

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO
SINTASA INDUCIBLE EN EL
PREACONDICIONAMIENTO HEPÁTICO CON
HIERRO FRENTE A ISQUEMIA REPERFUSIÓN.**

TESIS PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE TECNÓLOGO MÉDICO CON
MENCION EN BIOANÁLISIS CLÍNICO, HEMATOLOGÍA Y BANCO DE SANGRE.

AUTOR: Arlette Román Salinas
TUTORAS: Virginia Fernández Arancibia
Pamela Cornejo Zamorano

2013

Agradecimientos:

A mi familia que ha estado presente en cada etapa de este largo proceso ayudándome a poner de pie en cada caída y felicitándome por cada meta cumplida. Agradezco también a todos los integrantes del laboratorio que con gran disposición me apoyaron, sobre todo a Romina y a mi tutora Sra. Virginia Fernández.

¡Gracias Totales!

Dedicatoria:

Le dedico este trabajo a mi hermosa familia que sin su apoyo incondicional no podría haber logrado mis objetivos de vida. A mis hermanos Mateo y Renato que aunque me saquen canas verdes me entregan la energía para seguir adelante, a mi padre por entregarme lecciones para ser siempre mejor y nunca rendirme, a mi madre por ser mi gran apoyo y mi mejor consejera y a Nicolás por ser mi compañero de camino. Gracias por estar presentes en cada momento de mi vida.

¡Los amo!

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Estrés Oxidativo y Hepatotoxicidad del Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y fue financiada por el Proyecto FONDECYT 1110006.

INDICE

Resumen	11
Introducción	13
Marco teórico	15
Hipótesis y Objetivos	25
Materiales y Métodos	26
Análisis estadístico y Aspectos éticos	31
Resultados	32
Discusión	37
Conclusión	39
Anexo	40
Referencias Bibliográficas	58

RESUMEN

La isquemia-reperfusión (IR) realizada en cirugías hepáticas por oclusión vascular, desencadena una respuesta inflamatoria e injuria celular. El daño producido en hepatocitos y células endoteliales vasculares se debe a factores tales como pérdida de homeostasis de cationes, disfunción mitocondrial y activación de células de Kupffer con liberación de especies reactivas del oxígeno (EROS) que desencadenan un estrés oxidativo (EOx).

El preconditionamiento, es un proceso biológico que protege a un órgano determinado frente a la exposición a una injuria posterior. Este proceso es capaz de aumentar la tolerancia al daño de un órgano mediante la activación de mecanismos citoprotectores. Una forma de preconditionamiento es la administración subcrónica de hierro (Fe), el cual establece un EOx transitorio no hepatotóxico, que desencadena respuestas citoprotectoras que disminuirán el daño frente a la exposición a la IR posterior. Dentro de los efectos del preconditionamiento con Fe, se encuentra la recuperación de la actividad del factor de transcripción NF- κ B, el cual regula la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la cual tiene efectos citoprotectores.

En este estudio se planteó que el preconditionamiento hepático con Fe frente a la IR, aumenta la expresión de la iNOS y la actividad NOS. Para esto se evaluó la expresión de esta enzima mediante RT-PCR y su actividad mediante la determinación de nitritos y nitratos séricos. Para realizar este estudio se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, las cuales recibieron una suplementación con Fe y luego fueron sometidas a IR.

Los resultados obtenidos mostraron una disminución del daño hepático en animales tratados con Fe y sometidos a IR expresado por la disminución significativa de las

actividades séricas de las transaminasas GOT y GPT. También se observó un incremento en la expresión hepática de iNOS y actividad NOS en animales tratados con Fe y sometidos a IR, lo que determina una mayor producción de óxido nítrico (\bullet NO), biomolécula que puede contribuir a la hepatoprotección mediante efectos anti-oxidantes y anti-inflamatorios, relacionados con la inhibición de una excesiva activación de NF- κ B y transcripción de genes que codifican para citoquinas pro-inflamatorias.

Se concluye que el preconditionamiento hepático inducido por Fe, se asocia con incrementos hepáticos en la expresión de iNOS y actividad NOS, eventos que pueden contribuir a la hepatoprotección inducida por dicho protocolo preconditionante.

INTRODUCCIÓN

La isquemia-reperfusión (IR) es un proceso de gran relevancia para situaciones clínicas como el trasplante y las cirugías resectivas. Esta oclusión vascular parcial y posterior restablecimiento del flujo sanguíneo es un procedimiento necesario en las cirugías hepáticas debido a que este órgano posee una gran irrigación, por lo tanto se deben evitar grandes pérdidas de sangre a través de este medio¹.

La IR, en la cual se interrumpe parcialmente el flujo sanguíneo hacia el hígado y luego se restablece, produce un gran daño a los hepatocitos y a las células endoteliales vasculares. Esta injuria involucra el desarrollo de estrés oxidativo drástico, y estados pro-inflamatorio y pro-apoptótico lo cual resulta en un gran daño a las células del hígado².

Es por esta razón que resulta de gran relevancia el estudio de mecanismos hepatoprotectores que se puedan aplicar, previo a la IR, y que reduzcan el daño que se produce posterior a ésta. Dentro de los procedimientos estudiados, se encuentra el preacondicionamiento hepático con hierro (Fe), el cual es capaz de desencadenar mecanismos protectores para preparar al hígado antes de recibir la injuria generada por la IR³.

Ya que se ha comprobado previamente que la administración de Fe de manera sub-crónica preacondiciona al hígado y reduce la injuria producida por la IR, es que los estudios se han dirigido a determinar qué mecanismos y biomoléculas subyacen a la hepatoprotección. Considerando que la administración crónica de Fe aumenta la producción hepática de óxido nítrico (*NO) a través de una mayor expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), efecto que se asocia al efecto hepatoprotector del *NO frente a la

toxicidad gatillada por el Fe crónico, estas biomoléculas podrían tener un rol hepatoprotector en el preconditionamiento por Fe⁴.

Es por esto que el objetivo principal de este trabajo es evaluar cambios en la expresión de iNOS y actividad NOS, en el preconditionamiento hepático por Fe frente a la IR.

MARCO TEÓRICO

Injuria por isquemia-reperfusión

La injuria producida en un órgano por isquemia-reperfusión (IR) es iniciada por el desarrollo de daño celular y la disminución del aporte de oxígeno y nutrientes al órgano (isquemia). Posteriormente, el restablecimiento del flujo sanguíneo (reperfusión) acentúa este daño¹.

Los mecanismos por los cuales se produce el daño por IR son ampliamente estudiados ya que están relacionados con diversas patologías o situaciones clínicas. En el hígado la injuria por IR se asocia a trasplantes, cirugía resectiva y trauma⁵.

Dentro de las alteraciones gatilladas en el hígado por la isquemia prolongada se encuentran la disminución de la fosforilación oxidativa mitocondrial y concomitante depleción de ATP, que conlleva a la alteración en el funcionamiento de bombas de membrana dependientes de ATP, con el consecuente desbalance de la homeostasis del Ca^{+2} , Na^{+} y H^{+} , lo que conduce a la activación de enzimas hidrolíticas y al aumento del volumen de las células con protrusión hacia el lumen vascular⁶.

Las mitocondrias son especialmente susceptibles al daño generado por la isquemia y la disfunción mitocondrial es un conocido mecanismo de progresión del daño por IR. Subcelularmente, la disfunción mitocondrial, caracterizada por una depleción de ATP, apertura de poros de permeabilidad dependientes de Ca^{+2} con salida de moléculas proapoptóticas y exacerbada formación de especies reactivas del oxígeno (EROS), juega un rol fundamental en la injuria por IR⁷.

Debido a la apertura de poros de permeabilidad dependientes de Ca^{+2} , se produce la salida desde la mitocondria de moléculas pro-apoptóticas, tales como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (AIF), iniciando el proceso apoptótico dependiente de ATP. Debido a que durante la IR hay depleción de ATP, la muerte celular ocurre vía necrosis⁸.

Durante la IR las mitocondrias son una fuente de EROS debido a que el estado reducido de los complejos mitocondriales durante la isquemia, promueve la aceptación de electrones por las bajas concentraciones presentes de O_2 , lo que resulta en la formación de anión superóxido (O_2^-). Los sitios de mayor generación de EROS en la mitocondria son los complejos I y III⁸.

Al momento de la isquemia, el cambio de metabolismo aeróbico a anaeróbico es energéticamente ineficiente, por lo que se produce un déficit de ATP que tiene como consecuencia la alteración de todas aquellas funciones celulares dependientes de este nucleótido⁹, entre ellas las bombas de membrana encargadas de la regulación del movimiento de cationes. Por tal motivo se produce ingreso de Ca^{+2} , Na^+ y agua a la célula lo que conduce a un aumento del volumen celular y protrusión de éstas al lumen vascular¹⁰. Por otro lado, la adherencia de leucocitos al endotelio, la agregación plaquetaria, la acumulación de fluido intracelular y la vasoconstricción producida por el desequilibrio entre el óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) y la endotelina (ET), contribuyen a la generación de un estrechamiento del lumen sinusoidal que concluye en una disfunción microcirculatoria².

Por otro lado, debido al catabolismo del ATP, se produce una acumulación de hipoxantina lo que conlleva a la generación de EROS durante la reperfusión, debido a que la hipoxantina es oxidada a ácido úrico en presencia de O_2 por acción de la xantina oxidasa,

generando O_2^{\bullet} y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La actividad xantina oxidasa es consecuencia de la proteólisis parcial de xantina deshidrogenasa, proceso que es catalizado por proteasas dependientes de Ca^{+2} en el hígado¹¹.

En condiciones de isquemia prolongada además se promueve la expresión de moléculas proinflamatorias y se inhibe la expresión de genes citoprotectores tales como óxido nítrico sintasa (NOS) y trombomodulina. Finalmente todos los procesos nombrados anteriormente conducen a una susceptibilidad del tejido al daño al momento de la reperfusión¹².

El daño por IR se caracteriza por tener dos fases, temprana y tardía. La fase temprana se extiende desde el comienzo de la reperfusión hasta tres o cuatro horas posteriores, mientras que la fase tardía se extiende desde la sexta hora hasta las 24 horas posteriores a la reperfusión².

En la fase temprana se produce la activación de las células de Kupffer con generación de EROS, la activación de factores del complemento y la activación y reclutamiento de linfocitos residentes. En la fase tardía se produce reclutamiento, infiltración y activación de neutrófilos con el subsecuente estrés oxidativo (EOx) generado por estas células, procesos mediados por citoquinas proinflamatorias, tales como $TNF-\alpha$, IL-6 e IL-1, quimioquinas y factores del complemento² [Figura 1].

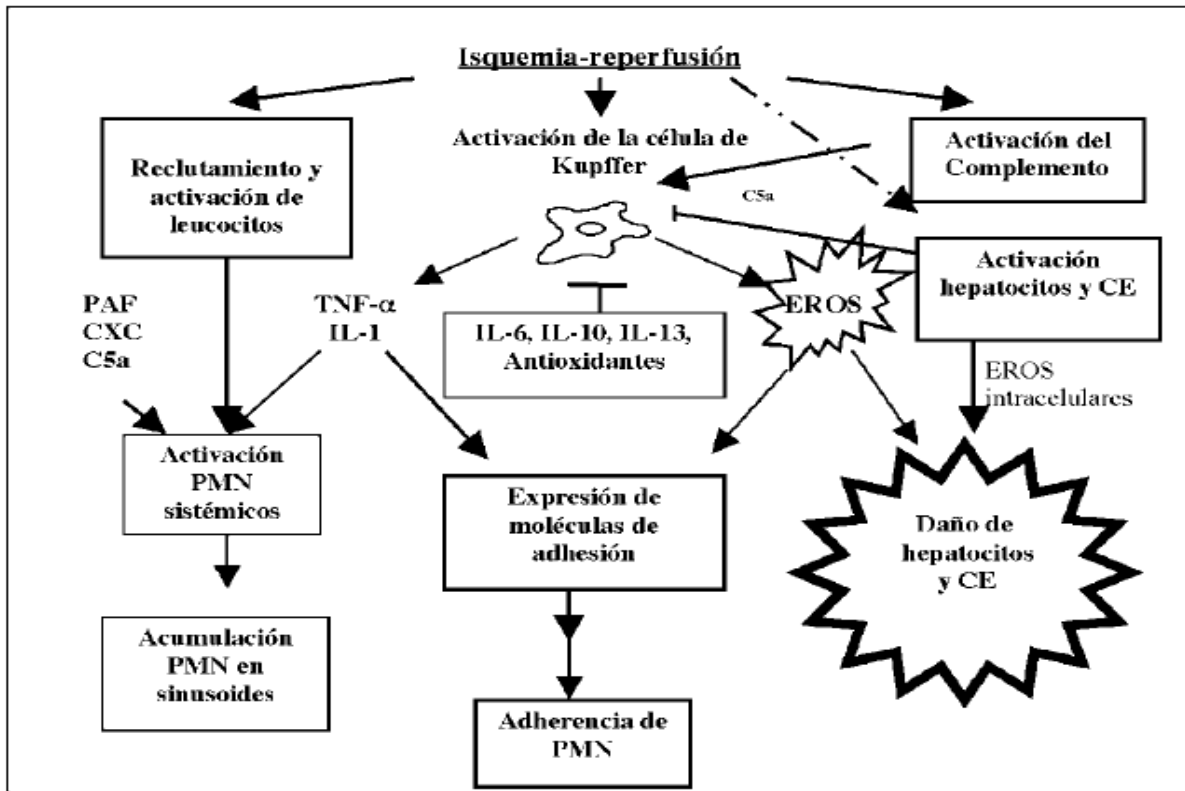


Figura 1: Mecanismos involucrados en injuria hepática por isquemia-reperfusión (Tomado de [2]). CE: células endoteliales; IL: interleuquina; TNF- α : Factor de necrosis tumoral; CXC: Quimioquinas; PAF: Factor activador de plaquetas; PMN: polimorfonuclear neutrófilo.

Producto de la infiltración de neutrófilos en el hígado se produce una amplificación del daño, mediante la liberación de mediadores tales como EROS, TNF- α y proteasas¹⁰. El EROx inducido por los neutrófilos y las células de Kupffer es un factor importante en la injuria de hepatocitos y células endoteliales vasculares⁴.

Por lo tanto, el daño por IR involucra diversos mecanismos que conducen al reclutamiento y adhesión de neutrófilos al endotelio, disfunción mitocondrial con depleción de ATP y apertura de poros con liberación de moléculas pro-apoptóticas, establecimiento de un estado pro-inflamatorio desencadenado por citoquinas y aumento de EROS conduciendo a un EROx drástico, lo que finalmente produce la injuria celular¹³.

Preacondicionamiento hepático con hierro

Se ha observado que la exposición de un órgano o tejido a diversas estrategias farmacológicas o clínicas, previo a la IR, puede incrementar su tolerancia al daño. A este proceso se le denomina preacondicionamiento, el cual corresponde a un proceso biológico endógeno que otorga protección a un determinado órgano frente a una exposición citotóxica ulterior¹².

El hierro (Fe) es un nutriente esencial para el organismo, capaz de catalizar reacciones de óxido-reducción promoviendo el intercambio de electrones en condiciones anaerobias, proceso de gran importancia para la fosforilación oxidativa mitocondrial y para desencadenar respuestas citoprotectoras cuando está en niveles bajos¹⁴.

El Fe corresponde a un micronutriente de efecto hormético, por lo que en concentraciones bajas es capaz de desencadenar respuestas citoprotectoras y en concentraciones altas es potencialmente tóxico³.

Cuando las necesidades metabólicas de Fe son superadas, la célula forma un pool de Fe de bajo peso molecular, denominado pool de Fe lábil (LIP), el cual cataliza la conversión de derivados de la reducción univalente del O₂, como O₂^{•-} y H₂O₂, en radical hidroxilo (HO•)¹⁵ mediante las reacciones de Fenton y Haber Weiss [Figura 2], lo que produce un aumento del EOX celular¹⁶.

Estudios previos de nuestro laboratorio, han señalado que la administración subcrónica de Fe (6 dosis de 50mg/kg, en días alternados) a ratas aumenta el LIP hepático, lo que establece una condición de EOX transitorio en una ventana de 72 horas posteriores a

la última dosis de Fe, sin desarrollo de hepatotoxicidad. La inducción de EOX transitorio por Fe estimula vías de transducción de señales redox-sensibles, lo que conlleva a la estimulación de respuestas hepatoprotectoras como la activación de factores de transcripción como Nrf2, STAT3 y NF-κB, las que precondicionan al hígado frente a la IR [Figura 2]³.

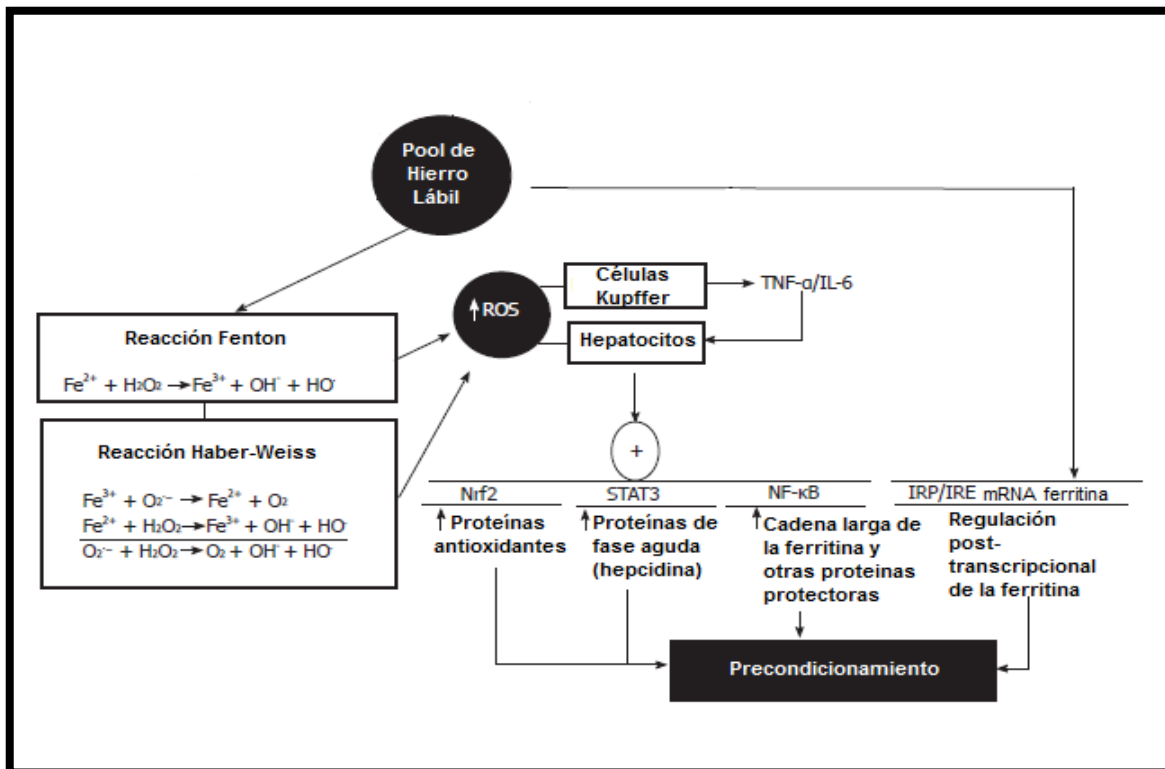


Figura 2: Señalización redox en preconditionamiento inducido por hierro provocado por pool de hierro celular lábil activando Nrf2, STAT3, NF-κB e IRP/IRE con respuesta antioxidante y de fase aguda (Adaptado de [14]). H₂O₂: peróxido de hidrógeno; HO[•]: radical hidroxilo; IL-6: interleuquina; TNF-α: factor de necrosis tumoral; IRE: elementos de respuesta a hierro; IRP: proteínas reguladoras de hierro; Nrf2: factor nuclear eritroide 2; ROS: especies reactivas de oxígeno, STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; O₂⁻: radical superóxido.

El tratamiento subcrónico con Fe previo a la IR, logra la supresión de la respuesta pro-inflamatoria gatillada por la liberación de TNF-α y la recuperación de la actividad de unión al DNA del NF-κB y expresión de haptoglobina, vía de transducción de señales

redox-sensible hepatoprotectora que es reducida por la IR³. Considerando las propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes de la haptoglobina, esta respuesta hepática gatillada por Fe contribuye al efecto preconditionante inducido por este micronutriente frente a la IR¹³.

Recientemente nuestro laboratorio ha descrito que el preconditionamiento con Fe determina además la activación del factor de transcripción redox-sensible Nrf2, y la expresión de hemoxigenasa-1, proteína antioxidante que contribuye a la respuesta hepatoprotectora gatillada por Fe¹⁷.

En consecuencia, el EOX transiente generado por el incremento del LIP frente a la administración de Fe, vía reacciones de Fenton y Haber-Weiss [Figura 2], desencadena respuestas hepatoprotectoras vía activación de vías de señalización reguladas por NF-κB y Nrf2 [Figura 2].

Rol del •NO y la iNOS en la hepatoprotección

El •NO corresponde a una especie reactiva del nitrógeno que actúa como mediador de diversos procesos biológicos como vasodilatación, neurotransmisión, broncodilatación, entre otros. Es sintetizado a partir de L-arginina, por la NOS, la que posee las isoformas neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). La activación de la NOS neuronal y endotelial es un proceso dependiente de Ca²⁺, mientras que la activación de la iNOS es independiente de este catión y se expresa sólo bajo ciertas condiciones, como por ejemplo la inflamación¹⁸. La iNOS es responsable de la producción de una considerable cantidad de •NO tras su inducción, siendo controlada su expresión por el factor de transcripción redox sensible NF-κB⁴.

En el hígado, el •NO puede ser sintetizado por cualquiera de las isoformas mencionadas y se ha estudiado que la expresión de éstas y los efectos que •NO tendrá dependerán de la compartimentalización de las enzimas dentro de las células y la localización de estas células dentro de un órgano¹⁹. En efecto, las interacciones célula a célula, la disponibilidad de O₂ y la exposición a diferentes productos metabólicos y biomoléculas provenientes de la circulación, pueden modular la producción y los efectos del •NO en diferentes hepatocitos, dependiendo de donde éstos se localizan en el hígado¹⁸.

En relación a su efecto vasodilatador, el •NO producido por las células endoteliales es capaz de difundir libremente por las células del músculo liso para activar la guanilato ciclasa soluble que cataliza la síntesis de cGMP, desencadenando una serie de procesos en la célula que concluyen en la relajación vascular²⁰. En relación a su efecto citoprotector, el •NO se ha implicado en diversos procesos generadores de respuestas protectoras frente a injuria, como la inducida por la IR. Entre ellas cabe destacar que, debido a su efecto vasodilatador, el •NO representa un factor importante para mantener el flujo sanguíneo hepático normal en condiciones de daño. Además se ha visto que •NO es un modulador de la función mitocondrial dependiendo de la proporción O₂/•NO²¹.

Los mecanismos por los cuales el •NO ejerce su función citoprotectora aún no están completamente dilucidados, sin embargo existen evidencias de que la modificación post-traducciona l de los complejos de la cadena respiratoria explica algunos de los efectos protectores que posee. El complejo I es particularmente susceptible al daño por isquemia y resulta ser un objetivo importante del •NO y sus metabolitos²². Diversos estudios

demuestran que la S-nitrosilación de tioles en el complejo I mitocondrial conlleva a citoprotección, debido a un efecto inhibitorio sobre la generación de EROS⁸.

Dentro de la mitocondria, la citocromo c oxidasa es reconocida por ser molécula blanco del •NO, al cual se une la enzima conduciendo a la inhibición reversible del consumo de O₂. La inhibición del complejo IV tiene consecuencias tanto para la generación de EROS como para la producción de ATP, ya que la unión de •NO a este complejo puede aumentar la generación de EROS por la acumulación de electrones en los complejos I y III. Se ha observado que en el corazón, la inhibición del complejo IV preserva el almacenamiento de altos niveles de energía en forma de ATP²³.

También se han encontrado evidencias que •NO media citoprotección por apertura de canales mitocondriales K_{+ATP}, lo que genera un aumento en la producción de EROS, lo cual puede tener efectos preconditionantes en el corazón²⁴.

Otro importante mecanismo que ha sido estudiado es el rol del •NO en la regulación de las vías apoptóticas mitocondriales, que se inician por la oxidación de cardiolipinas y la liberación de citocromo c durante la IR. Se ha establecido que bajas concentraciones de •NO pueden inhibir la liberación del citocromo c desde la mitocondria. Uno de los mecanismos por el cual el •NO bloquea la liberación de citocromo c es a través de la nitrosilación del grupo hemo, resultando esto en la inhibición de la actividad peroxidasa²⁵.

El papel citoprotector del •NO puede derivar de su acción atrapadora de EROS como O₂[•] para reducir la oxidación de biomoléculas, como también de su efecto reductor sobre la producción de citoquinas proinflamatorias²⁶.

De manera similar al Fe, estudios en los que se han evaluado otros mecanismos precondicionantes que inducen EOX hepático reversible, como L-3,3',5-triyodotironina (T₃), muestran una reprogramación de la expresión de genes regulados por factores de transcripción redox-sensibles, lo que determina una mayor expresión de proteínas asociadas a protección celular²⁷. Específicamente, el precondicionamiento inducido por T₃ produce un aumento de la producción de •NO, mediada por una mayor expresión de la iNOS hepática, mediante una cascada que involucra la liberación TNF- α y la activación de NF- κ B, factor de transcripción que ejerce un prominente control transcripcional sobre la expresión de la iNOS en células de Kupffer, células endoteliales y hepatocitos²⁸. El aumento significativo de los niveles de •NO demostró un importante rol en la generación de mecanismos hepatoprotectores y efectos anti-inflamatorios²⁴.

En conclusión, la inducción de un EOX hepático reversible desencadena mecanismos hepatoprotectores, entre los cuales puede estar incluida la actividad de la iNOS con mayor síntesis de •NO, el cual protegería al hígado frente al daño por IR.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El preconditionamiento hepático inducido por la administración de Fe frente a la isquemia-reperfusión, incrementa la expresión de iNOS y la actividad NOS hepática.

Objetivos

Objetivo general: Evaluar la expresión de iNOS y la actividad NOS en el preconditionamiento hepático con Fe previo a la isquemia-reperfusión.

Objetivos específicos:

- 1.- Evaluar la expresión hepática de iNOS mediante RT-PCR.
- 2.- Evaluar la actividad NOS hepática mediante la medición de nitritos y nitratos séricos.
- 3.- Evaluar parámetros de daño hepático mediante la determinación de niveles séricos de transaminasas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Durante este trabajo de investigación se utilizó ratas machos de la cepa Sprague-Dawley provenientes del Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, con un peso de 140-160 gramos, mantenidas en ciclos de 12 hrs. alternados de luz/oscuridad, provistas de agua y alimento (Champion) *ad libitum*. Todos los procedimientos con los animales de experimentación cumplieron con la guía “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy of Sciences, NIH Publication 86-23, revised 1985)” y han sido aprobados por el Comité de Bioética (Facultad de Medicina, Universidad de Chile, CBA No. 0381, FMUCH).

Suplementación con Fe

Las ratas recibieron 6 dosis intraperitoneales de 50 mg de Fe-dextrano/kg disueltas en buffer salino (PBS), o volúmenes equivalentes de PBS para los grupos control. El Fe-dextrano y el salino fueron administrados cada 2 días por un período de 10 días.

Inducción de IR hepática

A las 72 horas posteriores a la última dosis de Fe, las ratas fueron anestesiadas vía intraperitoneal (i.p.) con 1 ml/kg de Zoletil (Zoletil 50; Virbac S/A, Carros, France) el cual está compuesto por clorhidrato de zolazepam (25 mg/ml) y clorhidrato de tiletamina (25 mg/ml). Bajo estas condiciones se indujo isquemia parcial mediante la oclusión temporal (1 hora) del flujo de sangre hacia los lóbulos izquierdo y medio del hígado a través de un clip Schwartz (Fine Science Tools Inc., Vancouver, British Columbia, Canadá). Luego de este

periodo, se retiró el clip, se cerró la cavidad abdominal y se inició el período de reperfusión de 20 horas³. En grupos paralelos de animales se realizó laparotomía sin isquemia (cirugía sham) y luego de una hora se cerró la cavidad abdominal (grupo control).

Al término del período de reperfusión los animales fueron anestesiados con el fin de obtener:

- (i) Muestras hepáticas desde los lóbulos isquemizados.
- (ii) Muestra sanguíneas, mediante punción cardíaca.

Las muestras de hígado fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C para su utilización en los ensayos de RT-PCR. Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas para obtener el suero, el cual se utilizó para evaluar transaminasas, nitritos y nitratos séricos.

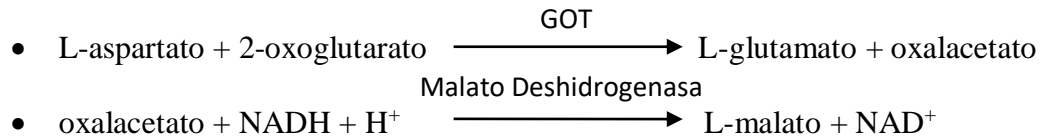
Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- (I) Salino-sham
- (II) Salino-IR
- (III) Fe-sham
- (IV) Fe-IR

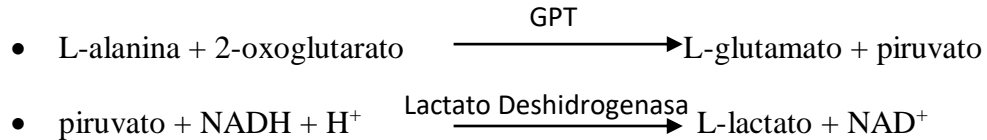
Parámetros de daño hepático

Para evaluar la severidad del daño hepático producido por la IR, se determinó las actividades séricas de GOT y GPT mediante un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina), el cual se basa en las siguientes reacciones:

Determinación de niveles de GOT:



Determinación de niveles de GPT:



En ambos casos se midió la velocidad de oxidación del NADH, la cual fue detectada espectrofotométricamente (340 nm). Esta velocidad es equivalente a la velocidad de las reacciones que son catalizadas por GOT y GPT, cuyos resultados se expresaron en UI/Lt de suero.

Evaluación de la expresión de iNOS mediante RT-PCR

Para realizar la extracción y purificación del RNA, se utilizó RNeasy lipid tissue mini kit (Qiagen). Cuarenta gramos de tejido hepático, fueron homogeneizados en buffer de lisis Qiazol, solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidinio. Se agregó cloroformo, para luego centrifugar (14000 rpm por 15 min). Luego fue transferida la fase acuosa obtenida a un tubo con 1 volumen de etanol al 70%. Esto fue transferido a una columna de purificación RNAeasy Minispin y fue centrifugado (1000 rpm por 15 seg) para luego descartar el filtrado. Posteriormente se realizó una digestión con DNasa, seguido de varias etapas de centrifugación y descartado del filtrado con el fin de purificar el RNA. El proceso final corresponde a la elución del RNA con agua libre de RNasas para luego

determinar su concentración y pureza mediante espectrofotómetro para microplacas Epoch (Biotek). El RNA que se obtuvo fue alicuotado y almacenado a -80°C.

Posteriormente se realizó la síntesis de cDNA a partir del RNA obtenido en la extracción usando el kit “ThermoScript™ RT-PCR System” (Invitrogen), empleando un termociclador cuyo protocolo incluye ciclos de 25°C por 10 minutos, 55°C por 40 minutos, 85°C por 5 minutos y 4°C para conservarlo. Luego el cDNA obtenido fue almacenado a -20°C.

Para evaluar la expresión de iNOS, se utilizó el método RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*), el cual se basa en la acción de la enzima *Taq* polimerasa, la cual posee la capacidad de sintetizar hebras de DNA a partir de una hebra complementaria.

Las secuencias utilizadas para los partidores sentido y antisentido fueron 5'-CAACAACACAGGATGACCCTAA-3' y 5'-GGTAGGTTTCCTGTTGTTTCTAT-3'y el producto de PCR esperado es de 417 pb.

Todos los reactivos que se utilizaron en el RT-PCR son del kit “Platinum®Taq DNA Polymerase High Fidelity” (Invitrogen). Para realizar la amplificación se utilizó RNA 18S “QuantumRNA™ Universal 18S Internal Standard” (Ambion), como control interno. El protocolo de amplificación utilizado fue de 94°C por 4 minutos, para luego hacer 38 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, para finalizar con un ciclo de 72° por 10 minutos.

Los productos obtenidos fueron separados (75 volts por 30 minutos) en un gel de agarosa con bromuro de etidio, para luego visualizar estos en un trans-iluminador UV y

obtener una fotografía que fue procesada mediante el programa Scion Image para cuantificar el DNA.

Evaluación de la actividad NOS hepática

Para evaluar la actividad NOS hepática se realizó la determinación de niveles plasmáticos de nitritos y nitratos mediante un kit comercial (Cayman Chemical, MI, USA), basado en la conversión del nitrito a nitrato por medio de una nitrato reductasa, seguido de la adición del reactivo Griess que lleva a la aparición de un color violeta. Posteriormente se determinó la absorbancia a 540 nm, para luego interpolar en una curva de calibración, correspondiente a un gráfico construido con diluciones seriadas realizadas a partir de una solución de nitratos de concentración conocida. Los resultados de la concentración de nitritos/nitratos de las muestras se expresaron en μM .

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados finales se expresaron como el promedio de las determinaciones, \pm S.E.M. Las diferencias significativas entre los grupos experimentales se estimaron mediante ANOVA unifactorial, seguido del test de comparación múltiple de Newman-Keuls, o mediante el test t de student, ambos con una significancia de 5% ($p < 0,05$) (“GraphPad Prism™” versión 5, GraphPad Software, INC, San Diego, CA, USA)

ASPECTOS ÉTICOS

Esta tesis cuenta con la aprobación del Comité de Bioética sobre investigación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, según protocolo CBA No. 0381, FMUCH adjunto en Anexo.

RESULTADOS

Efectos de la suplementación con Fe en el daño hepático producido por la IR

Actividades séricas de GOT y GPT

Los resultados obtenidos en la determinación de las actividades séricas de las transaminasas GOT y GPT se muestran en las Figuras 3 A y 3 B, respectivamente. Se puede observar que la IR gatilla daño hepático, como lo indican incrementos de 7,2 y 12,9 veces ($p < 0,05$) en las actividades séricas de GOT (fig. 3A) y GPT (fig. 3B), respectivamente, en relación al grupo salino-sham. Valores séricos de GOT y GPT similares a los del grupo control-sham se observan en animales tratados con Fe y sometidos a sham. Notablemente los valores séricos de GOT y GPT de animales precondicionados con Fe y sometidos a IR, no difieren de los valores control (salino-sham y Fe-sham). Más aún, el precondicionamiento con Fe disminuyó significativamente ($p < 0,05$) los valores de GOT y GPT (2,7 y 2,3 veces, respectivamente), en relación al grupo salino-IR.

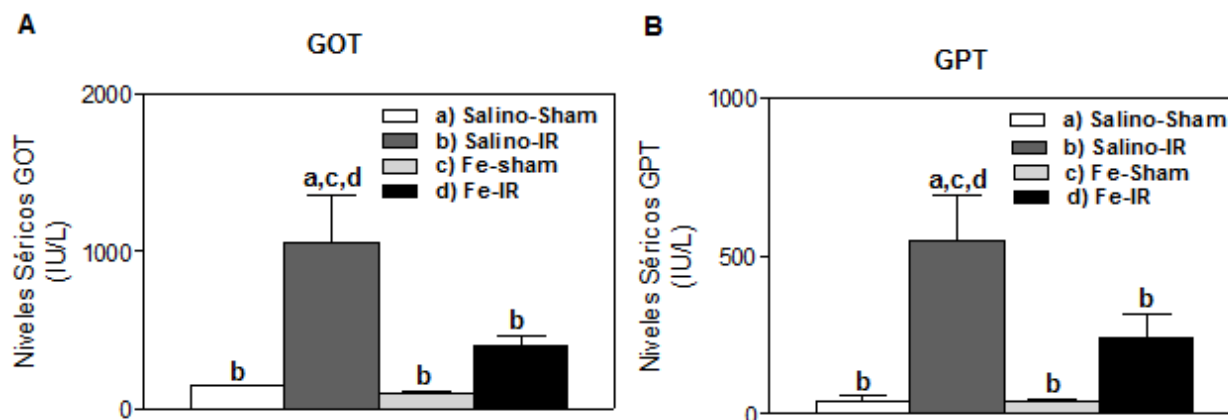


Figura 3: Actividades séricas de GOT (A) y GPT (B) luego de la IR hepática, en animales no-preacondicionados y preacondicionados con Fe. Los valores son promedios \pm SEM de 3-4 animales por grupo experimental. Las letras que identifican a cada grupo experimental indican diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA y test de Newman-Keuls).

La figura 4 muestra los efectos netos de la IR sobre los valores séricos de GOT (fig. 4A) y GPT (fig. 4B). Se observa que el precondicionamiento con Fe disminuye significativamente ($p<0,05$) el incremento de GOT (68% fig. 4A) y el de GPT (60% fig. 4B).

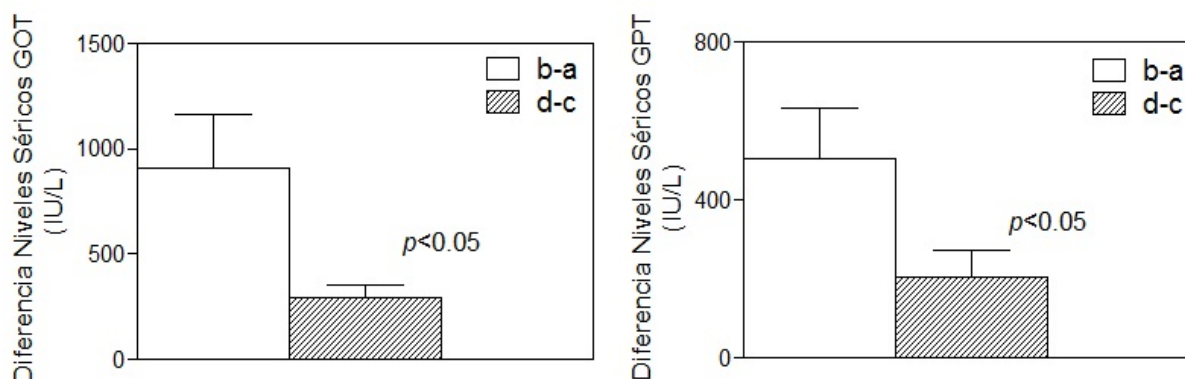


Figura 4: Efectos netos de la IR en los niveles séricos de GOT (A) y GPT (B), en condiciones de no tratamiento con Fe [salino-IR (b) – salino-sham (a)] y luego de la administración de Fe [Fe-IR (d) – Fe-sham (c)]. Los valores, promedios \pm SEM para 3-4 animales por grupo experimental, fueron analizados por la prueba t de Student ($p<0,05$) para datos no pareados.

Estos resultados corroboran el daño producido por la IR y el efecto precondicionante del Fe frente a la IR.

Efectos de la suplementación con Fe en la expresión hepática de iNOS

Niveles de mRNA de iNOS

Las imágenes obtenidas de los geles de la electroforesis de los productos de RT-PCR de iNOS y 18S se muestran en la Figura 5A y 5B, respectivamente.

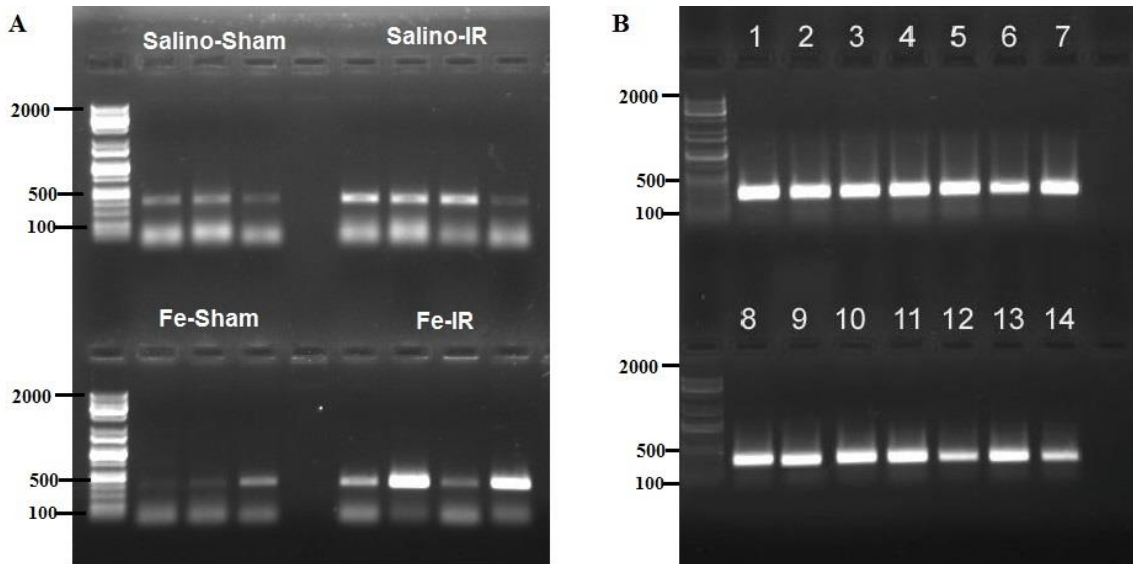


Figura 5: Electroforesis de productos de RT-PCR en geles de agarosa

A: Fotografía del gel en el cual se realizó la electroforesis con los productos de RT-PCR de iNOS, los cuales tenían 417 pb. Los grupos experimentales están marcados sobre los carriles correspondientes, siendo los primeros carriles los correspondientes al marcador de peso molecular de DNA.

B: Fotografía del gel en el cual se realizó la electroforesis con los productos del RT-PCR de 18 S, los cuales tenían 324 pb. Los carriles fueron marcados con números que corresponden a las muestras utilizadas y los primeros carriles de ambas filas corresponden al marcador de peso molecular de DNA.

En la Figura 5A se observa mayor expresión hepática de iNOS en animales preacondicionados con Fe y sometidos a IR señalado por la mayor intensidad de bandas correspondientes al producto de RT-PCR (417 pb).

En la Figura 5B se muestra la prueba control utilizada para RT-PCR correspondiente a la amplificación del RNA ribosomal 18 S, utilizado para corroborar la presencia de cDNA y por lo tanto de mRNA en las muestras utilizadas. Se observa amplificación en todas las muestras, confirmando la presencia de cDNA y el buen funcionamiento de la técnica.

Los niveles de mRNA de iNOS y los efectos netos se muestran en la Figura 6A y 6B, respectivamente. Se puede observar que el preacondicionamiento con Fe gatilla

aumento de la expresión hepática de iNOS frente a IR, como lo indica el incremento de 5,2 veces ($p<0,05$) en la expresión de iNOS en relación al grupo control. Expresión hepática de iNOS similar al grupo salino-sham se observa en animales tratados con Fe y sometidos a sham.

La expresión hepática de iNOS de animales sometidos a IR no difiere notablemente de los valores control (salino-sham y Fe-sham), sin embargo se observa un aumento de 1,64 y 2,03 veces respectivamente, indicando que IR induce un leve aumento de la expresión de iNOS.

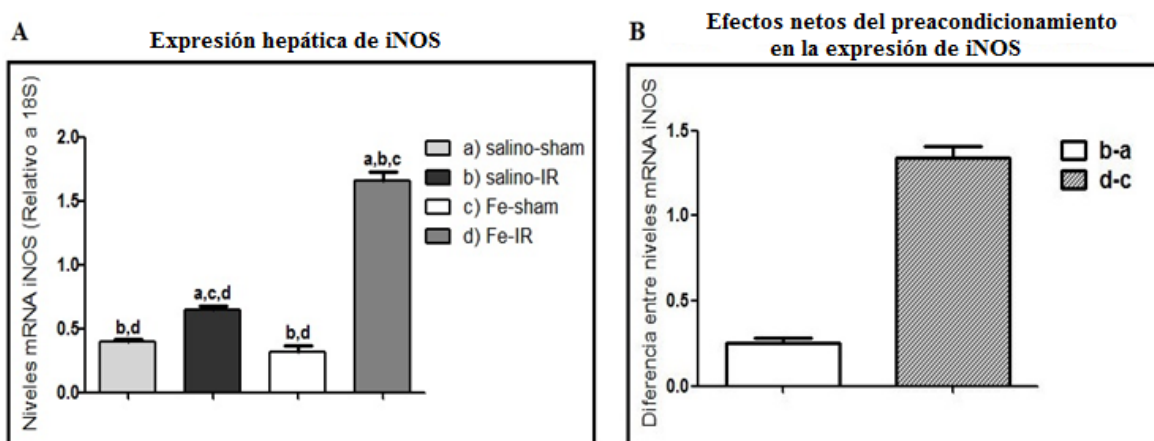


Figura 6A: Niveles de mRNA de iNOS relativo a mRNA de 18S luego de IR hepática en animales tratados y no tratados con Fe. Los valores son promedios \pm SEM de 3-4 animales por grupo experimental. Las letras que identifican a cada grupo experimental indican diferencias significativas ($p<0,05$, ANOVA y test de Newman-Keuls).

Figura 6B: Efectos netos de la IR en la expresión hepática de iNOS, en condiciones de no tratamiento con Fe [salino-IR (b) – salino-sham (a)] y luego de la administración de Fe [Fe-IR (d) – Fe-sham (c)]. Los valores, promedios \pm SEM para 3-4 animales por grupo experimental, fueron analizados por la prueba t de Student ($p<0,05$) para datos no pareados.

La Figura 6B muestra los efectos netos de la IR sobre la expresión de iNOS en animales tratados y no tratados con Fe. Se observa que el preconditionamiento con Fe aumenta significativamente ($p<0,05$) la expresión de iNOS (81% fig. 6B).

Estos resultados indican que el precondicionamiento con Fe frente a IR aumenta la expresión hepática de iNOS.

Efectos de la suplementación con Fe en la actividad hepática de iNOS

Concentraciones séricas de nitritos/nitratos

Concentraciones séricas de nitritos/nitratos en animales tratados y no tratados con Fe, se muestran en la Figura 7.

Se puede observar que el precondicionamiento con Fe frente a IR incrementa la actividad NOS hepática, como indica aumento de 1,3 veces ($p < 0,05$) en las concentraciones de nitritos/nitratos en relación al grupo control. Notablemente los valores de nitritos/nitratos de animales no tratados sometidos a IR, no difieren de los valores control (salino-sham y Fe-sham).

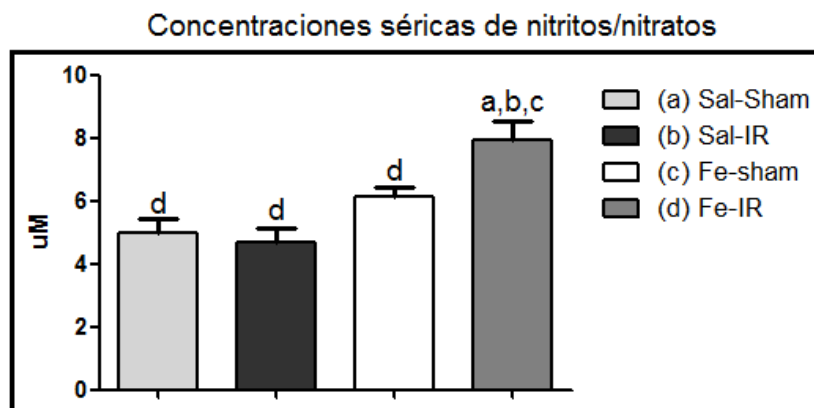


Figura 7: Concentraciones séricas de nitritos/nitratos luego de IR hepática, en animales no precondicionados y precondicionados con Fe. Los valores son promedio \pm SEM de 3-4 animales por grupo experimental. Las letras que identifican a cada grupo experimental indican diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA y test de Newman-Keuls).

DISCUSIÓN

El estado de EOX transiente inducido por la administración subcrónica de Fe juega un rol fundamental en el preconditionamiento hepático, gatillando respuestas citoprotectoras. Este EOX transiente inducido por Fe es esencial para la protección contra la injuria generada por IR desencadenando respuestas citoprotectoras mediante mecanismos como la recuperación de la actividad de unión a DNA del NF- κ B, la activación del factor de transcripción Nrf2 y la supresión de la respuesta pro-inflamatoria que desencadena la liberación de TNF- α , entre otras²⁹.

Los resultados obtenidos en este estudio en la determinación de la actividad de las transaminasas, confirma que el protocolo de administración subcrónica de Fe es capaz de disminuir la injuria producida por la IR. La notable disminución de la actividad de GOT y GPT en animales tratados con Fe y sometidos a IR en relación a los animales no tratados y sometidos a IR, corroboran el efecto preconditionante del Fe frente a la IR hepática.

Datos presentados en estudios anteriores indican que la sobrecarga de Fe conduce a aumentar la actividad NOS hepática que se relaciona con la regulación al alza de la iNOS y demuestran la importancia del \bullet NO en la disminución de la injuria causada por la IR⁴, estos resultados se relacionan con los obtenidos en este estudio donde hubo un aumento en la expresión de la iNOS y en la actividad NOS hepática posterior a la administración subcrónica de Fe.

El \bullet NO en el preconditionamiento con Fe podría ser uno de los mecanismos protectores frente a la injuria causada por IR. Estudios previos han demostrado que la disminución de los niveles de \bullet NO mediante su inhibición por *N*^G-nitro-L-arginine methyl

ester (L-NAME) derivan en una menor acción atrapadora de EROS y compromete el proceso de quelación del Fe redox-activo lo cual favorece la injuria generada por la IR⁴, esto indica que niveles altos de •NO podrían constituir uno de los mecanismos de defensa frente a la IR proporcionando efectos hepatoprotectores y anti-inflamatorios que podrían relacionarse a un control de feedback negativo producido por la regulación al alza de la iNOS para disminuir la excesiva activación de NF-κB y la transcripción de sus genes blanco durante el protocolo de IR, esto permite la recuperación de la unión a DNA de NF-κB lo que resulta en un control de la expresión de iNOS que se pierde posterior a IR²⁸.

El potencial rol que juega el •NO en la inhibición de la activación de NF-κB y la expresión de genes pro-inflamatorios durante la IR involucra el atrapamiento de EROS con el fin de disminuir las biomoléculas oxidantes y la activación de NF-κB, la nitrosilación de NF-κB p50 que disminuye la unión a DNA y la inducción o estabilización de IκB para inactivar NF-κB²⁸.

Los resultados de este estudio indican que el preacondicionamiento con Fe previo a IR se asocia a un aumento de la expresión de iNOS y a una mayor actividad NOS hepática expresada en el incremento de los niveles de nitritos/nitratos séricos. Cabe destacar que la IR de igual forma aumenta la expresión de iNOS, sin embargo sus efectos netos son significativamente mayores en el grupo preacondicionado con Fe en comparación al grupo no tratado.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio señalan que el preacondicionamiento con Fe frente a la IR se asocia a una mayor expresión de iNOS y a un incremento en la actividad NOS hepática.

ANEXO

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE
INVESTIGACION EN ANIMALES

Investigador: Virginia Fernández

Aprobación: N° CBA 0381 FMUCH

PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO 2010:

A.- ANTECEDENTES ADMINISTRATIVOS

- 1.- Título del Proyecto: **“PRECONDITIONING STRATEGIES TO PROTECT THE LIVER FROM ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY”**
- 2.- Académico Responsable: Virginia Fernández Arancibia
Jerarquía académica: Profesor Titular
- 3.- Laboratorio o Unidad Docente al que pertenece el Académico Responsable
Laboratorio de estrés oxidativo y hepatotoxicidad
- 4.- Unidad Académica (Departamento, Escuela o Programa Disciplinario).
Programa de Farmacología, ICBM
- 5.- Teléfono: 9786256 e.mail: vfernand@med.uchile.cl Fax: 7372783
- 6.- Financiamiento del Proyecto. **FONDECYT**

Señale la Institución que avala el desarrollo de la investigación. Si el financiamiento proviene de su Unidad Académica incluya una carta de respaldo del Director que corresponda.

7.- Listado de personas autorizadas para el manejo de los animales. Indique su capacitación, función (ej. NN, bioquímico, inoculación de animales) y vínculo con el laboratorio o Unidad Docente. **NO OLVIDE** que debe comunicar oportunamente al Comité si se produce un cambio en el presente listado.

NOMBRE	CAPACITACIÓN	FUNCIÓN	VINCULO/LAB./UD
Virginia Fernández Arancibia	Doctor en Ciencias con mención en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile	Tratamientos especiales (dietas e inyecciones)	Investigador Responsable
Gladys Tapia Opazo	Doctor en Ciencias Biomédicas, facultad de Medicina, Universidad de Chile	Tratamientos especiales (dietas e inyecciones)	Co-investigador
Rosa Salinas Paredes	Instrucción otorgada por investigadores del laboratorio	Tratamientos especiales (dietas e inyecciones)	Auxiliar
Camila Dossi Muñoz	Médico Veterinario	Cirugías y post-operatorio	Asesor externo del proyecto

8.- Teléfono en caso de una emergencia con los animales en horario no laboral

Avisar a: Virginia Fernández Arancibia Teléfono: **08-233 1270 o 02-4180234**

B.- ANTECEDENTES DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

- 1.- Especie(s) utilizada(s): **Cepa Sprague-Dawley especie *Rattus norvegicus***
- 2.- Edad/Estado de desarrollo: **2 meses**
- 3.- Peso: **.150 a 180 grs**
- 4.- Sexo: **Macho**

- 5.- Lugar de obtención de los animales: **BIOTERIO CENTRAL, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE**
- 6.- Lugar de mantención (Todo bioterio debe cumplir con las normas internacionales de mantención de animales de experimentación, Ref. Manual de Animales de Laboratorio (NIH): **BIOTERIO CENTRAL, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE**
- 7.- Lugar de procedimientos: **Bioterio Central y Laboratorio de estrés oxidativo.**
- 8.- Ubicación física del lugar de procedimientos (Ej., zócalo pabellón E1, Programa...) **Bioterio Central: 3^{er} piso, sector B; Laboratorio de estrés oxidativo, Programa de Farmacología: sector D, piso zócalo.**
- 9.- Número total de animales a utilizar: **Aproximadamente 140 animales/año; 420 animales durante todo el proyecto.**
- 10.- Método(s) de Identificación del animal: **Marcado en la cola con lápiz indeleble**
- 11.- Si el lugar de obtención de los animales **es distinto** del lugar de mantención, indique detalladamente las condiciones de transporte de los animales. Remita certificación del SAG o institución autorizada, si procede.

Los animales serán retirados desde el Bioterio Central y trasladados en jaulas cubiertas utilizando el pasillo central de la Facultad para acceder al Laboratorio de estrés Oxidativo y Hepatotoxicidad. El retiro y traslado se realizará normalmente después de las 4 PM.

C.- PROPÓSITOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.- Señale el o los propósito(s) principal(es) del Proyecto en un párrafo no superior a 12 líneas. Éstos deben ser explicados de manera que sean **comprensibles para el ciudadano común, informado**. Además, **la relevancia** del Proyecto debe quedar clara para cualquier evaluador éticista.

Diversas situaciones médico-quirúrgicas que involucran inicialmente una disminución del flujo sanguíneo a un tejido [isquemia (I)], con ausencia o disminución

del aporte de oxígeno y nutrientes a éste, y que son seguidas de reperfusión (R) cuando se restablece la circulación normal al tejido, desencadenan daño celular asociado a la IR. El conocimiento y prevención del daño inducido por la IR es de interés en el trasplante de órganos y en otras situaciones clínicas frecuentes (cirugía hepática bajo exclusión vascular, infarto miocárdico, accidente cerebrovascular, traumatismos mayores). El diseño de estrategias que protejan a un órgano del daño por IR (preacondicionamiento) es de gran interés para la clínica. El propósito de este proyecto es estudiar mecanismos moleculares asociados al preacondicionamiento hepático otorgado por la administración conjunta de hormona tiroidea (T_3) y por hierro(Fe)-dextrano, frente a una IR posterior.

- 2.- Justifique el uso de **ANIMALES**, en vez de usar modelos alternativos.

El uso de ratas en este estudio se debe a que ellos representan un buen modelo de estudio alternativo al humano, ya que los resultados obtenidos en estos animales son extrapolables a la fisiopatología humana. No es posible sustituir el modelo animal por otro, como por ejemplo células en cultivo, ya que **este estudio se centra** en una respuesta sistémica y principalmente del órgano blanco de nuestro estudio, el hígado.

- 3.- Explique las características que justifiquen el uso de esta(s) **ESPECIE(s)**

Los estudios que hemos realizado, utilizando el modelo de inducción de estrés oxidativo hepático en el hipertiroidismo experimental (administración de T_3), como también en la administración de Fe, han utilizado esta cepa de ratas por lo cual no es posible utilizar alguna otra. Con respecto a modelos alternativos, como ya se indicó en el párrafo anterior es imposible sustituir el modelo animal por el de células en cultivo ya que **este estudio se centra** en la respuesta del órgano completo (hígado) como también en evaluaciones en el suero de estos animales.

- 4.- Justifique el **NÚMERO** de animales a utilizar. Recuerde que de acuerdo a las normas internacionales de bioética animal, **se debe utilizar el mínimo** de animales necesario para obtener resultados válidos

El número señalado (150 animales/año) corresponde al mínimo para obtener resultados estadísticamente analizables. Se formarán **14 grupos experimentales** en total, **aproximadamente 30 animales/grupo en los 3 años del proyecto**. De cada animal se obtendrán muestras de sangre (transaminasas y TNF- α) e hígado (factores de transcripción, expresión de proteínas y parámetros de estrés oxidativo) para evaluar lo señalado entre paréntesis. Es importante señalar que nuestro esquema de trabajo nos

permite utilizar un mismo animal para estudios sanguíneos y hepáticos, con lo cual se logra un mayor aprovechamiento y una disminución significativa en el número de animales experimentales.

Detalle del número de animales que se utilizarán en cada etapa del proyecto:

Año-1:

(1) Evaluación de la participación del estrés oxidativo en el precondicionamiento con Fe

- Eliminación del estrés oxidativo inducido por Fe:

Grupos experimentales: Salino-salino; Salino-Fe; NAC-Fe; NAC-salino: 4 grupos x 3 animales en cada grupo x 3 (3 períodos post-Fe diferentes) = **36**

- Participación de EOX en el precondicionamiento con Fe

Grupos experimentales para parámetros de daño hepático (transaminasas e histologías): Salino-salino-Sham; Salino-Salino-IR; Salino- Fe-Sham; Salino-Fe-IR; NAC-salino-Sham; NAC-Salino-IR; NAC- Fe-Sham; NAC-Fe-IR: 8 grupos x 6 animales en cada grupo = **48**

Grupos experimentales para parámetros de estrés oxidativo hepático (glutación e isoprostanos) estudio que requiere hígados lavados por lo cual no se pueden utilizar los mismos hígados del estudio anterior: Salino-salino-Sham; Salino-Salino-IR; Salino- Fe-Sham; Salino-Fe-IR; NAC-salino-Sham; NAC-Salino-IR; NAC- Fe-Sham; NAC-Fe-IR: 8 grupos x 6 animales en cada grupo = **48**

(2) Evaluación de la participación de las células de Kupffer en el precondicionamiento con Fe

- Grupos experimentales: Salino-salino-Sham; Salino-Salino-IR; Salino- Fe-Sham; Salino-Fe-IR; GdCl₃-salino-Sham; GdCl₃-Salino-IR; GdCl₃- Fe-Sham; GdCl₃-Fe-IR: 8 grupos x 6 animales en cada grupo = **48**

Los grupos se han considerado de 6 animales ya que esta cantidad es la mínima para obtener resultados reproducibles y estadísticamente analizables.

Esto da un total de **180 animales** para el año 1.

Año-2

(1) Evaluación de un período de tratamiento con Fe que induzca estrés oxidativo moderado pero que no induzca preconditionamiento. Se probará un mínimo de 3 períodos (2, 3 y 4 dosis de Fe)

- Inducción de estrés oxidativo (estudio cinético a 3 tiempos)

Grupos experimentales: Salino; Fe: 2 grupos x 3 animales en cada grupo x 3 tiempos de preconditionamiento = **18** animales

- Estudio del período de tratamiento con Fe que induzca estrés oxidativo moderado pero que no induzca preconditionamiento

Grupos experimentales para parámetros de daño hepático (transaminasas e histologías): salino-sham; salino-IR; Fe-sham; Fe-IR x 6 animales en cada grupo x 3 períodos de tratamiento (dosis de Fe) diferentes = **54** animales

Grupos experimentales para parámetros de estrés oxidativo hepático (glutación e isoprostanos) estudio que requiere hígados lavados por lo cual no se pueden utilizar los mismos hígados del estudio anterior: salino-sham; salino-IR; Fe-sham; Fe-IR x 6 animales en cada grupo x 3 períodos de tratamiento (dosis de Fe) diferentes = **54** animales

- Evaluación del preconditionamiento hepático inducido por Fe y T₃:

Grupos experimentales para parámetros de daño hepático (transaminasas e histologías): Salino-NaOH-Sham; Salino-NaOH-IR; Salino-T₃-Sham; Salino-T₃-IR; Salino-Fe-Sham; Salino-Fe-IR; Fe-T₃-Sham; Fe-T₃-IR: 8 grupos x 6 animales en cada grupo = **48**

Grupos experimentales para parámetros de estrés oxidativo hepático (glutación e isoprostanos) estudio que requiere hígados lavados por lo cual no se pueden utilizar los mismos hígados del estudio anterior: Salino-NaOH-Sham; Salino-NaOH-IR; Salino-T₃-Sham; Salino-T₃-IR; Salino-Fe-Sham; Salino-Fe-IR; Fe-T₃-Sham; Fe-T₃-IR: 8 grupos x 6 animales en cada grupo = **48**

Los grupos se han considerado de 6 animales ya que esta cantidad es la mínima para obtener resultados reproducibles y estadísticamente analizables.

Esto da un total de **222 animales** para el año 2.

Año-3

Para desarrollar los objetivos de este año se utilizará muestras congeladas guardadas de los años anteriores. Se solicitó un total de 420 animales para los 3 años. Los 18 restantes se justifican por posibles repeticiones que sea necesario realizar.

D.- DESCRIPCIÓN GENERAL DEL EXPERIMENTO

1.- Describa la secuencia de **TODOS** los procedimientos a seguir con los animales. Explícite el curso temporal en los procedimientos crónicos. El detalle de procedimientos no quirúrgicos (manipulación y administración de sustancias) debe incluirse en la **Sección E**. El detalle de los procedimientos quirúrgicos debe incluirse en la **Sección F**.

- El diseño de los grupos experimentales (**14 en total**) incluye grupos con (i) operación simulada (sham, control), (ii) IR, (iii) T₃ (0,05mg/kg, dosis única) y Fe-dextrano (dosis a determinar, la cual se administrará cada 2 días durante 5 a 15 días) (T₃/Fe)-IR y (iv) T₃/Fe-IR. Ambas administraciones se realizarán por vía intraperitoneal (i.p.) para lo cual los animales serán sujetos por un manipulador que ya posee experiencia y que usará guantes quirúrgicos y un guante adicional (protector) de material suave para no provocar daño al animal. Se utilizarán jeringas tuberculinas desechables. Cada grupo experimental estará constituido por un mínimo de 7 animales/año.
- Los animales se mantendrán en ayuno, con acceso libre al agua, 10 a 12 horas previo a la cirugía.
- La cirugía se realizará con técnica estéril, de acuerdo a modelos de isquemia-reperusión hepática en la rata (Nauta R., y col., J Invest Surg. 1, 155, 1988; Nauta R., y col. Surg. Res. Comm., 6, 241, 1989).
- Previo a la cirugía los animales serán anestesiados con 1cc/kg de peso de Zoletil 50® (clorhidrato de tiletamina 50mg/kg y clorhidrato de zolazepam 50mg/kg) por vía intraperitoneal (i.p.).
- La cirugía se realizará sobre camilla termorregulada (Barnstead Lab Line) para asegurar la homeostasis de los animales. Los detalles de la cirugía están en la sección F.
- Luego del preacondicionamiento por T₃/Fe o tratamientos con los respectivos vehículos, todos los animales serán sometidos a **una sola intervención quirúrgica (isquemia o cirugía simulada de 60 minutos)**.
- La reperusión tendrá una duración de 20 horas, durante la cual los animales recibirán cuidados post-operatorios (ver F4).
- Al término de la reperusión se obtendrán muestras de suero o hígado, previo a lo cual los animales serán anestesiados de manera similar a la descrita en la sección F4 (eutanasia).
- Nuestros estudios no consideran la obtención de muestras de sangre durante la reperusión. Estas serán obtenidas sólo al término de la reperusión, previo a la extracción del hígado. La obtención de sangre al término de la reperusión, previa anestesia de los animales según lo descrito en el protocolo de Bioética, se realizará mediante punción cardíaca utilizando tubos veno-jet para recibir las muestras de sangre.
- Los resultados obtenidos en nuestros estudios serán expresados como promedios ± error estándar de la media y las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales serán evaluadas mediante ANOVA unifactorial seguido del test de Newman-Keuls, con un límite de confianza de 95% (p<0,05)

2.1 PAUTA DE SUPERVISION DE ANIMALES

Se recomienda que en todos los procedimientos experimentales, especialmente aquellos que involucren procedimientos quirúrgicos de tipo invasivo, se incluya un protocolo de supervisión de los animales que se utilizarán para la investigación. Uno de los protocolos mas empleados es el propuesto por Morton y Griffiths (**Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment** : *Vet Rec* 116: 431-436, 1985), el cual permite cuantificar el dolor y aflicción causados por un determinado procedimiento para poder tomar las medidas apropiadas para aliviarlos. Este protocolo considera 5 características y a cada animal se le asignará una puntuación por cada una de éstas características, de acuerdo a las variables mencionadas en la siguiente tabla:

Se anexa el siguiente Protocolo de Supervisión, basado en el propuesto por Morton y Griffiths (*Vet Rec* 116: 431-436, 1985), adaptado a ratas y al protocolo experimental, el cual permitirá cuantificar el dolor causado por un determinado procedimiento.

Este protocolo considera 5 características y a cada rata se le asignará una puntuación por cada una de estas características, de acuerdo a las variables mencionadas en la siguiente

Tabla:

CARACTERISTICA	VARIABLE	PUNTUACION
Pérdida de peso	Ausente	0
	Inferior al 10%	1
	Entre 10 y 20%	2
	Superior al 20%	3
Aspecto	Normal	0
	Pelo en mal estado	1
	Presencia de secreciones oculares o nasales	2
	Postura anormal	3
Comportamiento espontáneo	Normal	0
	Cambios pequeños	1
	Inactividad	2
	Ratas muy inquietas o inmóviles	3
Comportamiento frente a la manipulación	Normal	0
	Cambios pequeños	1
	Cambios moderados	2
	Ratas agresivas o comatosas	3
Constantes vitales	Normal	0
	Cambios pequeños	1
	Cambios moderados en la frecuencia cardíaca o respiratoria	2
	Cambios significativo en la frecuencia cardíaca o respiratoria	3

Las variables indicadas serán evaluadas por la Srta. Camila Dossi Muñoz, médico veterinario, quien posee amplia experiencia en clínica de animales pequeños.

La evaluación se realizará diariamente desde el comienzo de cada tratamiento (Fe, cloruro de gadolinio, hormona tiroidea). Si una rata obtiene una puntuación de 3 en más de una variable, se le considerará una puntuación final en el rango de 15-20.

Anexo a protocolo de supervisión

A pesar que las 3 drogas que se utilizarán en el estudio (Fe, T₃ o GdCl₃) no han gatillado reacciones adversas (FONDECYT 1050131 y 1080039), para detectar alteraciones por la ingesta de éstas, como también cualquier complicación post-quirúrgica, se contará con la supervisión de la Srta Camila DOssi Muñoz médico veterinario, quien posee amplia experiencia en clínica de animales pequeños. Del mismo modo durante la recuperación post-quirúrgica, período en el cual los animales contarán con calefacción adecuada y estarán en jaulas separadas, habrá una constante observación de ellos también realizada por la Srta. Camila Dossi Muñoz. Se reitera que durante el período post-operatorio, se administrará 1mg/kg vía subcutánea de ketoprofeno al 1% (Naxpet®, Laboratorio Dragpharma) para producir analgesia.

La medida a la cual recurrirá el médico veterinario para paliar el sufrimiento de las ratas se determinará de acuerdo a la siguiente puntuación total:

0-4: Rata normal.

5-9: Rata requiere supervisión cuidadosa y se evaluará el uso de analgésicos.

10-14: Rata sufre intensamente, requiere analgésicos y se evaluará su muerte por eutanasia.

15-20: Rata sufre excesivamente y se someterá a eutanasia mediante sobredosis de anestesia.

2.2.- Agregue otros criterios de supervisión de animales (otros sistemas, ej: sistema nervioso, digestivo etc.). Los criterios indicados son adecuados. No tengo otros.

Con mi firma al final del Protocolo me comprometo a observar esta pauta.

3.- Describa los **criterios de interrupción o punto final** del trabajo con el animal, durante el experimento, además de lo indicado en D.2.

(Incluya en su descripción el procedimiento esperado de finalización y las circunstancias en que el experimento será interrumpido para evitar sufrimientos innecesarios al animal.

Si su protocolo incluye experimentos crónicos con inducción de patologías, indique explícitamente en qué momento se sacrificarán los animales y qué grado de compromiso de bienestar general se espera en esas condiciones).

Se pondrá fin a un experimento en las siguientes situaciones:

- a) Muerte espontánea del animal durante el experimento
- b) Conducta anormal del animal posterior al período de anestesia
- c) Detección, durante la cirugía, de infección, ruptura de la sutura, hemorragia y otros.

Además de las situaciones ya expuestas (muerte espontánea del animal durante el experimento; conducta anormal del animal posterior al período de anestesia; detección, durante la cirugía, de infección, ruptura de la sutura, hemorragia y otros) se aplicará este criterio frente a reacciones adversas al Fe, T₃ y/o GdCl₃.

En todas estas situaciones los animales serán sometidos a eutanasia, previa anestesia con 1cc/kg de peso de Zoletil 50® (clorhidrato de tiletamina 50mg/kg y clorhirato de zolazepam 50mg/kg) i.p.

Explicitación de criterios de punto final aplicado a ratas:

(1) Por postura anormal se entienden aquellas posiciones que adopta el animal cuando principalmente siente dolor. Existen algunos signos inequívocos de presencia de dolor en ratas como (i) reducción de la ingesta, (ii) pérdida de peso, (iii) aislamiento, (iv) automutilación, (v) disnea, (vi) agresión, (vii) pilo erección. La POSTURA ANORMAL se manifiesta por arqueamiento dorsal, deshidratación, temblores, vocalización.

(2) Una conducta significativamente alterada o moderadamente alterada será basada en el sistema de puntuación que evalúa comportamiento, apariencia, peso, apetito, marcha del animal.

E.- PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS. (Manipulación del animal y administración de sustancias).

- 1.- Identifique y describa el o los procedimiento(s) no quirúrgico(s) a realizar. **(Incluya en su descripción** Administración de sustancias, vía, sitio y forma de hacerlo, volumen, horario y frecuencia, métodos de sujeción o inmovilización del animal, uso de radiación: Dosis, horario y frecuencia, otros procedimientos: estudios de supervivencia – biopsias)

El precondicionamiento con Fe/T₃ contempla la administración de 1 a 6 dosis de Fe-dextrano (50mg/kg) en días alternativos, seguido de una dosis única de 0,05mg/kg de peso i.p. de L-3,3',5'-triiodotironina (T₃), 48 horas previas a la IR. Ambas administraciones serán por inyección i.p. utilizando jeringas desechable y en todos estos tratamientos el volumen total inyectado será de alrededor de 0,2 mL.

- 2.- Indique nombre y experiencia de la(s) persona(s) que efectuará(n) los procedimientos no quirúrgicos

Los tratamientos serán impartidos en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina por la Sra. Rosa Salinas Paredes, ayudante técnico que ha sido adiestrada en el manejo y tratamiento de los animales por académicos con amplia experiencia en este ítem.

- 3.- Indique las condiciones en que se mantendrán los animales en los períodos entre las distintas intervenciones

Los animales serán mantenidos en la sala de Procedimientos del Bioterio Central, Facultad de Medicina. Durante la cirugía los animales estarán en el laboratorio de “Estrés oxidativo y hepatotoxicidad” en las condiciones que se describen en la sección F.

F.- PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

- 1.- Identifique y describa el o los procedimiento(s) quirúrgico(s) a realizar. Indique métodos de asepsia que utilizará.

Previo a la cirugía, los animales serán retirados desde el Bioterio Central y trasladados en jaulas cubiertas utilizando el pasillo central de la Facultad para acceder al Laboratorio de estrés Oxidativo y Hepatotoxicidad. El retiro y traslado se realizará

normalmente después de las 4 PM. Los animales no serán anestesiados previo a su traslado. La cirugía se realizará en el Laboratorio de Estrés Oxidativo y Hepatotoxicidad. No se trasladarán vísceras. Los animales permanecerán al menos 12 horas en el laboratorio, previo a la cirugía, permaneciendo en un ambiente termorregulado (calefactores eléctricos) recibiendo agua y alimento (los animales que serán sometidos a cirugía serán ayunados durante 6 horas).

La cirugía se realizará en condiciones de esterilidad y sobre camilla termorregulada para asegurar la homeostasis de los animales. Una vez anestesiados, se posicionarán sobre la camilla con sujeción por las patas con cinta autoadhesiva (masking tape). El paño del campo quirúrgico y el equipo que se utilizará serán esterilizados previamente. Se afeitará el abdomen (rasuradora eléctrica estéril) se pincelará con povidona yodada y se realizará incisión media supra e infraumbilical con bisturí número 15 hasta exponer las vísceras, las cuales se desplazarán con gasa estéril para visualizar la tríada portal. Utilizando tórculas de algodón estériles para tracción-contratracción, se expondrá la bifurcación del pedículo hepático que irriga los lóbulos superior medio y laterales izquierdo y derecho, donde se ubicará el clip Swartz estéril y atraumático (Fine Science Tools, Vancouver, BC, Canada). Aproximadamente a los 45 minutos de cirugía se administrará 1/3 de la dosis inicial de la anestesia, intra-abdominal directa. Se ha comprobado que esta dosis y tiempo son seguros y efectivos en el control de la anestesia.

Una vez terminado el procedimiento (60 minutos totales) se retirará el clip, se cerrará la cavidad abdominal con puntos totales, separados, con seda 3-0 y se pincelará con povidona yodada. Los animales quedarán en recuperación en jaulas separadas, con acceso libre al agua y comida durante 20 horas (reperfusión), al cabo de los cuales se realizarán las mediciones descritas en la **sección D.1**. Del mismo modo, en algunos grupos experimentales se obtendrán muestras sanguíneas durante el período de perfusión, según lo descrito en la **sección D.1**.

- 2.- Indique nombre y experiencia de la(s) persona(s) que efectuará(n) procedimientos quirúrgicos

Camila Dossi Muñoz, médico Veterinario, quien posee una importante experiencia en cirugía de animales pequeños y medianos ya que ha trabajado en clínica veterinaria en procesos de cirugía de animales pequeños y medianos. El Sr. Jiménez ha realizado todas las cirugías de nuestros animales de experimentación en lo proyectos FONDECYT 1080039 y 1090021.

- 3.- Condiciones del lugar donde se efectuará el procedimiento quirúrgico

El **Laboratorio de “Estrés oxidativo y hepatotoxicidad”**, cuenta con mesa para cirugías, la que incluye la camilla termorregulada, además de lámparas quirúrgicas (luz

fría). El recinto cuenta con división de áreas limpia y sucia, armado del campo quirúrgico con paños estériles y un lugar calefaccionado donde se ubican las jaulas con los animales que están en recuperación quirúrgica. El equipo quirúrgico utiliza gorro, mascarilla, delantal de procedimientos y guantes estériles.

- 4.- Si el o los procedimientos(s) quirúrgico(s) incluye **supervivencia del animal indique** el cuidado postoperatorio requerido e identifique a la persona responsable

Posterior a la cirugía, los animales se recuperan en un plazo aproximado de 1 hora. Sólo requieren estar en jaulas separadas y se les provee de almohadillas y calefacción adecuada para una recuperación más confortable. Sólo requieren de observación de la posición que adopten (para mantener la vía aérea permeable), acceso fácil a agua y comida y temperatura agradable. La vigilancia de los animales estará a cargo de la Srta. Camila Dossi Muñoz, médico veterinario, quien ha desarrollado una importante experiencia en procedimientos quirúrgicos y post-quirúrgicos de animales pequeños y medianos por su labor como médico veterinario en clínicas y en todos los procesos quirúrgicos de nuestros animales de experimentación en los proyectos FONDECYT 1080039 y 1090021. Durante el período post-operatorio, se administrará 5mg/kg vía subcutánea de ketoprofeno al 1% (Naxpet®, Laboratorio Dragpharma) para producir analgesia.

- 5.- Indique si los animales a utilizar en el estudio, han sido previamente sometidos a algún procedimiento invasivo o quirúrgico

NO APLICA

- 6.- Justifique si un mismo animal será sometido a procedimientos quirúrgicos más de una vez.

NO APLICA

G. DOLOR Y AFLICCIÓN.

Este proyecto no incluye la manipulación de peces adultos. Los embriones utilizados en este protocolo experimental son finalmente siempre sacrificados. En cada experimento de este tipo los embriones previo al sacrificio son anestesiados con triclaína, por lo que su dolor o aflicción se reduce al mínimo.

- 1.- **Indique en la Tabla**, cuántos animales sufrirán las siguientes categorías de dolor y/o aflicción.

Nº animales usados cada año			
	Año 1	Año 2	Año 3
A. Dolor o aflicción mínimo, transitorio	100	100	100
B. Dolor o aflicción aliviado por medidas apropiadas	50	50	50
C. Dolor o aflicción sin alivio asistido	0	0	0

- 2.- **Anestesia, Analgesia y Tranquilizantes.** Para los animales indicados en la **Tabla, filas A o B, especifique** los anestésicos, analgésicos, sedantes o tranquilizantes que serán utilizados. Indique el (los) nombre(s) de(los) agente(s) usado(s), la dosis, ruta y frecuencia de administración.

Se utilizarán los siguientes anestésicos, analgésicos y sedantes.

- (1) Ketamina (Ketaset ®) cuya solución inyectable contiene 100 mg/mL. Es un anestésico general que induce un estado de analgesia profunda sin respuesta a estímulos dolorosos y amnesia con períodos respiratorios conservados, lo que permite el procedimiento sin necesidad de intubación. La dosis a utilizar antes de la cirugía será de 50 mg/kg. Se utilizará una dosis de refuerzo durante la cirugía (1/4 dosis inicial).
- (2) Diazepan®, en solución inyectable de 10 mg/2mL. La dosis a inyectar antes de la cirugía será de 0,3 mg/kg y ella actuará como sedante, hipnótico, relajante muscular y ansiolítico. Se utilizará una dosis de refuerzo durante la cirugía (1/4 dosis inicial).
- (3) Pentotal sódico, solución inyectable al 0,5%. Es anestésico y sedante pero estos efectos son de corta duración por lo cual sólo se le utilizará para la eutanasia (0,3 mL de la solución al 0,5%).

Todos los analgésicos y anestésicos se administrarán por vía intraperitoneal.

- 3.- Si hay animales indicados **en la fila C de la Tabla**, se debe **justificar** por qué está contraindicado el uso de anestésicos, analgésicos, sedantes o tranquilizantes durante o después de los procedimientos que causan dolor o aflicción (incluya referencias).

NO APLICA

H.- DISPOSICIÓN DE LOS ANIMALES AL FINAL DEL ESTUDIO.

- 1.- **EUTANASIA.** Describa detalladamente el método de eutanasia. Si se usa un agente químico, especifique, dosis y ruta de administración. Si su método de eutanasia incluye decapitación o dislocación cervical **SIN** anestesia, incluya una justificación científica.

La muerte de los animales ocurrirá luego de la extracción del hígado (no es posible la sobrevivencia de los animales). Previo a este procedimiento, los animales recibirán pentotal sódico (ver **sección G. 2**). No se utilizará eutanasia por decapitación o dislocación cervical. Los animales mueren, estando anestesiados, debido a la hipovolemia aguda generada por la extracción total del hígado. **El pentotal sódico se administrará por vía intraperitoneal.**

- 2.- **Eliminación de desechos.** La eliminación de los cadáveres debe realizarse de acuerdo con las normas de Bioseguridad de la Facultad de Medicina. **Si la eliminación o el destino de los cadáveres es distinto al señalado, se debe explicar.**

Los animales no sobreviven a los experimentos por lo cual son eliminados de acuerdo a normas establecidas por el **Comité de Bioseguridad de la Facultad de Medicina**. Los cadáveres se entregan de Lunes a Jueves entre las 15 y 16,45 horas en la Bodega de la Unidad de Bioseguridad, debidamente sellados, congelados y rotulados.

- 3.- **SUPERVIVENCIA** Describa la **disposición y destino** de los animales en caso de experimentos en que los animales no son eutanizados al término del procedimiento.

NO APLICA

I.-SUBSTANCIAS DAÑINAS PARA ANIMALES O SERES HUMANOS

1.- El uso de sustancias peligrosas en la investigación con animales requiere de una aprobación separada. Es su responsabilidad contar con la(s) autorización(es) correspondiente(s). Si es relevante, incluya las autorizaciones correspondientes, con este documento. **Debe comunicar a la Unidad de Bioseguridad de la Facultad, si sus animales tendrán algún riesgo potencial para seres humanos en forma directa o para el medio ambiente.**

Señale a continuación aquellas sustancias que utilizará.

	SI	NO	Lista de sustancias y documentación, si corresponde
Radionúclidos		X	
Agentes Biológicos		X	
Drogas o químicos peligrosos		X	
ADN Recombinante		X	

2.- Describa las prácticas y procedimientos requeridos para el manejo y disposición de animales contaminados y material asociado con este estudio. También describa el procedimiento para el retiro de material y basura radioactiva y el monitoreo de la radioactividad.

NO APLICA

3.- Consideraciones de seguridad adicionales:

NO APLICA

J.- MATERIAL BIOLÓGICO/PRODUCTOS ANIMALES PARA SU USO EN ANIMALES (por ej., líneas celulares, antisueros, etc).

1.- Especifique el material: **NO APLICA**

2.- Origen: ... **NO APLICA** Material estéril o pretratado Si No **NO APLICA**

3.- Indique si el material ha sido probado para las potenciales infecciones conocidas que

derivan de él Si No **NO APLICA**

4.- Certifico que este material proviene de fuentes formales, no contaminadas y no ha

estado en contacto con animales o posibles fuentes de contaminación

Si No **NO APLICA**

K.- REQUERIMIENTOS ESPECIALES

Especifique algún requerimiento especial de la investigación propuesta.

NO APLICA

L.- CERTIFICACIONES DEL ACADÉMICO RESPONSABLE

1.- **Certifico** que, a mi juicio, la investigación propuesta no constituye una duplicación innecesaria de investigaciones previas

2.- **Certifico** que todas las personas bajo mi supervisión y responsabilidad que participan en los procedimientos con los animales, trabajarán de acuerdo con las normas y reglas éticas vigentes nacionales e internacionales.

3.- Si ha completado la SECCIÓN G filas B y C:

Certifico que he revisado la literatura científica y base de datos pertinentes sin encontrar procedimientos válidos alternativos, y no estoy en condiciones de desarrollarlos.

4.- **Certifico** que los antecedentes presentados en este Protocolo **incluyen la totalidad** de los procedimientos con animales propuestos en el Proyecto.

5.- Me comprometo a solicitar y obtener la aprobación del Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile antes de iniciar **CUALQUIER** cambio al Protocolo aprobado, **sea de procedimientos** como de **personal**.

6.- Académico Responsable: Virginia Fernández

Firma

7.- V°B° Director de Programa Disciplinario/ Departamento/ Escuela

En respuesta a las observaciones del Comité de Bioética de Fondecyt (23 de Enero de 2012), se han realizado las siguientes adiciones al “Protocolo de manejo y cuidados de animales de laboratorio”

(1) En 2.1 PAUTA DE SUPERVISION DE ANIMALES, se corrigió el nombre de la especie (Rata)

(2) En 3. Describa los criterios de interrupción o punto final del trabajo con el animal, durante el experimento, además de lo indicado en D.2., se adaptó y especificó el criterio de punto final a la especie a utilizar (Rata). Los cambios han sido destacados en amarillo

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Rougemont O., Lehmann K., Clavien P.A., Preconditioning, organ preservation, and postconditioning to prevent ischemia reperfusion injury to the liver. *Liver Transpl* 2009; 15: 1172-1182.
2. Romanque P., Uribe M., Videla L. Mecanismos moleculares en el daño por isquemia-reperusión hepática y en el preacondicionamiento isquémico. *Rev. Med. Chile* 2005; 133: 469-476.
3. Galleano M., Tapia G., Puntarulo S., Varela P., Videla L., Fernández V. Liver preconditioning induced by iron in a rat model of ischemia/reperfusion. *Life Sci* 2011; 89: 221-228.
4. Cornejo P., Fernández V., Vidal M.T., Videla L.A., Hepatoprotective role of nitric oxide in an experimental model of chronic iron overload. *Nitric Oxide* 2007; 16: 143-149.
5. Ramírez P., Marín J.M., Piñero A., Chávez-Cartaya R., Parrilla P. Investigación experimental aplicada a la clínica: isquemia-reperusión hepática. *Cir. Esp.* 2000; 67: 281-91.
6. Massip Salcedo M., Roselló Catafau J., Prieto J., Avila M. A., Peralta C., The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver International* 2007; 27: 6–16.
7. Halestrap A.P., Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc T* 2006; 34: 232-237.
8. Murillo D., Kamga C., Mo L., Shiva S. Nitrite as mediator of ischemic preconditioning and cytoprotection. *Nitric Oxide* 2011; 25: 70-80.
9. Webster K.A., Graham R.M., Thompson J.W., Spiga M.G., Frazier D.P., Wilson A., Bishopric N.H., Redox stress and the contributions of BH3-only proteins to infarction. *Antioxid Redox Signal* 2006; 89-10
10. Mendes Braz M., Elias Miró M., Jiménez Castro M.B., Casillas Ramírez A., Ramalho F.S., Peralta C. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012; 1-20.
11. McCord J.M., Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Federation Proc* 1987; 46: 2402-6.
12. Jaeschke H. Molecular mechanism of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G15-G26.

13. Teoh N., De la Pena A., Farrell G. Hepatic ischemic preconditioning in mice associated with activation of NF- κ B, p38 and cell cycle entry. *Hepatology* 2002; 36:94-102.
14. Fernández V., Tapia G., Videla A. Recent advances in liver preconditioning: Thyroid hormone, n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and iron. *World journal of hepatology* 2012; 4: 119-128.
15. Galatro A., Puntarulo S., Mitochondrial ferritin in animal and plants. *Frontiers in Bioscience* 2007; 12: 1063-1071.
16. Metzler B., Jehle J., Theurl I., Ludwiczek S., Obrist P., Pachinger O. Short termprotective effects of iron in a murine model if ischemia/reperfusion. *Biometals* 2007; 20: 205–15.
17. Morales, P, Vargas, R, Videla, L.A. Fernández V. Nrf2 activation in the liver of rats subjected to a preconditioning sub-chronic iron protocol. *Food & Function* 2013; en prensa.
18. Villanueva C., Giulivi C. Subcellular and cellular locations of nitric-oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 307-316.
19. McNaughton L., Puttagunta L., Martinez-Cuesta M.A., Kneteman N., Mayers I., Moqbel R., Hamid Q., Radomski M.W., Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 17161-17166.
20. Moncada S., Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med* 1999; 92: 164-169.
21. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–95.
22. Borutaite V., Brown G.C., S-nitrosothiol inhibition of mitochondrial complex I causes a reversible increase in mitochondrial hydrogen peroxide production. *Biochim Biophys Acta* 2006; 17575-6: 562-566.
23. Hendgen-Cotta U.B, Merx M.W., Shiva S., Schmitz J., Becher S., Klare J.P., Steinhoff H.J., Goedecke A., Schrader J., Gladwin M.T., Kelm M., Rassaf T. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 10529: 10256-10261.
24. Obata T., Yamanaka Y. Block of cardiac ATP-sensitive K(+) channels reduces hydroxyl radicals in the rat myocardium. *Arch Biochem Biophys*. 2000; 3782: 195–200.
25. Vlasova II., Tyurin VA., Kapralov AA., Kurnikov IV., Osipov AN., Potapovich MV., Stoyanovsky DA., Kagan VE. Nitric oxide inhibits peroxidase activity of cytochrome c-cardiolipin complex and blocks cardiolipin oxidation. *J Biol Chem*. 2006; 28121: 14554-14562.

- 26.** Fernandez V, Tapia G, Varela P, Videla LA.: Redox regulation of thyroid hormone-induced Kupffer cell-dependent I κ B- α phosphorylation in relation to inducible nitric oxide synthase expression. *Free Rad Res* 2005; 39(4): 411-418.
- 27.** Fernández V., Castillo I., Tapia G., Romanque P., Uribe-Echeverría S., Uribe M., Cartier-Ugarte D., Santander G., Vial M.T., Videla L. Thyroid hormone preconditioning: Protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat. *Hepatology* 2007; 45: 170-177.
- 28.** Fernández V., Tapia G., Varela P., Cornejo P., Videla L. Upregulation of liver inducible nitric oxide synthase following thyroid hormone preconditioning: suppression by N-acetylcysteine. *Biol Res* 2009; 42: 487-495.
- 29.** Fernández V., Vargas R., Castillo V., Cádiz N., Bastías D., Román S., Tapia G., Videla L.A. Reestablishment of Ischemia-Reperfusion Liver Injury by N-Acetylcysteine Administration prior to a Preconditioning Iron Protocol. *Scientific World Journal* 2013; 607285.