), 578-594. <https://doi.org/10.1002/iub.1646>
- Afdhal, N. H., & Nunes, D. (2004). Evaluation of liver fibrosis: A concise review. *The American Journal of Gastroenterology*, 99(6), 1160-1174. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.30110.x>
- Agarwal, A., Sengupta, P., & Durairajanayagam, D. (2018). Role of L-carnitine in female infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 16(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0323-4>
- Almannai, M., Alfadhel, M., & El-Hattab, A. W. (2019). Carnitine Inborn Errors of Metabolism. *Molecules*, 24(18), 3251. <https://doi.org/10.3390/molecules24183251>
- Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J., & Kamath, P. S. (2019). Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology*, 70(1), 151-171. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>
- Bao, Y., Wang, L., Pan, H., Zhang, T., Chen, Y., Xu, S., Mao, X., & Li, S. (2021). Animal and Organoid Models of Liver Fibrosis. *Frontiers in Physiology*, 12, 666138.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.666138>

- Bataller, R., Paik, Y.-H., Lindquist, J. N., Lemasters, J. J., & Brenner, D. A. (2004). Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, *126*(2), 529-540. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.11.018>
- Bataller, R., & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(2), 209–218. <https://doi.org/10.1172/JCI200524282>
- Benyon, R. C., & Arthur, M. J. (2001). Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Seminars in Liver Disease*, *21*(3), 373-384. <https://doi.org/10.1055/s-2001-17552>
- Berumen, J., Baglieri, J., Kisseleva, T., & Mekeel, K. (2021). Liver fibrosis: Pathophysiology and clinical implications. *WIREs Mechanisms of Disease*, *13*(1), e1499. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1499>
- Bismuth, H. (2013). Revisiting liver anatomy and terminology of hepatectomies. *Annals of Surgery*, *257*(3), 383-386. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e31827f171f>
- Björnsson, E. S. (2016). Hepatotoxicity by Drugs: The Most Common Implicated Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(2), 224. <https://doi.org/10.3390/ijms17020224>
- Bolkenius, U., Hahn, D., Gressner, A. M., Breitkopf, K., Dooley, S., & Wickert, L. (2004). Glucocorticoids decrease the bioavailability of TGF- $\beta$  which leads to a reduced TGF- $\beta$  signaling in hepatic stellate cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *325*(4), 1264-1270. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.164>
- Caligiuri, A., Gentilini, A., Pastore, M., Gitto, S., & Marra, F. (2021). Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Liver Fibrosis Regression. *Cells*, *10*(10), 2759. <https://doi.org/10.3390/cells10102759>

- Carloni, V., Romanelli, R. G., Pinzani, M., Laffi, G., & Gentilini, P. (1996). Expression and function of integrin receptors for collagen and laminin in cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, *110*(4), 1127-1136.  
<https://doi.org/10.1053/gast.1996.v110.pm8613002>
- Cao, Y., Li, X., Shi, P., Wang, L., & Sui, Z. (2014). Effects of L-carnitine on high glucose-induced oxidative stress in retinal ganglion cells. *Pharmacology*, *94*(3–4), 123–130.  
<https://doi.org/10.1159/000363062>
- Cheng, Y., Zheng, H., Wang, B., Xu, W., Xu, J., & Zhu, Y. (2018). Sorafenib and fluvastatin synergistically alleviate hepatic fibrosis via inhibiting the TGF $\beta$ 1/Smad3 pathway. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, *50*(4), 381–388.  
<https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.12.015>
- Chen, Z., Jain, A., Liu, H., Zhao, Z., & Cheng, K. (2019). Targeted Drug Delivery to Hepatic Stellate Cells for the Treatment of Liver Fibrosis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *370*(3), 695-702. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.256156>
- Cheng, M. L., Nakib, D., Perciani, C. T., & MacParland, S. A. (2021). The immune niche of the liver. *Clinical Science*, *135*(20), 2445-2466. <https://doi.org/10.1042/CS20190654>
- Cordero, R. A. D. L. C., Vázquez, M. Á. D., & Loria, J. L. R. (2013). *Beta-Hydroxy-Gamma-Aminophosphonates and Methods for the Preparation and Use Thereof* (United States Patent US20130079308A1).  
<https://patents.google.com/patent/US20130079308A1/en?q=US+2013%2f0079308A1>
- Czaja, A. J. (2014). Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(10), 2515-2532.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i10.2515>

- Dhar, D., Baglieri, J., Kisseleva, T., & Brenner, D. A. (2020). Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *245*(2), 96-108.  
<https://doi.org/10.1177/1535370219898141>
- Ding, B.-S., Nolan, D. J., Butler, J. M., James, D., Babazadeh, A. O., Rosenwaks, Z., Mittal, V., Kobayashi, H., Shido, K., Lyden, D., Sato, T. N., Rabbany, S. Y., & Rafii, S. (2010). Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature*, *468*(7321), Art. 7321. <https://doi.org/10.1038/nature09493>
- Dong, S., Chen, Q.-L., Song, Y.-N., Sun, Y., Wei, B., Li, X.-Y., Hu, Y.-Y., Liu, P., & Su, S.-B. (2016). Mechanisms of CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis. *The Journal of Toxicological Sciences*, *41*(4), 561-572.  
<https://doi.org/10.2131/jts.41.561>
- Duffield, J. S., Forbes, S. J., Constandinou, C. M., Clay, S., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Lang, R., & Iredale, J. P. (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(1), 56-65.  
<https://doi.org/10.1172/JCI200522675>
- European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), & European Association for the Study of Obesity (EASO). (2016). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, *64*(6), 1388-1402.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>
- Friedman, S. L., Sheppard, D., Duffield, J. S., & Violette, S. (2013). Therapy for fibrotic diseases: Nearing the starting line. *Science Translational Medicine*, *5*(167), 167sr1.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004700>

- Gaul, S., Leszczynska, A., Alegre, F., Kaufmann, B., Johnson, C. D., Adams, L. A., Wree, A., Damm, G., Seehofer, D., Calvente, C. J., Povero, D., Kisseleva, T., Eguchi, A., McGeough, M. D., Hoffman, H. M., Pelegrin, P., Laufs, U., & Feldstein, A. E. (2021). Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, *74*(1), 156-167. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.07.041>
- Geerts, A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Seminars in Liver Disease*, *21*(3), 311-335. <https://doi.org/10.1055/s-2001-17550>
- George, J., & Chandrakasan, G. (1996). Molecular characteristics of dimethylnitrosamine induced fibrotic liver collagen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1292*(2), 215-222. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00202-2](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00202-2)
- Ghufran, H., Azam, M., Mehmood, A., Butt, H., & Riazuddin, S. (2021). Standardization of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma rat model with time based molecular assessment. *Experimental and Molecular Pathology*, *123*, 104715. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2021.104715>
- Giannini, E., Risso, D., Botta, F., Chiarbonello, B., Fasoli, A., Malfatti, F., Romagnoli, P., Testa, E., Ceppa, P., & Testa, R. (2003). Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Archives of Internal Medicine*, *163*(2), 218-224. <https://doi.org/10.1001/archinte.163.2.218>
- Gómez-Solís, A., De la Cruz-Cordero, R., Avalos-Soriano, A., Duarte-Vázquez, M. A., Reyes-Esparza, J., & Rodríguez-Fragoso, L. (2011). Efficacy and safety of two analogs of L-carnitine on rats made insulin resistant by a high-fructose diet. *Pharmacology*, *88*(1-2), 10-17. <https://doi.org/10.1159/000328772>

- Hernandez-Gea, V., & Friedman, S. L. (2011). Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6(1), 425-456. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130246>
- Iredale, J. P., Thompson, A., & Henderson, N. C. (2013). Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1832(7), 876-883. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.11.002>
- Iwaisako, K., Jiang, C., Zhang, M., Cong, M., Moore-Morris, T. J., Park, T. J., Liu, X., Xu, J., Wang, P., Paik, Y.-H., Meng, F., Asagiri, M., Murray, L. A., Hofmann, A. F., Iida, T., Glass, C. K., Brenner, D. A., & Kisseleva, T. (2014). Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(32), E3297-E3305. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400062111>
- Iwakiri, Y. (2014). Pathophysiology of Portal Hypertension. *Clinics in liver disease*, 18(2), 281-291. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.12.001>
- Jaeschke, H. (2011). Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26 Suppl 1, 173-179. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06592.x>
- Jain, R., & Williams, R. (2001). Asymmetric synthesis of (S)-(+)-carnitine and analogs. *Tetrahedron*, 57, 6505-6509. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00542-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00542-7)
- Jin, Z., Sun, R., Wei, H., Gao, X., Chen, Y., & Tian, Z. (2011). Accelerated liver fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice: Involvement of natural killer T cells. *Hepatology*, 53(1), 219-229. <https://doi.org/10.1002/hep.23983>
- Jo, Y. H., Lee, H., Oh, M. H., Lee, G. H., Lee, Y. J., Lee, J. S., Kim, M. J., Kim, W. Y., Kim, J. S., Yoo, D. S., Cho, S. W., Cha, S. W., & Pyo, M. K. (2020). Antioxidant and hepatoprotective effects of Korean ginseng extract GS-KG9 in a D-galactosamine-induced liver damage animal model.

*Nutrition Research and Practice*, 14(4), 334-351.

<https://doi.org/10.4162/nrp.2020.14.4.334>

Jorge, R.-E., Brissa, M.-R., La, C.-C. R. D., Angel, D.-V. M., Rosado, J. L., & Lourdes, R.-F. (2016).

Preclinical Safety Assessment of #946;-Hydroxyphospho-Carnitine. *Toxicology*

*International (Formerly Indian Journal of Toxicology)*, 23(2), Art. 2.

<https://doi.org/10.22506/ti/2016/v23/i2/146697>

Karlmark, K. R., Weiskirchen, R., Zimmermann, H. W., Gassler, N., Ginhoux, F., Weber, C., Merad,

M., Luedde, T., Trautwein, C., & Tacke, F. (2009). Hepatic recruitment of the inflammatory

Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology (Baltimore,*

*Md.)*, 50(1), 261-274. <https://doi.org/10.1002/hep.22950>

Karsdal, M. A., Nielsen, S. H., Leeming, D. J., Langholm, L. L., Nielsen, M. J., Manon-Jensen, T.,

Siebuhr, A., Gudmann, N. S., Rønnow, S., Sand, J. M., Daniels, S. J., Mortensen, J. H., &

Schuppan, D. (2017). The good and the bad collagens of fibrosis—Their role in signaling

and organ function. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 121, 43–56.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.014>

Khomich, O., Ivanov, A. V., & Bartosch, B. (2019). Metabolic Hallmarks of Hepatic Stellate Cells in

Liver Fibrosis. *Cells*, 9(1), 24. <https://doi.org/10.3390/cells9010024>

Kim, M. Y., Cho, M. Y., Baik, S. K., Jeong, P. H., Suk, K. T., Jang, Y. O., Yea, C. J., Kim, J. W., Kim, H. S.,

Kwon, S. O., Yoo, B. S., Kim, J. Y., Eom, M. S., Cha, S. H., & Chang, S. J. (2012). Beneficial

effects of candesartan, an angiotensin-blocking agent, on compensated alcoholic liver

fibrosis—A randomized open-label controlled study. *Liver International*, 32(6), 977-987.

<https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2012.02774.x>

- Kisseleva, T., & Brenner, D. (2021). Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 18(3), 151-166.  
<https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7>
- Kong, D., Zhang, Z., Chen, L., Huang, W., Zhang, F., Wang, L., Wang, Y., Cao, P., & Zheng, S. (2020). Curcumin blunts epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes to alleviate hepatic fibrosis through regulating oxidative stress and autophagy. *Redox Biology*, 36, 101600.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101600>
- Kwo, P. Y., Cohen, S. M., & Lim, J. K. (2017). ACG Clinical Guideline: Evaluation of Abnormal Liver Chemistries. *The American Journal of Gastroenterology*, 112(1), 18-35.  
<https://doi.org/10.1038/ajg.2016.517>
- Lambrecht, J., van Grunsven, L. A., & Tacke, F. (2020). Current and emerging pharmacotherapeutic interventions for the treatment of liver fibrosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 21(13), 1637-1650. <https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1774553>
- Lee, K.-C., Hsu, W.-F., Hsieh, Y.-C., Chan, C.-C., Yang, Y.-Y., Huang, Y.-H., Hou, M.-C., & Lin, H.-C. (2019). Dabigatran Reduces Liver Fibrosis in Thioacetamide-Injured Rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 64(1), 102–112. <https://doi.org/10.1007/s10620-018-5311-1>
- Leija Salas, A., Díaz Montezuma, T., Garrido Fariña, G., Reyes-Esparza, J., & Rodríguez-Fragoso, L. (2007). Genistein Modifies Liver Fibrosis and Improves Liver Function by Inducing uPA Expression and Proteolytic Activity in CCl<sub>4</sub>-Treated Rats. *Pharmacology*, 81(1), 41-49.  
<https://doi.org/10.1159/000107968>
- Li, J.-L., Wang, Q.-Y., Luan, H.-Y., Kang, Z.-C., & Wang, C.-B. (2012). Effects of L-carnitine against oxidative stress in human hepatocytes: Involvement of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Journal of Biomedical Science*, 19(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-32>

- Li, S., Tan, H.-Y., Wang, N., Zhang, Z.-J., Lao, L., Wong, C.-W., & Feng, Y. (2015). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26087-26124. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>
- Liedtke, C., Luedde, T., Sauerbruch, T., Scholten, D., Streetz, K., Tacke, F., Tolba, R., Trautwein, C., Trebicka, J., & Weiskirchen, R. (2013). Experimental liver fibrosis research: Update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-6-19>
- Lo, R. C., & Kim, H. (2017). Histopathological evaluation of liver fibrosis and cirrhosis regression. *Clinical and Molecular Hepatology*, 23(4), 302-307. <https://doi.org/10.3350/cmh.2017.0078>
- Lucero, C., & Brown, R. S. (2016). Noninvasive Measures of Liver Fibrosis and Severity of Liver Disease. *Gastroenterology & Hepatology*, 12(1), 33-40.
- Maguiña-Alfaro, M., Suárez-Cunza, S., Salcedo-Valdez, L., Soberón-Lozano, M., Carbonel-Villanueva, K., Carrera-Palao, R., Maguiña-Alfaro, M., Suárez-Cunza, S., Salcedo-Valdez, L., Soberón-Lozano, M., Carbonel-Villanueva, K., & Carrera-Palao, R. (2020). Rol antioxidante de la L-carnitina en un modelo experimental de estrés oxidativo inducido por consumo elevado de fructosa. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 37(4), 662–671. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.374.4733>
- Malaguarnera, M. (2012). Carnitine derivatives: Clinical usefulness. *Current Opinion in Gastroenterology*, 28(2), 166. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3283505a3b>
- Manterola, C., del-Sol, M., Ottone, N., & Otzen, T. (2017). Anatomía Quirúrgica y Radiológica del Hígado. Fundamentos para las Resecciones Hepáticas. *International Journal of Morphology*, 35(4), 1525-1539. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000401525>

Mingorance, C., Rodríguez-Rodríguez, R., Justo, M. L., Alvarez de Sotomayor, M., & Herrera, M. D.

(2011). Critical update for the clinical use of L-carnitine analogs in cardiometabolic disorders. *Vascular Health and Risk Management*, 7, 169-176.

<https://doi.org/10.2147/VHRM.S14356>

Mudaliar, S., Henry, R. R., Sanyal, A. J., Morrow, L., Marschall, H.-U., Kipnes, M., Adorini, L.,

Sciacca, C. I., Clopton, P., Castelloe, E., Dillon, P., Pruzanski, M., & Shapiro, D. (2013).

Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 145(3), 574-

582.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.042>

Muriel, P., & Gordillo, K. R. (2016). Role of Oxidative Stress in Liver Health and Disease. *Oxidative*

*Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 9037051. <https://doi.org/10.1155/2016/9037051>

Murphy, F. R., Issa, R., Zhou, X., Ratnarajah, S., Nagase, H., Arthur, M. J. P., Benyon, C., & Iredale, J.

P. (2002). Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition:

Implications for reversibility of liver fibrosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(13),

11069-11076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111490200>

Musso, G., Cassader, M., Paschetta, E., & Gambino, R. (2017). Thiazolidinediones and Advanced

Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis: A Meta-analysis. *JAMA Internal Medicine*,

177(5), 633-640. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.9607>

Musso, G., Gambino, R., Cassader, M., & Pagano, G. (2010). A meta-analysis of randomized trials

for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(1),

79-104. <https://doi.org/10.1002/hep.23623>

Ogaly, H. A., Aldulmani, S. A. A., Al-Zahrani, F. A. M., & Abd-Elsalam, R. M. (2022). D-Carvone

Attenuates CCl<sub>4</sub>-Induced Liver Fibrosis in Rats by Inhibiting Oxidative Stress and TGF- $\beta$

1/SMAD3 Signaling Pathway. *Biology*, 11(5), Art. 5.

<https://doi.org/10.3390/biology11050739>

Olthoff, K. M. (2003). Hepatic regeneration in living donor liver transplantation. *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 9(10 Suppl 2), S35-41.

<https://doi.org/10.1053/jlts.2003.50229>

Pekala, J., Patkowska-Sokoła, B., Bodkowski, R., Jamroz, D., Nowakowski, P., Lochyński, S., & Librowski, T. (2011). L-carnitine—Metabolic functions and meaning in humans life. *Current Drug Metabolism*, 12(7), 667-678. <https://doi.org/10.2174/138920011796504536>

Puche, J. E., Saiman, Y., & Friedman, S. L. (2013). Hepatic stellate cells and liver fibrosis.

*Comprehensive Physiology*, 3(4), 1473-1492. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120035>

Reeves, H. L., & Friedman, S. L. (2002). Activation of hepatic stellate cells—A key issue in liver fibrosis. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 7, d808-826.

<https://doi.org/10.2741/reeves>

Reid, D. T., Reyes, J. L., McDonald, B. A., Vo, T., Reimer, R. A., & Eksteen, B. (2016). Kupffer Cells Undergo Fundamental Changes during the Development of Experimental NASH and Are Critical in Initiating Liver Damage and Inflammation. *PLoS ONE*, 11(7), e0159524.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159524>

Reyes-Esparza, J., Mendoza-Rivera, B., De la Cruz-Cordero, R., Duarte-Vázquez, M. Á., Rosado, J. L., & Rodríguez-Fragoso, L. (2014). Pharmacokinetic and pharmacological effects of  $\beta$ -hydroxyphosphocarnitine in animal models. *Pharmacology*, 94(1-2), 90-98.

<https://doi.org/10.1159/000366205>

Ríos-López, D. G., Aranda-López, Y., Sosa-Garrocho, M., & Macías-Silva, M. (2020). La plasticidad del hepatocito y su relevancia en la fisiología y la patología hepática. *TIP Revista*

*Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 23.*

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.225>

Rodríguez, M. J., Sabaj, M., Tolosa, G., Herrera Vielma, F., Zúñiga, M. J., González, D. R., & Zúñiga-

Hernández, J. (2021). Maresin-1 Prevents Liver Fibrosis by Targeting Nrf2 and NF- $\kappa$ B,

Reducing Oxidative Stress and Inflammation. *Cells*, 10(12), Article 12.

<https://doi.org/10.3390/cells10123406>

Roeb, E., Purucker, E., Breuer, B., Nguyen, H., Heinrich, P. C., Rose-John, S., & Matern, S. (1997).

TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat. *Journal of Hepatology*, 27(3),

535-544. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(97\)80359-5](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(97)80359-5)

Sánchez-Quevedo, J., Ocampo-Rodríguez, E., Alvarez-Ayala, E., Rodríguez-López, A., Duarte-

Vázquez, M. A., Rosado, J. L., & Rodríguez-Fragoso, L. (2022).  $\beta$ -Hydroxyphosphocarnitine

modifies fibrosis, steatosis and improves liver function in non-alcoholic steatohepatitis

induced in rats. *BMC Pharmacology & Toxicology*, 23(1), 75.

<https://doi.org/10.1186/s40360-022-00613-2>

Sayed, E. A., Badr, G., Hassan, K. A.-H., Waly, H., Ozdemir, B., Mahmoud, M. H., & Alamery, S.

(2021). Induction of liver fibrosis by CCl<sub>4</sub> mediates pathological alterations in the spleen

and lymph nodes: The potential therapeutic role of propolis. *Saudi Journal of Biological*

*Sciences*, 28(2), 1272–1282. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.068>

Schambeck, J. P. L., Forte, G. C., Gonçalves, L. M., Stuker, G., Kotlinski, J. B. F., Tramontin, G.,

Altmayer, S., Watte, G., & Hochegger, B. (2023). Diagnostic accuracy of magnetic

resonance elastography and point-shear wave elastography for significant hepatic fibrosis

- screening: Systematic review and meta-analysis. *PloS One*, 18(2), e0271572.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271572>
- Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C., & Weiskirchen, R. (2015). The carbon tetrachloride model in mice. *Laboratory Animals*, 49(1\_suppl), 4–11. <https://doi.org/10.1177/0023677215571192>
- Scorza, M., Elce, A., Zarrilli, F., Liguori, R., Amato, F., & Castaldo, G. (2014). Genetic Diseases That Predispose to Early Liver Cirrhosis. *International Journal of Hepatology*, 2014, 713754.  
<https://doi.org/10.1155/2014/713754>
- Serviddio, G., Bellanti, F., Tamborra, R., Rollo, T., Romano, A. D., Giudetti, A. M., Capitanio, N., Petrella, A., Vendemiale, G., & Altomare, E. (2008). Alterations of hepatic ATP homeostasis and respiratory chain during development of non-alcoholic steatohepatitis in a rodent model. *European Journal of Clinical Investigation*, 38(4), 245-252.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2008.01936.x>
- Shaker, M. E., Ghani, A., Shiha, G. E., Ibrahim, T. M., & Mehal, W. Z. (2013). Nilotinib induces apoptosis and autophagic cell death of activated hepatic stellate cells via inhibition of histone deacetylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(8), 1992-2003. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.033>
- Shiple, L. C., Axley, P. D., & Singal, A. K. (2019). Liver Fibrosis: A Clinical Update. *EMJ Hepatol Hepatology 7.1 2019*, 7(1), 105-117. <https://doi.org/10.33590/emjhepatol/10313576>
- Shin, G.-M., Koppula, S., Chae, Y.-J., Kim, H.-S., Lee, J.-D., Kim, M.-K., & Song, M. (2018). Anti-hepatofibrosis effect of *Allium senescens* in activated hepatic stellate cells and thioacetamide-induced fibrosis rat model. *Pharmaceutical Biology*, 56(1), 632–642.  
<https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1529801>
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P., & Duncan, S. A. (2010). Organogenesis and Development of the Liver. *Developmental Cell*, 18(2), 175-189. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.011>

- Slater, T. F., Cheeseman, K. H., Ingold, K. U., Rice-Evans, C., Sies, H., Norman, R. O. C., Hill, H. A. O., & Hill, H. A. O. (1997). Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 311(1152), 633-645. <https://doi.org/10.1098/rstb.1985.0169>
- Song, M., Chen, T., Prough, R. A., Cave, M. C., & McClain, C. J. (2016). Chronic Alcohol Consumption Causes Liver Injury in High-Fructose-Fed Male Mice Through Enhanced Hepatic Inflammatory Response. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 40(3), 518–528. <https://doi.org/10.1111/acer.12994>
- Spengler, U., Fischer, H.-P., & Caselmann, W. H. (2012). Chapter 34—Liver Disease Associated with Viral Infections. En T. D. Boyer, M. P. Manns, & A. J. Sanyal (Eds.), *Zakim and Boyer's Hepatology (Sixth Edition)* (pp. 629-643). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0881-3.00034-6>
- Steadman, R. H., Braunfeld, M., & Park, H. (2019). 31—Liver and Gastrointestinal Physiology. En H. C. Hemmings & T. D. Egan (Eds.), *Pharmacology and Physiology for Anesthesia (Second Edition)* (pp. 630-644). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48110-6.00031-4>
- Stoelting, R. K., & Hillier, S. C. (2012). *Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Tacke, F., & Zimmermann, H. W. (2014). Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *Journal of Hepatology*, 60(5), 1090-1096. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.12.025>
- Taddei, T., Mistry, P., & Schilsky, M. L. (2008). Inherited metabolic disease of the liver. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24(3), 278-286. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3282fcbc0f>

- Tan, Z., Sun, H., Xue, T., Gan, C., Liu, H., Xie, Y., Yao, Y., & Ye, T. (2021). Liver Fibrosis: Therapeutic Targets and Advances in Drug Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 730176. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.730176>
- Taru, M.-G., Neamti, L., Taru, V., Procopciuc, L. M., Procopet, B., & Lupsor-Platon, M. (2023). How to Identify Advanced Fibrosis in Adult Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) Using Ultrasound Elastography-A Review of the Literature and Proposed Multistep Approach. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 13(4), 788. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13040788>
- Teschke, R., Schwarzenboeck, A., & Hennermann, K.-H. (2008). Causality assessment in hepatotoxicity by drugs and dietary supplements. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 66(6), 758-766. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2008.03264.x>
- Toosi, A. E. K. (2015). Liver Fibrosis: Causes and Methods of Assessment, A Review. *Romanian Journal of Internal Medicine = Revue Roumaine De Medecine Interne*, 53(4), 304-314. <https://doi.org/10.1515/rjim-2015-0039>
- Trépo, C., Chan, H. L. Y., & Lok, A. (2014). Hepatitis B virus infection. *Lancet (London, England)*, 384(9959), 2053-2063. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60220-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60220-8)
- Troeger, J. S., Mederacke, I., Gwak, G.-Y., Dapito, D. H., Mu, X., Hsu, C. C., Pradere, J.-P., Friedman, R. A., & Schwabe, R. F. (2012). Deactivation of Hepatic Stellate Cells during Liver Fibrosis Resolution in Mice. *Gastroenterology*, 143(4), 10.1053/j.gastro.2012.06.036. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.036>
- Wang, J., Sun, J., Qin, T., Ren, X., Zhang, J., & Lu, X. (2023). Liver fibrosis from viral hepatitis: Advances in non-invasive diagnosis. *Cancer Insight*, 2(1), Art. 1. <https://doi.org/10.58567/ci02010002>

- Washabau, R. J., & Day, M. J. (Eds.). (2013). Chapter 61—Liver. En *Canine and Feline Gastroenterology* (pp. 849-957). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3661-6.00061-4>
- Weiskirchen, R., Weiskirchen, S., & Tacke, F. (2018). Recent advances in understanding liver fibrosis: Bridging basic science and individualized treatment concepts. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-921. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14841.1>
- Westin, M. a. K., Hunt, M. C., & Alexson, S. E. H. (2008). Short- and medium-chain carnitine acyltransferases and acyl-CoA thioesterases in mouse provide complementary systems for transport of beta-oxidation products out of peroxisomes. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(6), 982-990. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7576-6>
- Wiegand, J., & Berg, T. (2013). The etiology, diagnosis and prevention of liver cirrhosis: Part 1 of a series on liver cirrhosis. *Deutsches Arzteblatt International*, 110(6), 85-91. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2013.0085>
- Wiencke, K., & Boberg, K. M. (2011). Current consensus on the management of primary sclerosing cholangitis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 35(12), 786-791. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2011.04.007>
- Wolf, M. J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Egger, M., Wohlleber, D., Lorentzen, A., Einer, C., Schulz, S., Clavel, T., Protzer, U., Thiele, C., Zischka, H., Moch, H., Tschöp, M., ... Heikenwalder, M. (2014). Metabolic Activation of Intrahepatic CD8+ T Cells and NKT Cells Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Cancer via Cross-Talk with Hepatocytes. *Cancer Cell*, 26(4), 549-564. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.003>
- Wong, R. J., Liu, B., & Bhuket, T. (2017). Significant burden of nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis in the US: A cross-sectional analysis of 2011-2014 National Health and

- Nutrition Examination Survey. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 46(10), 974-980.  
<https://doi.org/10.1111/apt.14327>
- Wu, S., Liu, L., Yang, S., Kuang, G., Yin, X., Wang, Y., Xu, F., Xiong, L., Zhang, M., Wan, J., & Gong, X. (2019). Paeonol alleviates CCl4-induced liver fibrosis through suppression of hepatic stellate cells activation via inhibiting the TGF- $\beta$ /Smad3 signaling. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 41(3), 438–445. <https://doi.org/10.1080/08923973.2019.1613427>
- Wu, S., Wang, X., Xing, W., Li, F., Liang, M., Li, K., He, Y., & Wang, J. (2023). An update on animal models of liver fibrosis. *Frontiers in Medicine*, 10.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2023.1160053>
- Wynn, T. A., & Barron, L. (2010). Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Seminars in Liver Disease*, 30(3), 245-257. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255354>
- Yan, M., Hu, D., Wu, Z., Lai, J., Zhang, L., Zhang, H., Li, S., Bai, L., Yan, M., Hu, D., Wu, Z., Lai, J., Zhang, L., Zhang, H., Li, S., & Bai, L. (2022). Survival Fate of Hepatic Stem/Progenitor and Immune Cells in a Liver Fibrosis/Cirrhosis Animal Model and Clinical Implications. En *Animal Models and Experimental Research in Medicine*. IntechOpen.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.106220>
- Yoneda, A., Sakai-Sawada, K., Niitsu, Y., & Tamura, Y. (2016). Vitamin A and insulin are required for the maintenance of hepatic stellate cell quiescence. *Experimental Cell Research*, 341(1), 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.01.012>
- Zhang, L., Liu, C., Yin, L., Huang, C., & Fan, S. (2023). Mangiferin relieves CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Scientific Reports*, 13, 4172. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30582-3>
- Zhao, X.-A., Chen, G., Liu, Y., Chen, Y., Wu, H., Xiong, Y., Wang, G., Jia, B., Li, Y., Xia, J., Wang, J., Yan, X., Zhang, Z., Huang, R., & Wu, C. (2018). Curcumin reduces Ly6Chi monocyte infiltration to protect against liver fibrosis by inhibiting Kupffer cells activation to reduce

chemokines secretion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 868-878.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.028>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Licenciatura

Cuernavaca, Morelos, 19 de marzo de 2024

FF/D/SD/JLF/49/2024

Asunto: VOTOS APROBATORIOS

**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE  
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES  
UAEM**

P R E S E N T E

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo “**Efecto de la  $\beta$ -Hidroxifosfocarnitina en la fibrosis hepática**” presentado por el pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Abner Guzmán Casarrubias (10024523)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**Jurado**

Dr. Antonio Monrroy Noyola

Dra. María Antonieta Gómez Solís

Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza

*Firma electrónica*

Dr. Alfonso Leija Salas

Dr. Jesús Rivera Islas



Atentamente  
***Por una humanidad culta***

**M.P.D. REYNA AMERICA SERRANO LÓPEZ  
SECRETARIA DE DOCENCIA**

C.i.p. – Archivo digital  
FSLs/bedm



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio 61,  
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3698 / licenciatura\_ff@uaem.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ** | Fecha:2024-03-19 17:54:16 | Firmante

wjfOJFKSRt2PUPps7H0fzw2FppNnKMM0sisRIs5BzqMBcGUImqqJbPA6Ztu7Cb/eqp/BvxLLymjBxd615uEVwolc9vAmvS6lJlGJXolxAK7nw5tyS+OzM69jsMgT+i22vjAgWCN4s3gUJMFdJYhYTjmFCHmr/2FJUBeAaNuM/Baz6mqUL6nC/OLlca8pVzjU2FXyu1qRi333ZG0L9hK7a4fuHU5MgtSWj13pE6MumchkVJwR+YuFspY/n/AgFhFMethT/J+gwwMC+IX6UkBP289w1CagNph41BcqnFvqbfT+msLQ8hHOLtHaGDI9Ds7+n+0GL3iXuCb4Aj7CSWuFw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[2OyMKGDNh](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/EysXBKFzYxmUuVZWLelyYtQ4Jv7ICAuS>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**JESUS RIVERA ISLAS | Fecha:2024-04-12 17:51:29 | Firmante**

wSTz6mgUVhp4q5h4n9l2gNjZtBOFD3Gx2sqKBOi0OU73t2gLx9bZPorzi9K3VVEndD07TtlwX/aUgD80kKbeyond6L7XWSzAX0ZXh4uvnNTzZs5GJsi8ych1q773qCDFZOkMI4I  
Qk88tqnurfJW4a6eixkX9+pJ2+pq/EV5u778jykHj8wckCs1rCJk3JtOtfWm2pXVm5jNcgEgXFBWWim+3VrxhrvISBLQ1HHH79iq8E7Aqo5dS/LKf7yiRyy5jZ9MCqoT+tyVEpQJmG  
qOABNnpdQ4nSZ16rX/pdEshGuR652QCdjI02ys/DvNm1pp3qhxLh4jb9IE7111kvw==

**ANTONIO MONROY NOYOLA | Fecha:2024-04-12 18:12:31 | Firmante**

hL511ft5pe2zcR71JC98C5UWj5MoZBWMJASPZ/Z2ikZ7I0fvoVYVDYIt9OuUAOjLrq/zz+yar++QHIEGzGCGcyAz5QJsfDauTbgORHW/JfCNAJ399jvaTrvHwB3diNqopdaBSkyIO  
SID7a30qRe3xTU11+Kil0Oegaful8nnAFgyM29j2rdxkUGEL489V2tshvH9KkCH9KuFprX5oColx942o0HFbqT0Z4GlszD7LJsDbnH5udntFq7yWorizAo4bhV7GRtYGAz6ZBluyVZS  
VK4gH8takvndbqeuNuVVA5FZuYua0UJbRPKPe4hgAwBADTZ0fLg5qlll5byGn9w==

**JESSICA NAYELLI SANCHEZ CARRANZA | Fecha:2024-04-13 01:36:49 | Firmante**

KiCa/DMDZjELeXaR0d9U9vA0OeWJcHIULQAJfGBCc2W5Qs3GDN8o4BD8FDK50Q56B8HyL8QPzPh4MaZLc0P9zMMLJKRbruY0HdGA8mysEtW3Sy3WgTKxNmnQMokXTR  
MAscdUNlyOdsxrhhnGbE0u2FeEfKGDZxtScdq0Aikyysok9c62/l4cxwPwoNQ14f6qTO/zL/V7yFsE253A1prirt2KICw+2X0xZX7V6hUWLRHVBFn8tdcCSEiZeSTERTaWmNd269H  
Aqe4uEBV5/1crDZCHEVkv/81Pth98U1UEtP8ebWkP0NNP1VL9SzcG3N8wFFHp8Li07ppdQEU+CsvQ==

**ALFONSO LEIJA SALAS | Fecha:2024-04-15 16:06:43 | Firmante**

g4xKtKyJhN259UGphRX+b3My6Di4xEQxGBDIQWShbQCE4V9ufld2eRN66TtM61Rz+z1MopGcMVUroqAxWpEg28rBDKIK8uUVHx/TIEyrlmrXpzKdqQVsMdr4oZQOpZi8Moo2V2  
kjOPUXJefWzNfHUCxwdVcztpZOUdqj/QN9FbRrOW3WMPa70XmkJLEo2I7XRVAIuYHZTxq7TD0CnaOyLakzpwtn125DKXDZaKt0N0OCIVooBpMZLPVMfbP1hHfOEPb0ImB3  
D5/q2RGdzLSNvVtbWD/2uwtPgYrrJPw0MFWN8paDqjFAtvepS6n8ctmWXo1zHWPIZoKnLtGBtTakQ==

**MARIA ANTONIETA GOMEZ SOLIS | Fecha:2024-04-22 01:00:12 | FIRMANTE**

ISjDHmR+KCxdC5xB6dnN/JjWGRleUs73Im2GYNV68ZkI5k9J9WM7K/7IDVq4tZYQjGwj9FCdYPB4Tu1jMqM0a9n9waka35DJOOKomLJ1L6zy7Sch2dZB3fyBz8WsUQ176TMHq  
GAiog2zHOzWxtKWQAsvN8m7VeVtCbQ5nsrOQ4+fWZzmFqhG3poP3SofbDTgF+AVZwJQHBf5wPRzSKSqzjoOL0cW8A8fE0wNWRoJIHhQmte9uZtJcMhi6LHyhJQvnsdoH1/  
MEdKzHFbCivwr+qior9Bakw3vvsVa78/LZ9hLDXxB7KKg7UD9timw36OCTul3TSq+VhgRNxha9lpQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



2tx4KgLQN

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dqgplvW1ROdnjuGb1aOUh3p3YNpjoJhn>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029