

## INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM) Unidad de Investigación en Medicina Experimental Dr. Ruy Pérez Tamayo, Facultad de Medicina, UNAM ubicado en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"

**Proyecto:** Estandarización del daño hepático inducido por Tioacetamida en un modelo murino: dimorfismo sexual, dosis efectiva y progresión de daño.

**Periodo:** 23 de enero de 2025 al 23 de julio de 2025

**Responsable del Proyecto:** Dra. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes

**Asesor interno:** Dra. Laura Estela Castrillon Rivera

**Asesor externo:** Dra. Esperanza Gabriela Gutiérrez Reyes



**Jesús Alejandro Dorantes Álvarez** Matricula: 2193068836  
Licenciatura: **Química Farmacéutica Biológica**  
**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

Tel: **55 6725 2151**

Cel.: **55 2743 4295**

Correo electrónico: [dorantesalvarezjesus2@gmail.com](mailto:dorantesalvarezjesus2@gmail.com)

## Introducción

El hígado es un órgano grande y multifuncional de vital importancia para el funcionamiento adecuado del cuerpo humano, <sup>(1)</sup> donde; el consumo excesivo del alcohol, así como la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus tipo 2, uso y abuso de fármacos, infecciones virales, parásitos, bacterias y hongos, son factores que modifican el correcto funcionamiento hepático ocasionando alteraciones locales y sistémicas. <sup>(2,3,4)</sup>

Se han descrito varios eventos morfológicamente distinguibles en las enfermedades hepáticas, los cuales pueden existir de forma simultánea o no, tales como son la esteatosis como primer evento (acumulación de lípidos > 5%) y si el estímulo negativo continua, se desarrolla la esteatohepatitis (esteatosis en las células hepáticas e inflamación crónica) pudiendo evolucionar hasta fibrosis (acumulación de tejido conectivo), siendo la etapa más avanzada, la cirrosis hepática (cicatrización) y finalmente el hepatocarcinoma o cáncer de hígado. <sup>(5,6,7,8,9)</sup>

Las enfermedades hepáticas han sido responsables de aproximadamente 3 millones de muertes en el mundo, donde las principales causas de muerte son: la cirrosis hepática y hepatocarcinoma. <sup>(10,11)</sup> En México, la cirrosis hepática es la cuarta causa de muerte, siendo el alcohol uno de los principales factores, afectando principalmente hombres de 35 a 55 años y con el paso de los años las enfermedades concomitantes como la obesidad, las alteraciones metabólicas han modificado la epidemiología de cirrosis en el país y en el mundo. Además, una problemática que surge es que no se conocen los índices precisos sobre la mortalidad por enfermedades hepáticas, ni el estadio en la cual esta se encuentra, por lo que es necesario llevar a cabo estudios de las enfermedades hepáticas. <sup>(12,13)</sup>

Una de las herramientas utilizadas para estudiar las enfermedades hepáticas es el uso de animales de laboratorio como cerdos, conejos, ratones y ratas las cuales suelen ser tratadas de diversas formas, como son dietas (ricas en metionina y colina o altas en grasas), inoculación de parásitos, hongos, bacterias o virus y con tratamientos farmacológicos como acetaminofén, tetracloruro de carbono o tiocetamida (TAA) para simular un daño hepático (ya sea esteatosis, esteatohepatitis, fibrosis o cualquier evento morfológico) para estudiar las características de las enfermedades hepáticas, lo cual a su vez ha permitido evaluar una variedad de compuestos hepatoprotectores, siendo que en estos modelos usualmente se reporta el uso de machos preferentemente. <sup>(14,15)</sup> A la fecha, solo se han publicado tres artículos de 1988, 2019 y 2020, que estudian las diferencias de progresión de daño hepático entre ratas hembra y macho, <sup>(16,17,18)</sup> en los cuales se reporta el uso de la rata de la cepas Lewis, Wistar y Sprague-Dawley. No obstante, los tiempos de estudio solo reportan etapas muy específicas del daño hepático y la administración de dosis variables. Por lo que en el presente trabajo se llevará a cabo la simulación del daño hepático con el compuesto tiocetamida en ratas hembras y ratas macho de la cepa Wistar desde etapas tempranas (esteatosis, esteatohepatitis) intermedias (fibrosis) y avanzadas de la enfermedad (cirrosis y/o hepatocarcinoma); comenzando por la estandarización de la dosis efectiva de daño e identificar las diferencias de progresión de daño hepático en este modelo.

## Planteamiento del problema y justificación

Las enfermedades hepáticas imponen un problema de salud humana tanto en México como en el mundo, ya que comúnmente se asocian con una morbilidad y mortalidad significativas. El único tratamiento estándar actual para la enfermedad hepática crónica, como la cirrosis hepática es el trasplante de hígado, con los avances en las técnicas quirúrgicas, los cuidados posoperatorios, la inmunosupresión y la terapia antiviral han permitido un progreso notable en la supervivencia de estos pacientes.<sup>(19,20,21)</sup> No obstante, lamentablemente los trasplantes suelen presentar ciertas problemáticas como lo es la falta de donadores, siendo que solamente 11% de los pacientes reciben el trasplante y solo entre el 8-9% son exitosos, derivado que algunos, pueden presentar complicaciones vasculares, anastomosis de la arteria y la vena porta, del drenaje venoso, biliares. Sin lugar a dudas, el estudio de fisiopatología de las enfermedades hepáticas es crucial para identificar blancos terapéuticos y/o desarrollar nuevas terapias y estrategias preventivas.<sup>(22,23)</sup>

Una herramienta experimental es el uso de modelos murinos, ya que son confiables, reproducibles y dependiendo de la administración de un agente o dieta puede presentar los eventos morfológicamente distinguibles parecidos al humano. Tal es el caso de la TAA, un agente útil que se ha estado estudiando desde 1988, el cual actúa simulando la cirrosis por el consumo de alcohol, generando especies reactivas del oxígeno y con esto dañando los hepatocitos y los colangiocitos. Aunque, las dosis no están del todo estandarizadas, la mayoría de los experimentos utilizan dosis de 100-200 mg/kg, tres veces por semana administrados por vía intraperitoneal (I.P.)<sup>(24,25)</sup> Con esto, el laboratorio tiene la finalidad el empleo de modelos murinos, así como la estandarización de la dosis efectiva para generar el daño hepático, ya que es fundamental para el entendimiento del origen, fisiopatología y progresión de la enfermedad hepática entre ratas macho y hembra de la cepa Wistar.

## Antecedentes

La TAA es un compuesto órgano sulfurado que se utiliza comúnmente como fungicida, pertenece a los carcinogénicos de clase 2B. Debido a su naturaleza el compuesto puede disolverse fácilmente en agua, además de producir daño hepático agudo, por lo que es muy utilizado en modelos experimentales en ratas, ya que cuando este compuesto se activa a sulfoxido de tiocetamida, posteriormente a dióxido de tiocetamida-S,S, que conduce a la generación de radicales peróxido y así producen las especies reactivas del oxígeno (ROS, en español ERO). Estas ROS son capaces de iniciar reacciones de oxidación y generar metabolitos, los cuales son los causantes de la lesión hepática.<sup>(26,27)</sup>

Es de importancia establecer un esquema de dosificación que genere esta producción de ROS, induzca el daño hepático y no sea mortal para el animal. Un gran punto de partida para determinar estos esquemas de dosificación adecuados para la generación de daño hepático está documentado desde el año 1988 con el estudio de Lawrence *et al*/los cuales utilizaron una única dosis de 200 mg/kg de TAA en ratas hembra y macho de la cepa Sprague-Dawley, sugiriendo las diferencias

sexuales de los animales observando mayor daño en los machos, no obstante, la discusión y las implicaciones de estos hallazgos no fueron estudiados a detalle, y quedo solo como un reporte aislado. <sup>(16)</sup> Años posteriores, en un esquema de dosificación distinta a la de Lawrence *et al*, el grupo de trabajo de Bludovska en 2013, administraron 200 mg/kg de TAA, tres veces por semana durante 12 semanas en ratas Wistar hembra mostrando incrementos en la producción de los ROS <sup>(28)</sup>, pero sin comparar con ratas macho. Otro estudio en 2014 de Rajamani *et al* presenta la misma dosis, pero con dos parámetros distintos de tratamiento: cada tercer día por un tiempo de 60 días y en este estudio solo se utilizaron ratas Wistar macho.<sup>(29)</sup> Con estos antecedentes podemos determinar que los rangos de dosis de tratamiento con TAA para generar daño hepático son 200 mg/kg a diferentes tiempos para poder simular los distintos eventos morfológicos. Además, se presentan 2 estudios que dan información acerca de las diferencias de progresión hepática entre machos y hembras, uno en 2019 con ratas Sprague-Dawley las cuales fueron administradas con dosis de TAA de 150 mg/kg diario, en las cuales una mayor lesión hepática en ratas macho fue observada.<sup>(17)</sup> Mientras que en ratas Lewis, se demuestran un notable dimorfismo sexual con respecto al daño hepático inducido por TAA, donde reportan los mismos casos acerca de la susceptibilidad de ratas macho, además en el mismo estudio se les retiraron los ovarios a las ratas hembra y presentaron la misma lesión hepática que las ratas macho, por lo que concluyen que las hormonas sexuales tienen implicación en la protección al hígado como es el caso del estrógeno y aumento en el daño hepático como es en el caso de la testosterona. <sup>(15)</sup> Lamentablemente se tiene muy poca evidencia de las implicaciones de las hormonas en el desarrollo de las enfermedades hepáticas que determinen el dimorfismo entre macho y hembra, solo hay tres estudios en ratas SD o Lewis. De manera inesperada no existen estudios de dimorfismo sexual y susceptibilidad de daño hepático en la rata Wistar a pesar de ser la primer cepa en ser "estandarizado" el uso de la TAA y la importancia del modelo para su uso en investigación preclínica, estudios genéticos o incluso elaboración de mecanismos de señalización de vías <sup>(30)</sup>. En otras palabras, no hay estudios documentados de estas ratas.

### **Objetivo General**

Determinar la dosis efectiva de tiocetamida para generar daño hepático e identificar las diferencias de progresión de daño hepático en cuanto al sexo.

### **Objetivos específicos**

1. Estandarizar la dosis efectiva de daño de 200 y 100 mg/kg de tiocetamida (TAA) a ratas Wistar macho y hembra.
2. Determinar el peso de los animales durante todo el estudio.
3. Determinar el índice hepático de los animales de estudio.
4. Comparar la evolución de la enfermedad hepática en ratas Wistar macho y hembra inducidas por TAA mediante descripción macroscópica de hígado de los grupos CT y TAA.

5. Comparar la evolución de la enfermedad hepática en ratas Wistar macho y hembra inducidas por TAA mediante análisis histológico hepático de los grupos CT y TAA.
6. Comparar el perfil bioquímico y pruebas de función hepática entre ratas TAA y CT.

## **Materiales y Métodos**

### **Consideraciones Éticas**

El protocolo fue aprobado por las comisiones de Ética e Investigación del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" (HGM-DG-149-DI-2022; Di/22/122/05/09) y de la Facultad de Medicina de la UNAM (FMED/CEI/PMSS/051/2022; FM/DI/006/2022) siguiendo las normas éticas para el cuidado y uso de animales de laboratorio y se garantizará el cumplimiento de las normas éticas en todas las etapas del estudio.

### **Animales de Estudio**

Para el presente estudio, se formarán grupos aleatorios de ratas Wistar macho y hembra, con un peso corporal entre 150-250 gramos, las cuales se agruparán en dos condiciones:

- **Grupo Tioacetamida (TAA):** Este grupo consistirá en 60 ratas (30 machos y 30 hembras) que recibirán 3 dosis de 100 y otro grupo con 200mg/kg del compuesto tioacetamida durante 4, 6, 8, 19 y 12 semanas con 3 ratas cada grupo, la cual será disuelta en agua desionizada y administrada por vía intraperitoneal (I.P.).
- **Grupo control (CT):** Este grupo también consistirá en 60 ratas (30 machos y 30 hembras) en el mismo periodo de tratamiento: 4, 6, 8, 19 y 12 semanas con 3 ratas cada grupo, a los cuales se les administrará una solución salina estéril como control, administrada por vía intraperitoneal del mismo volumen que el grupo TAA, manteniendo así las condiciones de administración constantes entre los grupos.

### **Condiciones de Cuidado y Monitoreo**

Todas las ratas serán mantenidas en condiciones controladas de temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y humedad ( $50 \pm 10\%$ ) en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se les proporcionará agua y alimento *ad libitum* durante todo el período del experimento formulado para satisfacer las necesidades nutricionales generales de los animales. Además, se realizará un monitoreo diario de los animales para observar signos de malestar, cambios en el comportamiento o cualquier efecto adverso asociado con el tratamiento. El peso corporal de cada rata se registrará semanalmente para evaluar cualquier cambio asociado con el tratamiento.

### **Eutanasia y Procedimientos Post-mortem**

Al finalizar el tratamiento de acuerdo con la semana de estudio, se llevará a cabo la eutanasia de los animales a partir de una inyección por vía intraperitoneal de pentobarbital sódico con dosis de 60 mg/kg. Posteriormente, se realizará una laparotomía exploratoria para examinar el estado general de los órganos internos y se procederá con la recuperación del hígado de cada rata para su posterior análisis. Los hígados serán cuidadosamente extraídos, pesados, limpiados de tejido circundante, posteriormente fijados en formol para su conservación y análisis histopatológico.

### **Análisis de bioquímicos**

Se extraerán 3 ml de sangre del animal por punción cardiaca para posteriormente centrifugarla y obtener el suero para realizar las pruebas bioquímicas que constan de PFH's: Aspartato aminotransferasa (AST), Alanino aminotransferasa (ALT), Gamma-glutamil transferasa (GGT), Lactato deshidrogenasa (LDH), Fosfatasa alcalina (ALP), Albumina (ALB) y Proteínas totales (TP), perfil lipídico: Bilirrubina directa (DBIL), Bilirrubina total (TBIL), Colesterol (CHOL), Triglicéridos (TRIG), Lipoproteína de alta densidad (HDL-c) y Lipoproteína de baja densidad (LDL-c) además de la Química sanguínea: Creatinina (CRE), Nitrógeno ureico en sangre (BUN) y el Ácido Úrico (AU).

### **Evaluación Macroscópica y Microscópica**

Cada hígado extraído será sometido a una descripción macroscópica detallada, donde se observarán y registrarán características como tamaño, color, textura y cualquier lesión visible. Se realizarán fotografías para documentar el aspecto macroscópico de los hígados, lo que permitirá una posterior comparación entre los grupos de tratamiento y control. Posteriormente, los hígados se llevarán a procesar para inclusión en parafina, se cortarán en secciones de 5 micrómetros de grosor y se teñirán con hematoxilina-eosina (H&E) y tricrómica de Masson para la evaluación histopatológica, para así identificar características del daño hepático, como depósito de lípidos, utilización de la escala METAVIR para la evaluación de la inflamación, fibrosis y otros cambios patológicos asociados con la TAA.

### **Análisis Estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se utilizará una prueba de Multi T-test para evaluar las diferencias significativas en el peso corporal y otros parámetros cuantitativos entre los grupos TAA y CT. Este análisis permite determinar si las diferencias observadas son significativas en función de la variable del tratamiento y del sexo de las ratas. Además, se realizará una curva de mortalidad utilizando el Log-Rank test para comparar las tasas de mortalidad entre los grupos tratados con TAA. Este test permite evaluar si la supervivencia de los animales entre las dos de TAA 200 y 100 mg/kg para ver que si es significativamente diferente a la del grupo CT.

## **Metas alcanzadas**

- Estandarizar la dosis efectiva de daño de 200 y 100 mg/kg de tiocetamida (TAA) a ratas Wistar macho y hembra – Cumplimiento total.
- Determinar el peso de los animales durante todo el estudio – Cumplimiento total.
- Determinar el índice hepático de los animales de estudio – Cumplimiento total.
- Comparar la evolución de la enfermedad hepática en ratas Wistar macho y hembra inducidas por TAA mediante descripción macroscópica de hígado de los grupos CT y TAA – Cumplimiento total.
- Comparar la evolución de la enfermedad hepática en ratas Wistar macho y hembra inducidas por TAA mediante análisis histológico hepático de los grupos CT y TAA – Cumplimiento total.
- Comparar el perfil bioquímico y pruebas de función hepática entre ratas TAA y CT – Cumplimiento parcial.

## **Resultados**

### **Evaluación de la sobrevivencia a diferentes dosis de TAA en ratas macho y hembra**

Para analizar la tasa de sobrevivencia se llevó a cabo un registro de decesos de las ratas macho y hembra administradas con TAA con dosis de 200 y 100 mg/kg mediante el análisis estadístico Long rank test obteniendo resultados en forma de porcentaje, donde se encontró que la dosis de 200 mg/kg generaba la mortalidad del 60% de las ratas macho en las primeras semanas del estudio, y posteriormente entre las semana 3 y la semana 6 (Figura 1), mientras que las ratas hembras no presentaron cambios en la sobrevivencia, Mientras que la dosis de 100 mg/kg no generó mortalidad en ninguno de los dos grupos (Figura 2). Con estos resultados y por motivos éticos y de recursos del estudio, se determinó no utilizar la dosis de 200 mg/kg, además que no nos permitiría llevar a cabo la comparación de daño hepático a diferentes etapas por sexo, derivado de la tasa de mortalidad.

### **Comparación de peso corporal, del hígado y índice hepático en ratas macho y hembra tratadas con TAA.**

Con los resultados obtenidos en la sobrevivencia de las ratas a diferentes dosis, se encontró que no se podía llevar a cabo la comparación de rata macho y hembra con dosis de 200 mg/kg debido a la falta de información entre semanas, por lo que los resultados obtenidos con la dosis de 100 mg/kg serán tomados en cuenta para realizar la comparación de daño, como fue mencionado previamente. Se realizó un registro de peso cada semana, se encontró que hay un aumento de pesos de rata \* $p \leq 0.001$ , (Figura 3) y de hígado de rata (Figura 4) en las ratas macho y ratas hembra tratadas con TAA \* $p \leq 0.001$ , aunque las ratas hembra presentaron incrementos de pesos a semanas iniciales de tratamiento, se estabilizaron llegando

a las 12 semanas, todo esto comparado con los controles. En cuanto al índice hepático, el cual fue calculado como: peso del hígado/peso corporal total, se encontró que durante las fases iniciales del tratamiento no se observaron cambios significativos comparados con el grupo control; sin embargo, en la semana 12, tanto los machos como las hembras presentaron una disminución en el índice hepático. (Tabla 1)

### **Cambios macroscópicos de ratas tratadas con TAA (100 mg/kg de peso)**

Para evaluar los cambios macroscópicos en los hígados de los animales, se llevó a cabo un registro fotográfico macroscópico, donde en las ratas macho (G,H,I,J,K,L) presentaron cambios morfológicos más distinguibles a partir de la 4 semana de tratamiento, como son: coloración café oscuro heterogéneo, bordes irregulares, aumento del tamaño y la presencia de nodulación tisular comparados con el hígado control, mientras que las ratas hembra (A,B,C,D,E y F) presentan cambios más discretos. (Figura 5)

### **Comparacion histopatologica de la progresión de daño hepatico en ratas macho y hembra.**

Se llevó a cabo en análisis de las laminillas H&E y tricromía de Masson de las ratas macho (F,G,H,I,J) y hembra (A,B,C,D,E), donde en las laminillas de H&E a las 4 semanas en ratas macho hay presencia de daño de la estructura en el parénquima como en hepatocitos además de la presencia de células inflamatorias, mientras que las ratas hembras presentan zonas con grasa; a las 6 semanas en los machos presentan una posible hiperplasia de los conductos biliares, mientras que en las ratas hembras se logra apreciar bilis, células inflamatorias y daño en hepatocitos; a las 8 semanas en los machos se logra apreciar un encapsulamiento de ciertas zonas del parénquima, mientras que en ratas hembra hay mayor presencia de células inflamatorias; a las 10 semanas se presenta más células inflamatorias y aumentan las zonas de encapsulamiento del parénquima, mientras que en las ratas se presenta una posible hiperplasia de los conductos biliares así como desorganización del parénquima; finalmente a las 12 semanas en ratas macho se siguen presentado este encapsulamiento del parénquima además de presentar muerte celular, mientras que a las ratas hembra apenas se empiezan a formar este encapsulamiento y aumento de la presencia de células inflamatorias.

En las laminillas de tricromía de Masson, en los machos y las hembras a las 4 semanas se presenta distribución normal matriz extracelular; a las 6 semanas los machos presentan acumulación excesiva de la matriz extracelular en la vena porta así como la extensión de la matriz, mientras que las ratas hembra presentan un ligero aumento en la matriz; a las 8 semanas los machos se presenta en engrosamiento de la matriz extracelular, mientras que en las ratas hembra apenas se logra apreciar la acumulación de matriz extracelular en las venas porta; a las 10 semanas en las ratas macho se logra apreciar la formación de puentes fibrosis, mientras que en las ratas hembra se presenta el engrosamiento de la matriz extracelular y finalmente a las 12 semanas en las ratas macho se presenta la

formación de nódulos, así como la posible muerte celular de hepatocitos y colangiocitos, mientras que en las ratas hembra se logra apreciar la formación de los puentes fibróticos y la formación de nódulos, todo esto comparado con el grupo control.

### **Análisis de las PFH's, PL y QS**

Se llevó a cabo el análisis de las pruebas de funcionamiento hepático (PFH's), perfil lipídico (PL) y de la química sanguínea (QS) entre los grupos TAA machos y TAA hembras contra los CT, se graficaron los datos y se evaluó por semanas de tratamiento con una  $*p \leq 0.001$ . Se encontró que no hay cambios significativos entre machos y hembras tratados con TAA, pero comparándolos con los controles tuvieron cambios significativos a lo largo de las semanas de tratamiento. Donde a las 4 semanas se presentan cambios en las PFH's, PL y QS de las ratas hembra: ALP, DBIL, HDL, LDL, GLUC y AU; y en ratas macho: TP, DBIL, TRIG, HDL, LDL, CRE y AU. (Figura 5)

En la semana 6 se presentaron cambios en las ratas hembra: LDH, ALB, GLUC, BUN, AU; y en ratas macho: LDH, ALP y AU. (Figura 6)

En la semana 8 se presentaron cambios en las ratas hembra: AU; y en ratas macho: LDH, ALP y AU. (Figura 7)

En la semana 10 se presentaron cambios en las ratas hembra: TBIL, CRE, AU; y en ratas macho: CRE, GLUC y AU. (Figura 8)

En la semana 12 se presentaron cambios en las ratas hembra: AU; y en las ratas macho: AST, ALP, CHOL, TRIG y AU. (Figura 9)

Al analizar los datos correspondientes a las semanas de tratamiento, se observó que durante las primeras 4 semanas, las ratas hembra que presentaron esteatosis mostraron una disminución en los niveles de ALP, HDL, LDL y GLUC, lo que refuerza la presencia de alteraciones hepáticas compatibles con esteatosis. Por su parte, en los machos que desarrollaron esteatohepatitis, los datos bioquímicos indicaron una disminución en TP, TRIG, HDL y LDL, estableciendo así una relación entre las alteraciones estructurales y funcionales hepáticas.

A las 6 semanas, en las hembras con esteatohepatitis se evidenció una disminución en LDH y GLUC, junto con un aumento en BUN. En los machos, con hallazgos histológicos compatibles con fibrosis estadio 1 (F1), se observó una disminución en LDH y un aumento en ALP.

A las 8 semanas, las ratas hembra presentaron indicadores histológicos compatibles con fibrosis estadio 1 (F1), acompañados de una disminución en AU. En los machos, que alcanzaron fibrosis estadio 2 (F2), se registró un aumento en LDH, ALP y un leve incremento en AU.

A las 10 semanas, las hembras mostraron hallazgos histológicos correspondientes a un grado de fibrosis entre F2 y F3, asociados a disminuciones en CRE, GLUC y AU, además de un leve aumento en TBIL. En los machos, con fibrosis estadio 3 (F3), se observaron disminuciones en CRE, GLUC y AU.

Finalmente, a las 12 semanas, las hembras con fibrosis estadio 3 (F3) mostraron una disminución en AU. En los machos, se evidenciaron lesiones avanzadas compatibles con fibrosis estadio 4 (F4), así como características histológicas de hepatocarcinoma/colangiocarcinoma, junto con aumentos en AST, ALP y CHOL, y disminuciones en TRIG y AU.

Cabe destacar que, al momento de realizar los análisis, se identificó hemólisis en varias muestras, lo cual podría haber afectado la precisión de algunos parámetros bioquímicos.

## Discusión

Se sabe que las enfermedades hepáticas han presentado un problema de salud muy importante a nivel mundial por sus múltiples factores de riesgo. Además, en los últimos años se ha presentado una alta prevalencia de estas, lo cual refleja la necesidad de mejorar la prevención, el diagnóstico y tratamiento, lamentablemente estas enfermedades hepáticas son silenciosas, no se presentan síntomas hasta etapas avanzadas de daño, solamente cuando un paciente está en estado grave. En este contexto los modelos experimentales, principalmente los murinos, nos permiten reproducir de forma controlada las diferentes etapas de daño, facilitando su estudio, comprender mejor la progresión y poder evaluar una posible terapia. <sup>(31,32,33)</sup>

En concordancia con los estudios en modelos murinos con dosis de 200 y 100 mg/kg de peso corporal de TAA, se encontró que con la dosis de 100 mg/kg de peso corporal 3 veces por semana, durante 4,6,8,10 y 12 semanas es un esquema de dosificación adecuado que puede presentar las distintas etapas de daño hepático ya que no genera mortalidad en las ratas macho previamente descritas en otros modelos utilizando dosis de 200 mg/kg de peso corporal. También se encontró que las ratas macho aumentan de peso durante las semanas de evaluación sin importar el tratamiento, esto puede deberse a la ganancia de peso del hígado. <sup>(34,16)</sup> Si bien se ha comentado en la literatura que la TAA genera una disminución de peso con TAA, tanto para machos como para hembras, esto puede deberse al esquema más agresivo de dosificación (200 mg/kg de peso corporal). <sup>(35,36)</sup>

Respecto a las características macroscópicas del hígado, encontramos que las ratas machos presentaron cambios más evidentes en cuanto a color, tamaño, textura y superficie. Estos aspectos morfológicos son parámetros relevantes que continúan siendo herramientas útiles para la evaluación clínica a nivel macroscópico, ya que permiten inferir el estado funcional del órgano. De esta

manera, es posible establecer comparaciones entre un hígado sano y uno con alteraciones patológicas, facilitando el diagnóstico y la comprensión de diferentes enfermedades hepáticas.<sup>(37)</sup> Adicionalmente, en el análisis histológico con tinción H&E, se observaron los cambios previamente descritos en el análisis macroscópico, destacando una disposición irregular en la estructura del parénquima desde la semana 4, presentando indicios de esteatohepatitis en machos y esteatosis en hembras, ejemplificando el daño a nivel celular de las ROS que genera el compuesto.<sup>(38)</sup> Además, evaluando las histologías Tricromica de Masson se presentó aumento anormal de la matriz extracelular especialmente en zonas periportales, lo que indica la presencia de fibrosis en etapa inicial a las 6 semanas en machos y 8 en hembras, además de poder clasificar con ayuda de la escala METAVIR podemos determinar las etapas de daño a diferentes temporalidades de tratamiento, donde a la semana 4 para ratas hembra se presenta esteatosis y en ratas macho se presenta esteatohepatitis; semana 6 hembras esteatohepatitis, machos F1, semana 8 hembras F1, machos F2, semana 10 hembras F2, machos F3 y semana 12 hembras F3-F4, machos F4/Hepatocarcinoma/Colangiocarcinoma, con esto podemos remarcar que hay diferencia de daño de 2 semanas entre hembra y macho.<sup>(41)</sup>

El análisis de los bioquímicos se identificaron ciertas alteraciones significativas en algunos bioquímicos, aunque estos no fueron concordantes con lo reportado de la literatura. En estudios previos se ha documentado un **aumento** en ciertas enzimas hepáticas y marcadores de daño tisular; sin embargo, en nuestro caso en la mayoría se presentó una **disminución** en algunos de estos parámetros. Esta discrepancia puede atribuirse a una interferencia analítica que es la hemólisis de las muestras, que pueden generar alteraciones en la medición de los bioquímicos como AST o LDH.

Por otro lado, al comparar nuestros hallazgos con la literatura, se identificó la ausencia del análisis de un bioquímico clave: el ácido úrico (AU), el cual ha sido ampliamente relacionado con procesos de estrés oxidativo, inflamación y disfunción renal. Su inclusión en futuros estudios resulta fundamental para comprender con mayor profundidad el impacto sistémico del daño hepático. Su inclusión en futuros estudios resulta fundamental para comprender con mayor profundidad el impacto sistémico del daño hepático.

A pesar de esta limitación, es importante resaltar que varios bioquímicos evaluados mostraron una relación clara con los hallazgos histológicos. Entre ellos se encuentran: ALP, AST, GLUC, HDL, LDL, TRIG, CRE, BUN, TBIL, PT, CHOL y AU, cuyos patrones reflejaron, en distintos momentos, el grado y tipo de daño hepático. Adicionalmente, se observó que las **hembras presentaron alteraciones tempranas y progresivas en el metabolismo de la glucosa, lípidos y ácido úrico**, asociadas con estadios de esteatosis y fibrosis intermedia. En contraste, los **machos mostraron incrementos más marcados de enzimas hepáticas (ALP, AST) y lípidos totales** en estadios más avanzados, compatibles con fibrosis estadio 4 (F4) y con el desarrollo de lesiones tumorales. Sin embargo, estos patrones deberán ser corroborados en futuros estudios.

Con esto, podemos decir que, aunque los valores bioquímicos no coincidieron con lo reportado en la literatura, la concordancia entre algunos parámetros y las alteraciones histológicas observadas en este estudio aporta evidencia complementaria y refuerza la importancia de integrar diferentes tipos de análisis para una evaluación más precisa. (38,39,40,41,42,43)

### **Conclusiones.**

En este estudio, la administración de tiocacetamida a una dosis de 100 mg/kg, tres veces por semana, demostró ser efectiva para inducir daño hepático progresivo permitiendo encontrar etapas desde esteatosis hasta F4 hasta Hepatocarcinoma/Colangiocarcinoma, mediante análisis macroscópico, histológico y bioquímico.

Los parámetros bioquímicos presentaron variaciones que se correlacionaron con los cambios histológicos observados, lo que evidencia la utilidad de realizar un perfil bioquímico amplio para evaluar el estado funcional del hígado. Estos cambios también permitieron identificar diferencias marcadas según el sexo y la etapa de la enfermedad, en el cual se observó una diferencia significativa entre sexos, con un desfase aproximado de dos semanas en la progresión del daño, lo que resalta la necesidad de considerar el sexo como una variable biológica relevante en estudios preclínicos. No obstante, para estudios futuros, es fundamental mejorar el manejo preanalítico de las muestras, especialmente para evitar la hemólisis de las mismas, que puede interferir en la interpretación de algunos parámetros bioquímicos.

Los hallazgos obtenidos en este modelo experimental con ratas macho y hembra deben ser considerados en futuros estudios, tanto para el diseño y validación de modelos animales más representativos, así como para la evaluación de terapias farmacológicas. Incorporar el sexo como una variable biológica permitirá ajustar las dosis de forma específica, así como contribuir al desarrollo de tratamientos más eficaces, personalizados y orientados tanto al entendimiento como al tratamiento de las enfermedades hepáticas.

### **Recomendaciones**

A partir de los resultados obtenidos se recomienda que futuros estudios que utilicen el modelo de daño hepático inducido por tiocacetamida incorporen el sexo como una variable biológica relevante, debido a las diferencias observadas en la progresión del daño hepático entre machos y hembras. Asimismo, es fundamental optimizar el manejo preanalítico de las muestras biológicas para evitar la hemólisis, ya que esta puede afectar la interpretación de los parámetros bioquímicos. Finalmente, este modelo experimental puede ser empleado en la evaluación de terapias farmacológicas, ajustando las dosis según el sexo y la etapa de la enfermedad.

### **Aporte a la sociedad**

El presente estudio contribuye al entendimiento de la progresión del daño hepático desde etapas tempranas hasta estadios avanzados, mediante un modelo experimental validado. Además, se resalta la importancia de considerar el sexo como una variable biológica en la investigación biomédica, lo que puede favorecer el desarrollo de tratamientos más eficaces, personalizados y orientados a mejorar el abordaje de las enfermedades hepáticas.

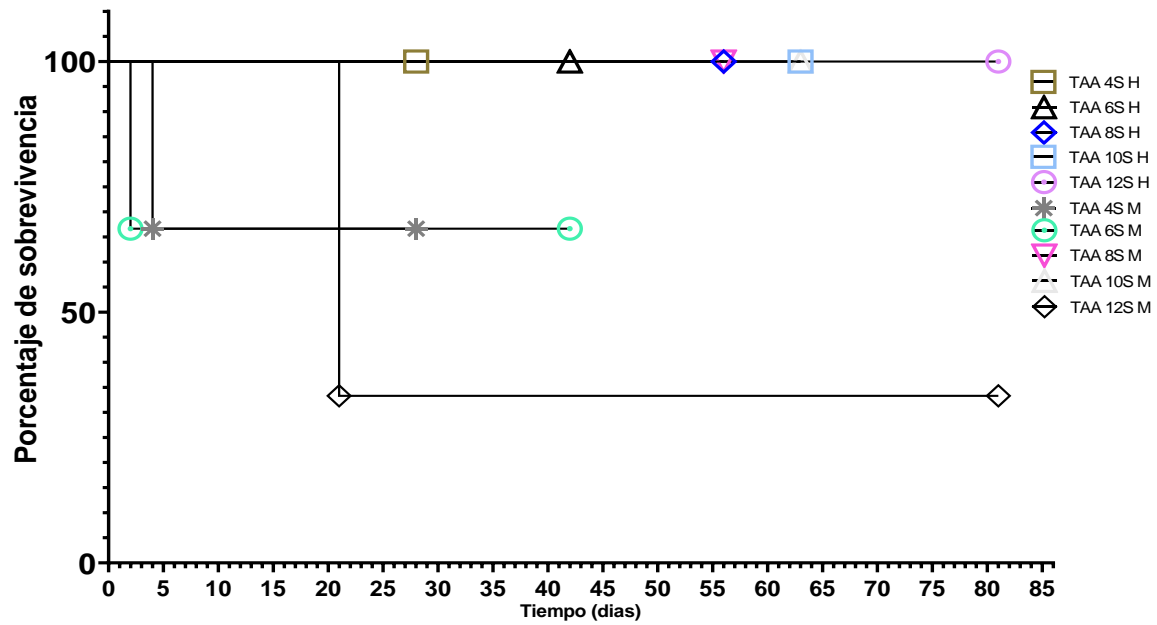
Referencias

1. Dutta, S., Mishra, S. P., Sahu, A. K., Mishra, K., Kashyap, P., & Sahu, B. (2021). Hepatocytes and their role in metabolism. *Drug Metab*, 3.
2. Maurice, J., & Manousou, P. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical medicine*, 18(3), 245.
3. Kasper, P., Martin, A., Lang, S., Kuetting, F., Goeser, T., Demir, M., & Steffen, H. M. (2021). NAFLD and cardiovascular diseases: a clinical review. *Clinical research in cardiology*, 110, 921-937.
4. Devarbhavi, H., Asrani, S. K., Arab, J. P., Nartey, Y. A., Pose, E., & Kamath, P. S. (2023). Global burden of liver disease: 2023 update. *Journal of hepatology*, 79(2), 516-537.
5. Simental-Mendía, L. E., Ortega-Pacheco, C. J., García-Guerrero, E., Sicsik-Aragón, M. A., Guerrero-Romero, F., & Martínez-Aguilar, G. (2021). The triglycerides and glucose index is strongly associated with hepatic steatosis in children with overweight or obesity. *European Journal of Pediatrics*, 180, 1755-1760.
6. Chen, Y., & Tian, Z. (2020). Roles of hepatic innate and innate-like lymphocytes in nonalcoholic steatohepatitis. *Frontiers in Immunology*, 11, 1500.
7. Hammerich, L., & Tacke, F. (2023). Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 20(10), 633-646.
8. Ginès, P., Krag, A., Abraldes, J. G., Solà, E., Fabrellas, N., & Kamath, P. S. (2021). Liver cirrhosis. *The Lancet*, 398(10308), 1359-1376.
9. Llovet, J. M., Kelley, R. K., Villanueva, A., Singal, A. G., Pikarsky, E., Roayaie, S., ... & Finn, R. S. (2021). Hepatocellular carcinoma. *Nature reviews Disease primers*, 7(1), 1-28.
10. Flores-García, N. C., Dirac, M., Han, H., & Kershenobich-Stalnikowitz, D. (2023). Burden of disease due to liver cirrhosis in Mexico. *Gac Med Mex*, 159, 494-501.
11. Samant, H., Amiri, H. S., & Zibari, G. B. (2021). Addressing the worldwide hepatocellular carcinoma: epidemiology, prevention and management. *Journal of gastrointestinal oncology*, 12(Suppl 2), S361.
12. 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.
13. Méndez-Sánchez, N., et al., *Current trends of liver cirrhosis in Mexico: Similarities and differences with other world regions*. *World Journal of Clinical Cases*, 2018. 6: p. 922.
14. Sepehrinezhad, A., Shahbazi, A., Negah, S. S., Joghataei, M. T., & Larsen, F. S. (2021). Drug-induced-acute liver failure: A critical appraisal of the thioacetamide model for the study of hepatic encephalopathy. *Toxicology reports*, 8, 962-970.
15. Nevzorova, Y. A., Boyer-Diaz, Z., Cubero, F. J., & Gracia-Sancho, J. (2020). Animal models for liver disease—a practical approach for translational research. *Journal of hepatology*, 73(2), 423-440.

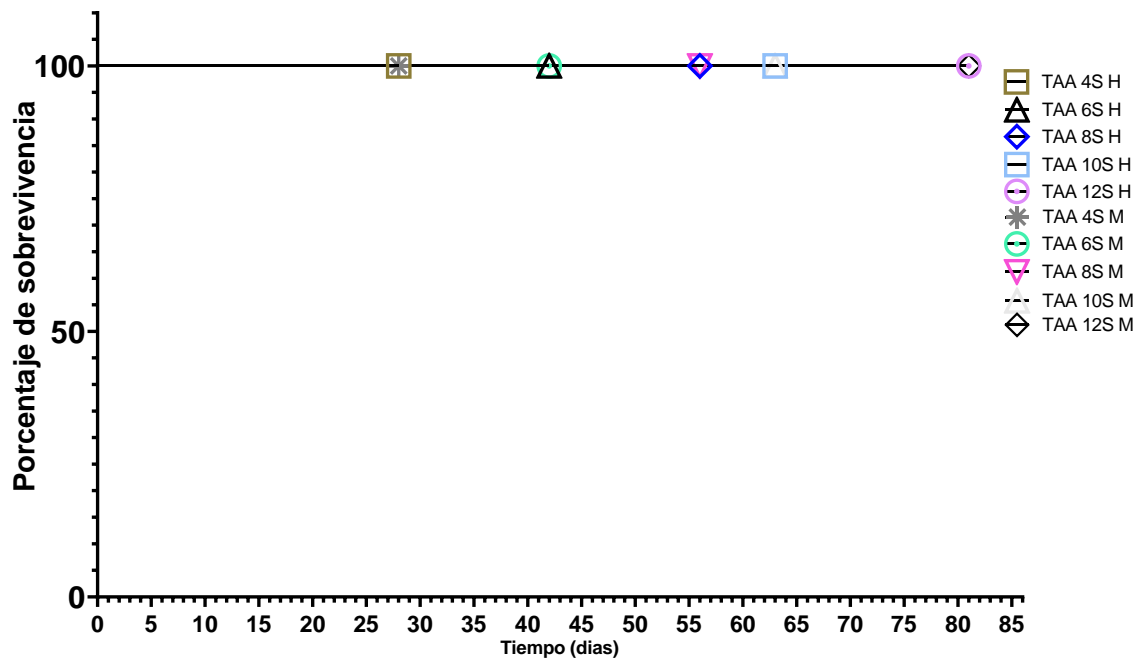
16. Koblíhová, E., Mrazová, I., Vaňourková, Z., Maxová, H., Ryska, M., & Froněk, J. (2020). Sex-linked differences in the course of thioacetamide-induced acute liver failure in Lewis rats. *Physiological research*, 69(5), 835.
17. Lawrence, G. M., & Beesley, A. C. H. (1988). The effect of diurnal rhythms on the hepatotoxicity of thioacetamide in male and female rats. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 6(3-4), 359-370.
18. Lee, Y. H., Son, J. Y., Kim, K. S., Park, Y. J., Kim, H. R., Park, J. H., ... & Kim, H. S. (2019). Estrogen deficiency potentiates thioacetamide-induced hepatic fibrosis in Sprague-Dawley rats. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3709.
19. Mostafa, R. E., Shaffie, N. M., & Allam, R. M. (2021). Panax Ginseng alleviates thioacetamide-induced liver injury in ovariectomized rats: Crosstalk between inflammation and oxidative stress. *PLoS one*, 16(11), e0260507.
20. Hussein, R. M., Anwar, M. M., Farghaly, H. S., & Kandeil, M. A. (2020). Gallic acid and ferulic acid protect the liver from thioacetamide-induced fibrosis in rats via differential expression of miR-21, miR-30 and miR-200 and impact on TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling. *Chemico-biological interactions*, 324, 109098.
21. Boeva, I., Karagyozov, P. I., & Tishkov, I. (2021). Post-liver transplant biliary complications: current knowledge and therapeutic advances. *World Journal of Hepatology*, 13(1), 66.
22. Mathurin, P., & Lucey, M. R. (2020). Liver transplantation in patients with alcohol-related liver disease: current status and future directions. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 5(5), 507-514.
23. Craig, E. V., & Heller, M. T. (2021). Complications of liver transplant. *Abdominal Radiology*, 46, 43-67.
24. Wallace, M. C., Hamesch, K., Lunova, M., Kim, Y., Weiskirchen, R., Strnad, P., & Friedman, S. L. (2015). Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats. *Laboratory animals*, 49(1\_suppl), 21-29.
25. Amirtharaj, G. J., Natarajan, S. K., Pulimood, A., Balasubramanian, K. A., Venkatraman, A., & Ramachandran, A. (2017). Role of oxygen free radicals, nitric oxide and mitochondria in mediating cardiac alterations during liver cirrhosis induced by thioacetamide. *Cardiovascular toxicology*, 17, 175-184.
26. Aydın, A. F., Küskü-Kiraz, Z., Dođru-Abbasođlu, S., Güllüođlu, M., Uysal, M., & Koçak-Toker, N. (2010). Effect of carnosine against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rat. *Peptides*, 31(1), 67-71.
27. Zargar, S., Alonazi, M., Rizwana, H., & Wani, T. A. (2019). Resveratrol reverses thioacetamide-induced renal assault with respect to oxidative stress, renal function, DNA damage, and cytokine release in Wistar rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019(1), 1702959.
28. Bludovska, M., Mistrova, E., Kotyzova, D., & Chottova-Dvorakova, M. (2013). The influence of chronic administration of thioacetamide on levels of ALT, AST and GLDH in serum and markers of oxidative stress in the liver and kidneys of female Wistar rats. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 157(1), 51-588.

29. Rajamani, K., Lin, Y. C., Wen, T. C., Hsieh, J., Subeq, Y. M., Liu, J. W., ... & Chiou, T. W. (2015). The antisenescence effect of trans-cinnamaldehyde on adipose-derived stem cells. *Cell Transplantation*, 24(3), 493-507.
30. Yu, S., & Shang, P. (2014). A review of bioeffects of static magnetic field on rodent models. *Progress in biophysics and molecular biology*, 114(1), 14-24.
31. Cui J, Placzek WJ, Postula D. Mouse models of liver diseases: Progress and limitations. *Int J Mol Sci*. 2021;22(20):11294.
32. Mazzolini G, Smedsrød B. Experimental models of liver diseases: Value and limitations. *World J Gastroenterol*. 2014;20(45):15064–15082.
33. Marcellin P, Kutala BK. Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver Int*. 2018;38 Suppl 1:2–6.
34. Shirai, M., Arakawa, S., Miida, H., Matsuyama, T., Kinoshita, J., Makino, T., ... & Teranishi, M. (2013). Thioacetamide-induced hepatocellular necrosis is attenuated in diet-induced obese mice. *Journal of toxicologic pathology*, 26(2), 175-186.
35. Cheng, L., Yang, L. I., Yetao, Y. A. O., Xiaoli, J. I. N., Hang, Y. I. N. G., Bin, X. U., & Jian, X. U. (2022). Toxic effects of thioacetamide-induced femoral damage in New Zealand white rabbits by activating the p38/ERK signaling pathway. *Physiological Research*, 71(2), 285.
36. Al-Attar, A. M., & Al-Rethea, H. A. (2017). Chemoprotective effect of omega-3 fatty acids on thioacetamide induced hepatic fibrosis in male rats. *Saudi journal of biological sciences*, 24(4), 956-965.
37. Sibulesky, L. (2013). Anatomía normal del hígado. *Clinical liver disease*, 2(S4), S61Š-S63Š.
38. Schemitt, E. G., Hartmann, R. M., Colares, J. R., Licks, F., Salvi, J. O., Marroni, C. A., & Marroni, N. P. (2019). Protective action of glutamine in rats with severe acute liver failure. *World Journal of Hepatology*, 11(3), 273.
39. ElBaset, M. A., Salem, R. S., Ayman, F., Ayman, N., Shaban, N., Afifi, S. M., ... & Elalfy, Z. S. (2022). Effect of empagliflozin on thioacetamide-induced liver injury in rats: role of AMPK/SIRT-1/HIF-1 $\alpha$  pathway in halting liver fibrosis. *Antioxidants*, 11(11), 2152.
40. Rui, L. A., Silva, E. A., Silva, T. C., Portela, T. C. L., Silva, A. P., Cogliati, B., ... & Hernandez-Blazquez, F. J. (2014). Cirrhosis in rats does not resolve in the long-term after induction by thioacetamide model. *Journal of Morphological Sciences*, 31(01), 033-041.
41. Chowdhury, A. B., & Mehta, K. J. (2023). Liver biopsy for assessment of chronic liver diseases: a synopsis. *Clinical and experimental medicine*, 23(2), 273-285.
42. Marques-Garcia, F. (2020). Methods for hemolysis interference study in laboratory medicine—a critical review. *Ejifcc*, 31(1), 85.
43. Stöppeler, S., Palmes, D., Fehr, M., Hölzen, J. P., Zibert, A., Siaj, R., ... & Bahde, R. (2013). Gender and strain-specific differences in the development of steatosis in rats. *Laboratory animals*, 47(1), 43-52.

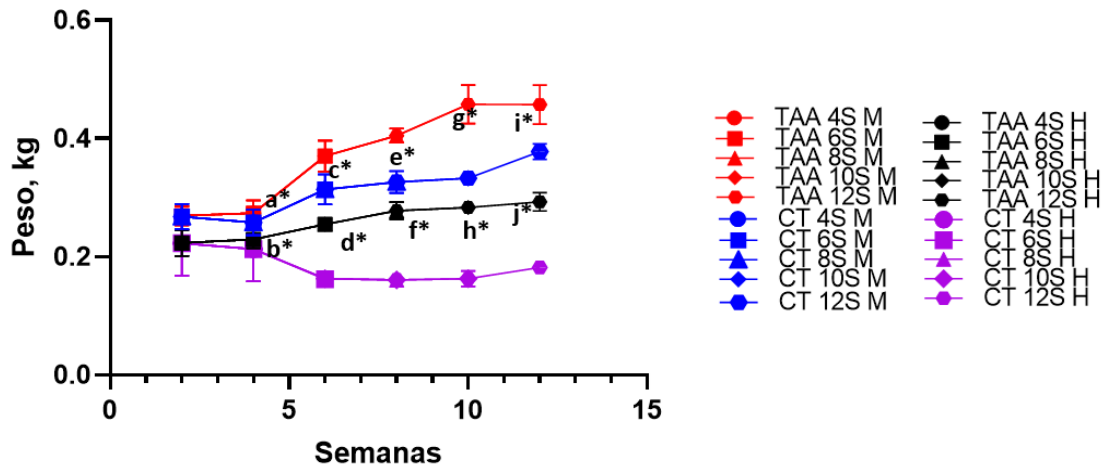
Anexo.



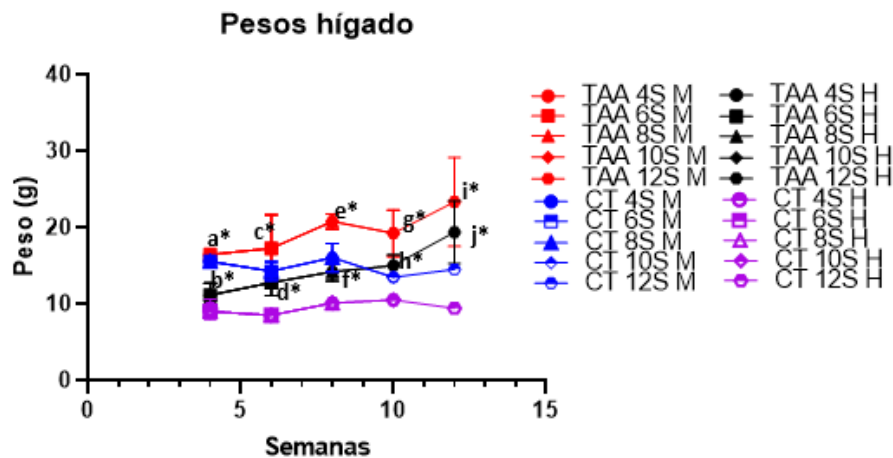
**Figura 1.** Tasa de sobrevivencia de las ratas macho y hembras administradas con TAA dosis de 200 mg/kg 3 veces por semana.



**Figura 2.** Tasa de sobrevivencia de las ratas macho y hembras administradas con TAA dosis de 100 mg/kg 3 veces por semana.



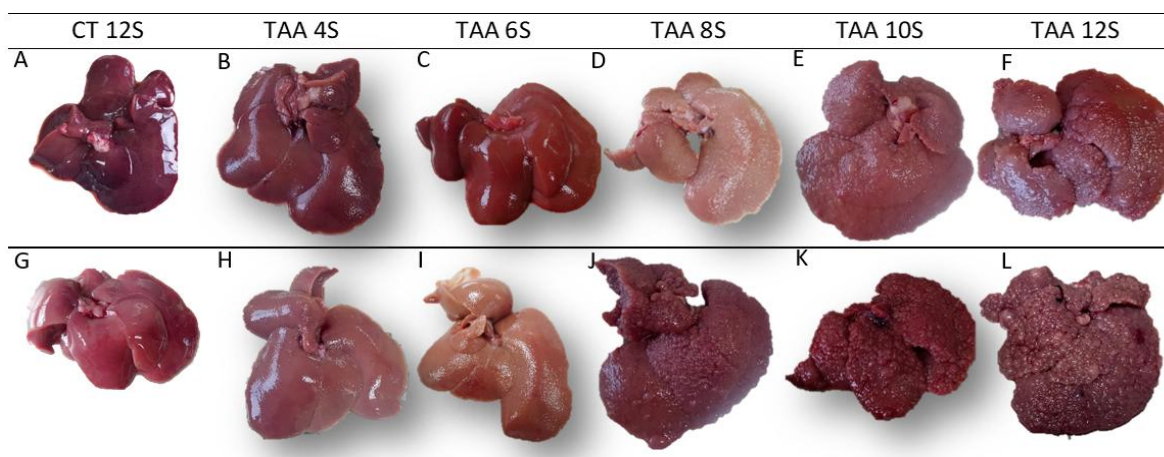
**Figura 3.** Registro de los pesos en (kg) de ratas macho y hembra administrados con TAA dosis de 100 mg/kg 3 veces por semana. 4 semanas: **a**, CT M vs TAA M; b, CT H vs TAA H. 6 semanas: **c**, CT M vs TAA M; d, CT H vs TAA H. 8 semanas: **e**, CT M vs TAA M; f, CT H vs TAA H. 10 semanas: **g**, CT M vs TAA M; h, CT H vs TAA H. 12 semanas: **i**, CT vs TAA M; **j**, CT vs TAA H. Multi t-test \* $p \leq 0.001$



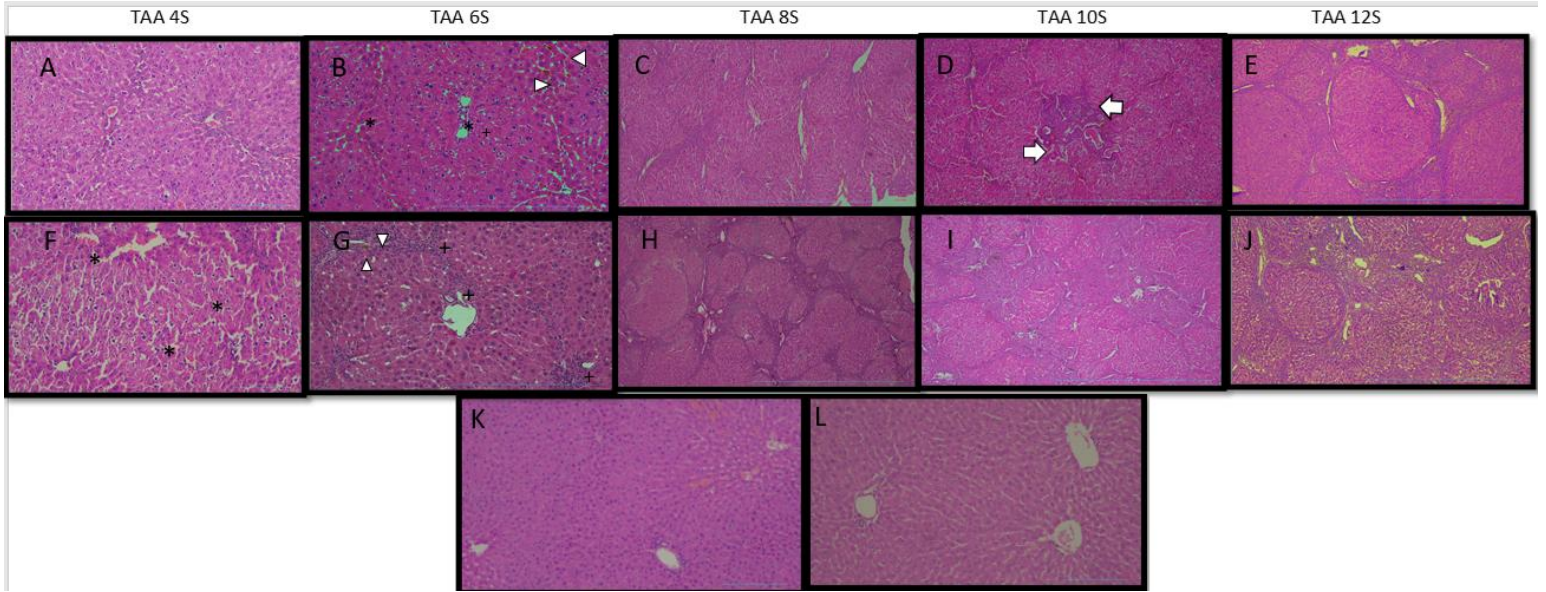
**Figura 4.** Registro de pesos de hígado (g) de ratas Wistar macho y hembra administrados con TAA dosis de 100 mg/kg. 4 semanas: **a**, CT M vs TAA M; b, CT H vs TAA H. 6 semanas: **c**, CT M vs TAA M; d, CT H vs TAA H. 8 semanas: **e**, CT M vs TAA M; f, CT H vs TAA H. 10 semanas: **g**, CT M vs TAA M; h, CT H vs TAA H. 12 semanas: **i**, CT vs TAA M; **j**, CT vs TAA H. Multi t-test \* $p \leq 0.001$ .

**Tabla 1.** Determinación de índice hepático de las ratas macho y hembra tratadas con TAA.

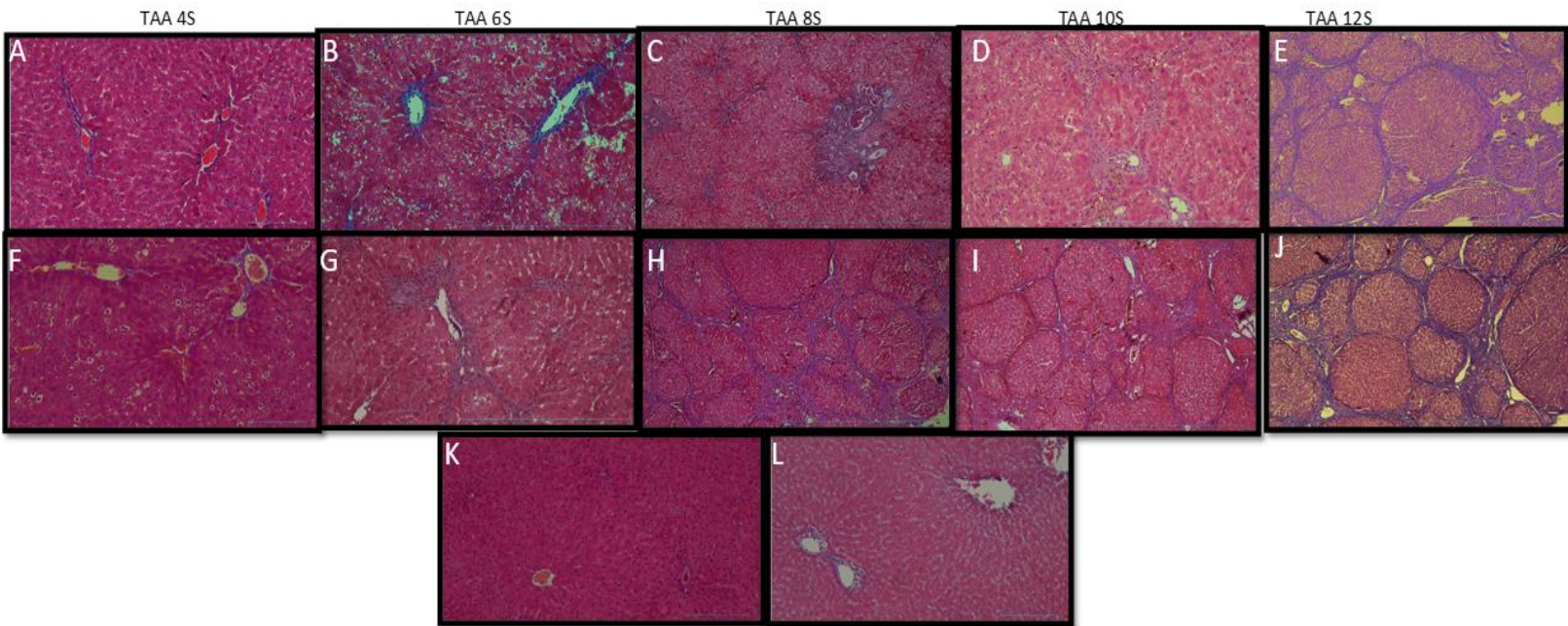
Semanas	CT Macho	TAA Macho	CT Hembra	TAA Hembra
4	16.5	16.6	23.7	23.3
6	22.1	22.4	19	20.1
8	20.4	19.5	16	19.6
10	24.7	23.3	15.6	18.7
12	26	20.2	19.3	15.5



**Figura 5.** Análisis macroscópico de hígados rata Wistar hembra (A,B,C,D,E,F) y macho (G,H,I,J,K,L) con dosis de 100 mg/kg.



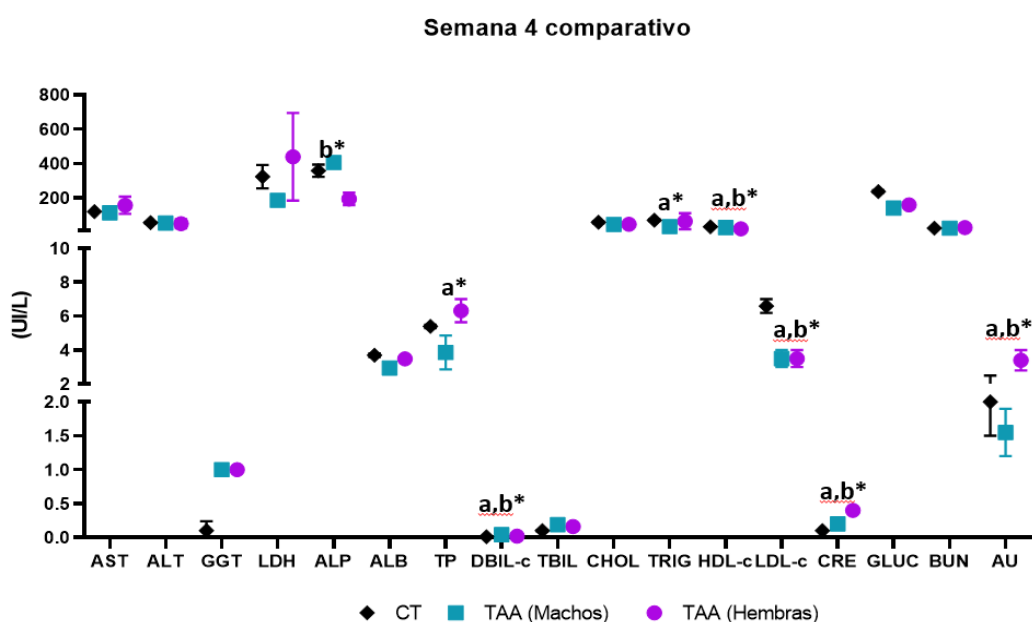
**Figura 6.** Histologías de ratas hembra (A,B,C,D,E) y macho (F,G,H,I,J) CT (K-Macho y L-Hembra) por tinción H&E



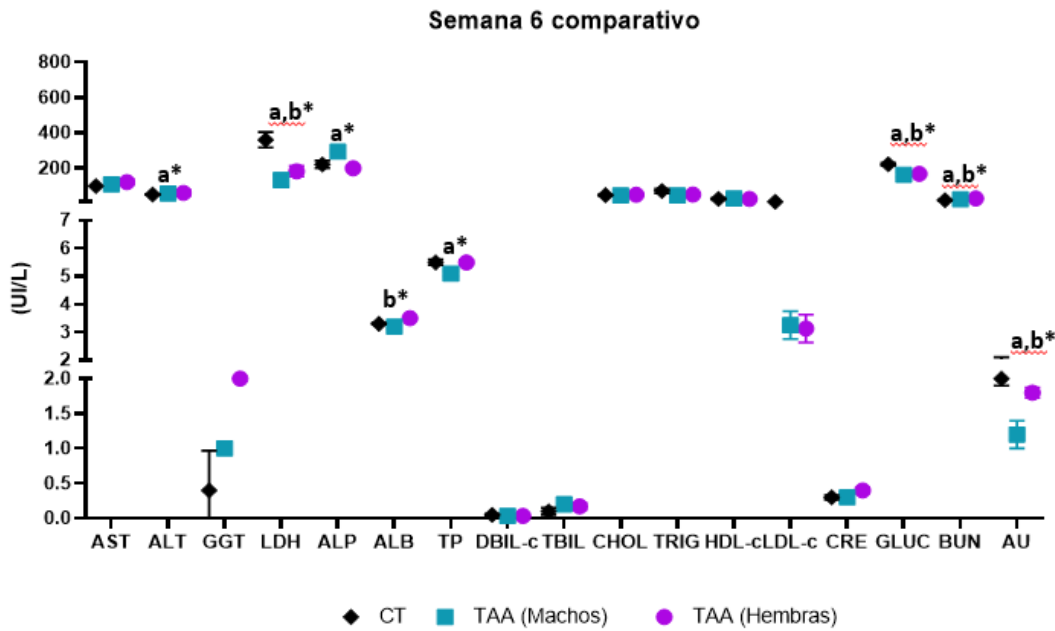
**Figura 7.** Histologías de hígados hembra (A,B,C,D,E) y macho (F,G,H,I,J) por tinción tricrómica de Masson.

**Tabla 2.** Identificación de etapa de fibrosis entre machos vs hembras con dosis de 100 mg/kg

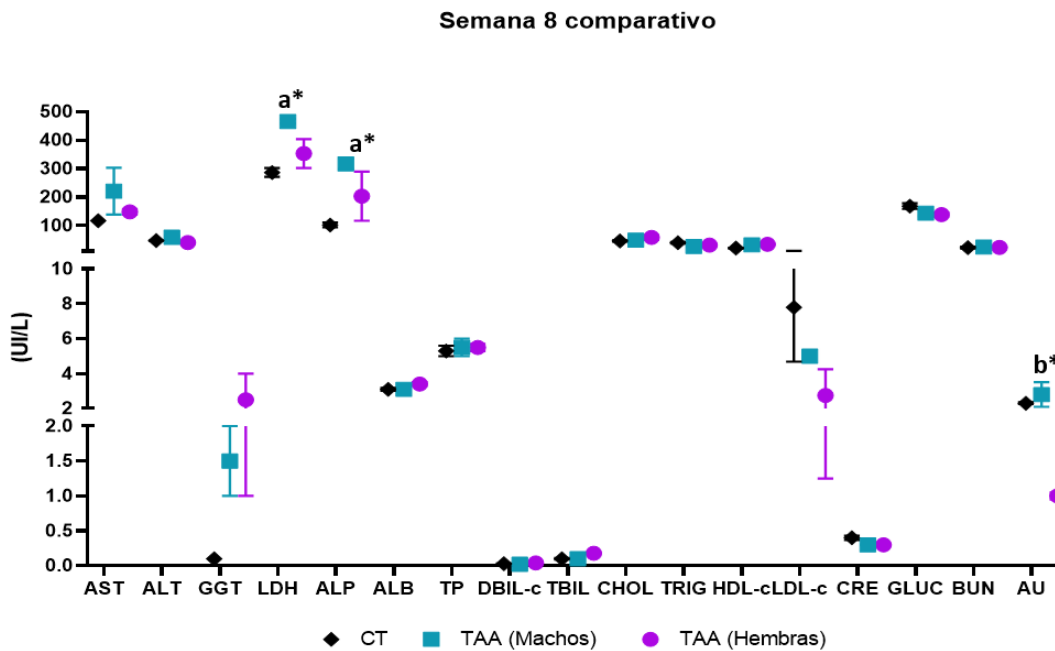
Semana	Machos	Hembras
4	Esteatosis/esteatohepatitis	Esteatosis
6	F1	Esteatohepatitis
8	F2	F1
10	F3	F2
12	F4/Hepatocarcinoma -Colangiocarcinoma	F3-F4



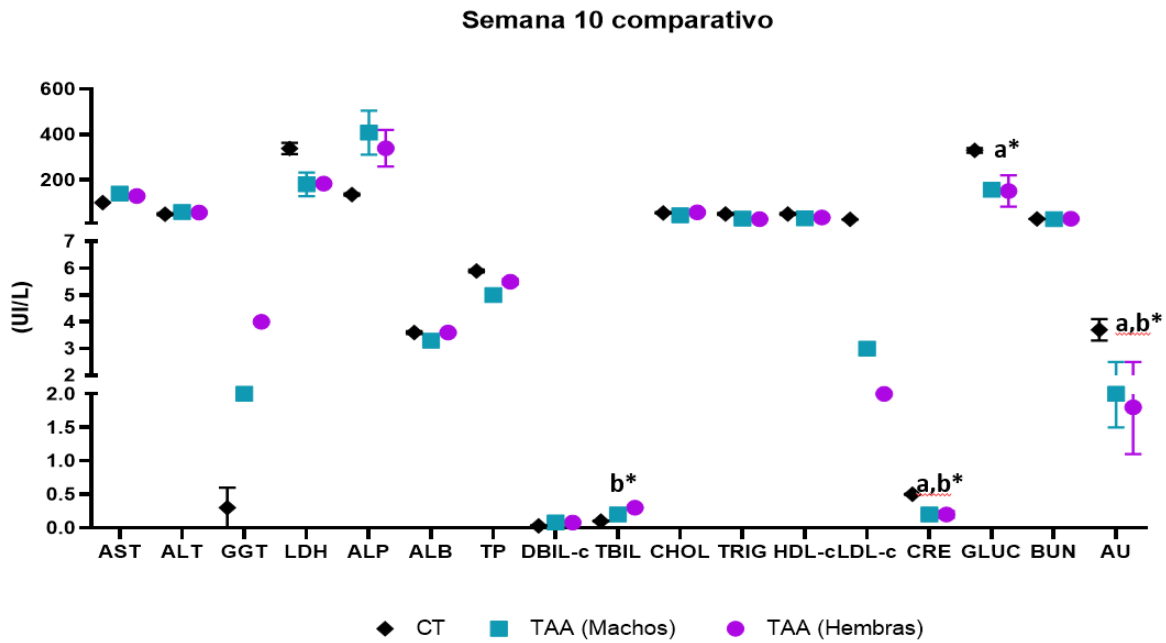
**Figura 5.** Análisis comparativo del perfil bioquímico entre ratas Wistar macho y hembra CT y TAA con dosis de 100 mg/kg durante 4 semanas. a, CT vs M; b, CT vs H; c, M vs H. Multi t-test \*p<0.001



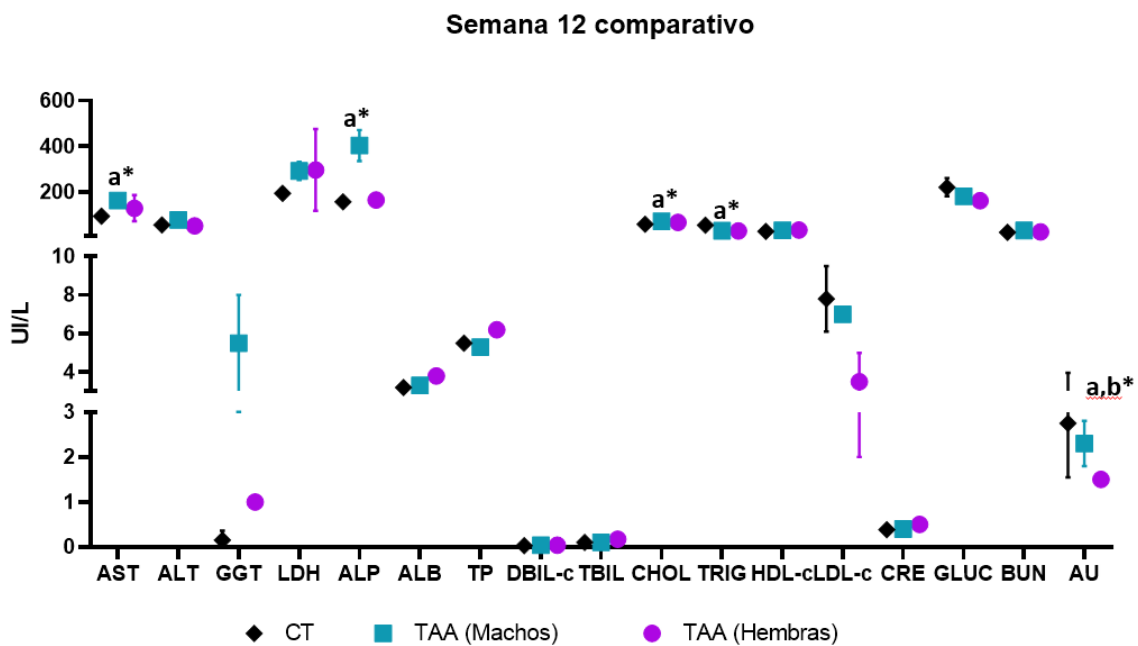
**Figura 6.** Análisis comparativo del perfil bioquímico entre ratas Wistar macho y hembra CT y TAA con dosis de 100 mg/kg durante 6 semanas. **a**, CT vs M; **b**, CT vs H; **c**, M vs H. Multi t-test\* $p \leq 0.001$



**Figura 7.** Análisis comparativo del perfil bioquímico entre ratas Wistar macho y hembra CT y TAA con dosis de 100 mg/kg durante 8 semanas. **a**, CT vs M; **b**, CT vs H; **c**, M vs H. Multi t-test\* $p \leq 0.001$



**Figura 8.** Análisis comparativo del perfil bioquímico entre ratas Wistar macho y hembra CT y TAA con dosis de 100 mg/kg durante 10 semanas. **a, CT vs M; b, CT vs H; c, M vs H.** Multi t-test\* $p \leq 0.001$



**Figura 9.** Análisis comparativo del perfil bioquímico entre ratas Wistar macho y hembra CT y TAA con dosis de 100 mg/kg durante 12 semanas. **a, CT vs M; b, CT vs H; c, M vs H.** Multi t-test\* $p \leq 0.001$ .