



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



ACTIVACIÓN DE HSF-1 Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA
DE SHOCK TÉRMICO HSP-70 EN LA ISQUEMIA-
REPERFUSIÓN HEPÁTICA, LUEGO DE UN
PREACONDICIONAMIENTO POR L-3,3',5-
TRIYODOTIRONINA

RICARDO JIMÉNEZ VÁSQUEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUÍA: Prof. Dra. VIRGINIA FERNÁNDEZ ARANCIBIA.

SANTIAGO, CHILE
2008



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



ACTIVACIÓN DE HSF-1 Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA
DE SHOCK TÉRMICO HSP-70 EN LA ISQUEMIA-
REPERFUSIÓN HEPÁTICA, LUEGO DE UN
PREACONDICIONAMIENTO POR L-3,3',5-
TRIYODOTIRONINA

RICARDO JIMÉNEZ VÁSQUEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: VIRGINIA FERNÁNDEZ A.
PROFESOR CONSEJERO: EDUARDO KESSI C.
PROFESOR CONSEJERO: ANA M. RAMIREZ K

SANTIAGO, CHILE
2008

ABREVIATURAS

O ₂	: Oxígeno.
AIF	: Factor inductor de apoptosis.
Apaf-1	: Factor apoptótico de activación de caspasas.
AP-1	: Proteína activadora 1.
ATP	: Adenosina trifosfato.
Bcl 2	: B-cell lymphoma 2.
DNA	: Acido desoxirribonucleico.
EMSA	: Prueba de retardo de movilidad electroforética.
eNOS	: Óxido nítrico sintasa endotelial.
ERK-1	: Quinasas de proteínas de respuesta extracelular.
GdCl ₃	: Cloruro de Gadolinio.
GOT	: Transaminasa glutámico/oxalacético.
GPT	: Transaminasa glutámico/pirúvico.
GSH	: Glutación reducido.
H ₂ O ₂	: Peróxido de hidrógeno.
HSE	: Elementos de shock térmico.
HSF-1	: Factor de shock térmico 1.
HO ₂ •	: Radical perhidroxilo.
Hsp-70	: Proteína de shock térmico 70.
ICAM-1	: Molécula de adhesión intercelular 1.
I-kB	: Inhibidor kappa-B.
IL	: Interleuquina.
INF-γ	: Interferón gamma.
iNOS	: Óxido nítrico sintasa inducible.
I/R	: Isquemia- Reperusión.
JNK	: Quinasa N-terminal de c-Jun.
kDa	: Kilodalton.
LDH	: Lactato deshidrogenasa.
MCP-1	: Methyl-accepting chemotaxis proteins.
MnSOD	: Superóxido dismutasa dependiente de Manganeseo.

NADPH	: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.
NF-kB	: Factor nuclear kappa-B.
•NO	: Óxido nítrico.
NOO•	: Dióxido de Nitrógeno.
NOS	: Óxido nítrico sintasa.
nNOS	: Óxido nítrico sintasa nerviosa.
O ₂ • ⁻	: Anión superóxido
OH•	: Radical hidroxilo.
OH-1	: Hemo oxigenasa 1.
ONOO-	: Peroxinitrito
PHT	: Preacondicionamiento por hormona tiroidea.
PMN	: Polimorfonucleares neutrófilos.
ROS	: Especies reactivas de Oxígeno.
RNS	: Especies reactivas de Nitrógeno.
STAT-3	: Transductores de señales y activadores de transcripción 3.
T ₃	: L-3,3',5- Triyodotironina.
TNF-α	: Factor de necrosis tumoral alfa.
XD	: Xantina deshidrogenada.
XO	: Xantina oxidasa.

INDICE

Página

RESUMEN.	8
SUMMARY.	11
1 INTRODUCCIÓN.	13
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	15
2.1 Fenómeno de Isquemia/Reperusión y daño asociado.	15
2.1.1 Fase temprana del daño por isquemia/reperusión.	17
2.1.2 Fase tardía del daño por isquemia/reperusión.	18
2.1.3 Especies reactivas del oxígeno en el daño por isquemia/reperusión.	19
2.1.4 Especies reactivas del nitrógeno en el daño por isquemia/reperusión.	21
2.1.5 Rol de las células de Küpffer en la isquemia/reperusión.	23
2.1.6 Participación del sistema del complemento en la isquemia/reperusión.	24
2.2 Concepto de estrés oxidativo.	25
2.3 Aspectos generales del preacondicionamiento.	26
2.3.1 Preacondicionamiento hepático por estrés oxidativo moderado.	27
2.3.2 Preacondicionamiento hepático por estrés térmico.	28
2.3.3 Proteínas de shock térmico.	30
2.3.4 Hsp-70: una potente proteína antiapoptótica.	32
3 HIPOTESIS.	33
4 OBJETIVOS.	34
4.1 Objetivo general.	34
4.1 Objetivos específicos.	34
5 MATERIALES Y METODOS.	35
5.1 Animales de experimentación.	35
5.2 Preacondicionamiento.	35
5.3 Protocolo quirúrgico.	36
5.4 Parámetros de daño hepático.	38
5.4.1 Determinación de GOT, GPT Y LDH séricas.	38

5.4.2	<i>Evaluación de histología hepática.</i>	38
5.5	Parámetros de estrés oxidativo hepático.	38
5.5.1	<i>Evaluación del contenido total de equivalentes de GSH.</i>	38
5.5.2	<i>Evaluación del contenido de proteínas oxidadas.</i>	39
5.6	Evaluación de la actividad de HSF-1.	40
5.6.1	<i>Preparación de extractos de proteínas nucleares y citosólicas.</i>	40
5.6.2	<i>Evaluación de la actividad de unión a DNA de HSF-1.</i>	41
5.6.3	<i>Evaluación de la expresión de Hsp-70.</i>	41
5.7	Expresión de resultados y análisis estadístico.	42
6	RESULTADOS.	44
6.1	Actividad de transaminasas y LDH.	44
6.2	Histología hepática.	46
6.3	Parámetros de estrés oxidativo hepático.	47
6.4	Evaluación de la actividad de HSF-1.	49
6.5	Evaluación de la expresión de Hsp-70.	51
7	DISCUSIÓN.	52
8	CONCLUSIONES.	57
9	BIBLIOGRAFÍA.	58

Dedico este trabajo a mi hermano Claudio, por nunca darse por vencido por muy malas que fueran las noticias y siempre tener una actitud positiva ante la vida y a mi abuelo Elías por vibrar con mis logros y la profesión que escogí. El cáncer no permitió que disfrutaran en persona este momento junto a mí, pero siempre están en mis pensamientos.

RESUMEN

La exposición de un órgano a situaciones de citotoxicidad moderada o transitoria le otorga protección frente a una nueva exposición citotóxica, lo que ha permitido el desarrollo del precondicionamiento, proceso biológico que atenúa o elimina el daño inducido en dicho órgano por una acción citotóxica agresiva posterior.

En el hígado existen situaciones clínicas, en particular la cirugía hepática bajo exclusión vascular, que involucran la Isquemia/Reperfusión (I/R), fenómeno que gatilla mecanismos que llevan a la injuria hepática, entre ellos el estrés oxidativo. Si bien niveles altos de especies pro-oxidantes derivadas del oxígeno (ROS) o del nitrógeno son deletéreas y generan daño celular, concentraciones moderadas y transitorias de ROS desempeñan un importante papel citoprotector al gatillar vías de señalización intracelular, mediadas por factores de transcripción redox-sensibles que regulan la expresión de proteínas citoprotectoras, permitiendo así reestablecer la homeostasis redox.

En consecuencia, condiciones que generen en el hígado un bajo nivel de ROS (estrés oxidativo moderado) pueden gatillar procesos clave en la hepatoprotección contra el daño derivado de la I/R.

Al respecto, la hormona tiroidea (L-3,3',5-triyodotironina, T₃) gatilla estrés oxidativo hepático moderado y transitorio, al ser aplicada en protocolos moderados, condición que puede precondicionar al hígado frente a la I/R, mediante la activación de HSF-1, factor de transcripción redox-sensible que regula la expresión de Hsp-70, proteína citoprotectora.

Esta propuesta evaluó el precondicionamiento hepático, otorgado por la administración de T_3 (PHT), en el daño inducido por la I/R. El estudio consideró evaluar la vía de señales regulada por HSF-1 y la expresión de Hsp-70, como mecanismo hepatoprotector, utilizando ratas Sprague- Dawley tratadas con una dosis única de T_3 (0.1 mg/Kg. de peso, i.p.) o volúmenes equivalentes de su vehículo (NaOH 0.1 N), y luego sometidas (48 hrs. post- T_3 o NaOH) a I/R o a cirugía simulada (Sham). La I/R consistió en 60 minutos de isquemia (oclusión de la tríada hepática), seguido de 20 horas de reperusión.

En todos los grupos se evaluó **(a)** índices de daño hepático, (histología y niveles séricos de LDH y transaminasas GOT y GPT), **(b)** parámetros de estrés oxidativo hepático [contenidos totales de equivalentes de glutatión reducido (GSH) y proteínas oxidadas], **(c)** unión a DNA (actividad) de HSF-1 y **(d)** expresión de Hsp-70.

La I/R no precedida de PHT (NaOH/IR), gatilló incrementos significativos en las actividades séricas de GOT, GPT y LDH, en concomitancia con marcadas alteraciones de la histología hepática (distorsión de la arquitectura, presencia de necrosis e infiltración de neutrófilos) e inducción de estrés oxidativo hepático (aumento del contenido de proteínas oxidadas y disminución del contenido total de GSH). Respecto a este grupo, la injuria hepatocelular gatillada por la I/R, disminuyó en los animales precondicionados con T_3 , con normalizaciones de la histología hepática, actividades séricas de LDH y transaminasas y del estado redox hepático, señalando así el papel precondicionante de T_3 frente a la injuria hepática inducida por la I/R.

La I/R incrementó significativamente la actividad de HSF-1 y la expresión de Hsp70. Sin embargo, no se observó diferencias significativas entre estos 2 grupos experimentales, por lo cual se concluye que la vía de señalización celular regulada por HSF-1 no participa en la protección hepática conferida por el PHT.

SUMMARY

Pre-exposure of an organ to transient and moderate cytotoxic conditions, increases the tolerance to a new cytotoxic exposure, a phenomenon known as preconditioning which affords cell protection by helping the cells stave off the commitment to death triggered by the new cytotoxic exposure.

In the liver, clinical events associated to surgical manipulations (temporary clamping of the hepatoduodenal ligament during liver resection) and transplantation, involve ischemia/reperfusion, a phenomenon known to trigger mechanisms of liver injury, including liver oxidative stress. Although high levels of reactive oxygen (ROS) or nitrogen species are hazardous and damage major cellular constituents, moderate and transient concentrations of ROS play an important cytoprotective role as regulatory mediators in signaling processes, involving redox-sensitive transcription factors, which in turn up-regulate the expression of cytoprotective proteins, and reestablish “redox homeostasis.”

Therefore, conditions leading to low and transient levels of liver oxidative stress may induce protective responses against ischemia/reperfusion injury.

In this respect, mild protocols of thyroid hormone (L-3,3',5'-triiodothyronine, T₃) treatment, lead to temporary moderate oxidative stress in the liver, a condition that may increase the hepatic tolerance to ischemia/reperfusion injury through redox-sensitive transcription factor HSF-1 activation and cytoprotective Hsp-70 subsequent expression.

The aim of this study was to assess liver preconditioning by T₃ (PHT) in the ischemia/reperfusion injury. Male Sprague–Dawley, rats given a single dose of T₃ (0.1mg /kg) or equivalent volumes of T₃ vehicle (0.1N NaOH), 48 hours prior to 1 h ischemia followed by 20 h reperfusion, were used to assess HSF-1 signaling pathway and Hsp-70 expression.

Studies included evaluations of **(a)** liver damage (histology and serum levels of LDH, GOT and GPT), **(b)** liver oxidative stress parameters [total contents of liver reduced glutathione (GSH) equivalents and oxidized proteins], **(c)** HSF-1 DNA binding activity and **(d)** Hsp-70 expression.

Serum GOT, GPT and LDH activities were significantly enhanced by ischemia/reperfusion in the absence of PHT (NaOH/IR), in concomitance with substantial distortion of liver architecture, extensive areas of hepatocyte necrosis and neutrophil infiltration and induction of liver oxidative stress (increased oxidized proteins content and decreased total GSH content). In relation to these animals, ischemia/reperfusion injury was diminished by T₃ preconditioning, with normalizations of liver histology, serum GOT, GPT and LDH activities and liver redox state, thus pointing T₃ administration as a preconditioning strategie in liver ischemia/reperfusion.

HSF-1 DNA binding activity and Hsp70 expression were significantly enhanced by ischemia/reperfusion (NaOH/IR and T₃/IR), in relation to controls. However, no significant differences were found in these experimental groups, thus indicating that HSF-1 signaling pathway seems to play no significant role in liver preconditioning by T₃.

1. INTRODUCCIÓN.

La isquemia/reperfusión (I/R) es la causa principal del daño hepático inducido por la oclusión temporal del ligamento hepato-duodenal durante maniobras de resección hepática, como también en complicaciones inherentes a trasplantes fallidos (Carini *et al.*, 2003).

Estudios iniciales, realizados en corazón de perro sometido a períodos breves de I/R, seguido de un período isquémico mayor, permitieron describir una protección o “preacondicionamiento” en este tejido, ya que éste mostraba áreas infartadas significativamente menores que aquellas obtenidas en animales no preacondicionados. A partir de estos hallazgos se planteó que la I/R moderada ejerce un rol protector frente a la isquemia prolongada (Murry *et al.*, 1986).

Estudios posteriores realizados en hígado de animales de experimentación, han señalado que la exposición previa de este tejido a situaciones de toxicidad moderada, tales como isquemia, hipertermia o estrés oxidativo moderado, aumentan la tolerancia hepática al daño gatillado por la I/R, lo que corresponde a un preacondicionamiento hepático (Carini *et al.*, 2003).

Se define al preacondicionamiento hepático como un incremento de la resistencia tisular, debido al desencadenamiento de procesos citoprotectores gatillados por un estrés sub-deletéreo representado, entre otros, por una preexposición a uno o más períodos cortos de hipoxia seguidos de reoxigenación, como ocurre en una I/R moderada (Murry *et al.*, 1986; Selzner *et al.*, 2003).

El siguiente trabajo tiene por objetivo demostrar que la administración de L-3,3',5'-Triyodotironina produce un estado de estrés oxidativo moderado que gatilla una respuesta hepatoprotectora, representada por la reprogramación génica frente al daño que se produce en la condición de isquemia/reperfusión.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Fenómeno de isquemia/reperfusión y daño asociado.

La isquemia de un tejido corresponde a la carencia o disminución temporal del flujo sanguíneo y por consiguiente del aporte de oxígeno (O₂) y nutrientes a éste, que produce un daño tisular por sí misma, el cual se expresa en cambios metabólicos y ultraestructurales (Collard *et al.*, 1999) que se resumen en la tabla N° 1. La isquemia se asocia además con el daño provocado por el reestablecimiento del flujo sanguíneo durante la reperfusión, por lo que el fenómeno de I/R es un incremento del daño celular en un órgano isquémico después del reestablecimiento del flujo de sangre y O₂ (Romanque *et al.*, 2005).

Efectos celulares de la isquemia.
Alteración del potencial de membrana. Alteración de la distribución de iones intracelulares (↑Ca ⁺⁺ y Na ⁺ intracelular). Aumento del volumen celular. Desorganización del citoesqueleto. Acumulación de hipoxantina. Disminución de ATP, fosfocreatina y glutatión. Acidosis celular.

Tabla N° 1: Efectos celulares de la isquemia.

En el caso del hígado se describen tres tipos de isquemia: **(i) isquemia caliente**, que ocurre cuando se interrumpe el flujo sanguíneo pero la temperatura del órgano y la corporal se mantienen al mismo nivel; **(ii) isquemia fría**, que se manifiesta en la procuración de órganos que serán transplantados a receptores, en cuyo caso dichos órganos se mantienen a una temperatura de 4°C con la finalidad de disminuir su actividad metabólica e **(iii) isquemia tibia** que ocurre durante el período de implantación del hígado

frío en el receptor, mientras se realiza la reconstrucción vascular (Lemasters y Thurman, 1995).

Dentro de los cambios funcionales que se producen en el hígado sometido a isquemia prolongada se incluyen: **(i)** la disminución de la fosforilación oxidativa y de la actividad de las bombas de membrana dependientes de ATP, con la consiguiente entrada de agua, calcio y sodio al interior de la célula; **(ii)** el catabolismo del ATP que lleva a la acumulación de hipoxantina, con generación de especies reactivas derivadas del O₂ (ROS) gatillada por el re-ingreso de O₂; **(iii)** la promoción de la expresión de productos génicos proinflamatorios (citoquinas, moléculas de adhesión de leucocitos) y agentes bioactivos (endotelina, tromboxano A₂) a nivel endotelial y **(iv)** la represión de los productos de algunos genes protectores [óxido nítrico sintasa (NOS) constitutiva, trombomodulina] y agentes bioactivos [prostaciclina, óxido nítrico (\cdot NO)]. De esta manera, se genera un estado proinflamatorio que aumenta la vulnerabilidad del hígado cuando éste es sometido a la reperfusión (Romanque *et al.*, 2005).

Se describen dos fases en el daño secundario a I/R, una fase temprana que comprende desde el inicio de la reperfusión hasta la tercera a cuarta hora y una fase tardía desde la sexta hora de reperfusión hasta las 24 horas posteriores (Jaeschke *et al.*, 1990, Romanque *et al.*, 2005).

La fase inicial está asociada principalmente a la activación de las células de Küpffer, mientras que la fase tardía es dependiente de la llegada, infiltración y activación de linfocitos y polimorfonucleares (neutrófilos u otros PMN) (Jaeschke *et al.*, 1990; Cutrín *et al.*, 2002).

2.1.1. Fase temprana del daño por isquemia/reperfusión.

Durante la fase temprana de la reperfusión, la I/R gatilla **(i)** la activación de las células de Kupffer, con generación de ROS y especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS); **(ii)** la activación de factores del complemento y **(iii)** el reclutamiento y activación de linfocitos residentes (Collard *et al.*, 1999) (Figura N° 1).

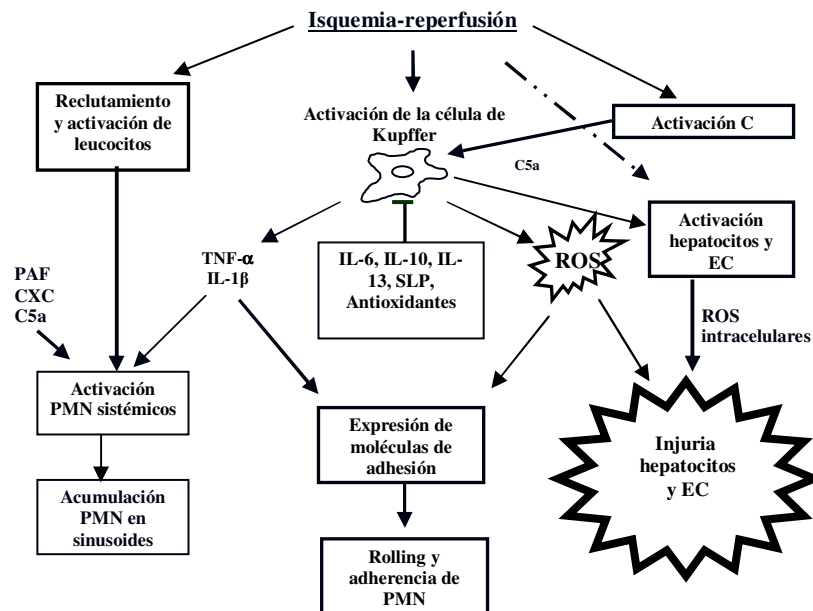


Figura N° 1: Fase temprana del daño por isquemia-reperfusión, extraída de Romanque *et al.*, 2005.

2.1.2. Fase tardía del daño por isquemia/reperfusión.

Las citoquinas proinflamatorias, principalmente IL-6, TNF- α e IL-1- β , quimioquinas y factores del complemento, liberados durante la reperfusión temprana, son los responsables del reclutamiento de PMN. Una vez que los neutrófilos han llegado al sitio del daño, perpetúan y amplifican el daño por la liberación adicional de mediadores, como ROS, TNF- α y proteasas (Romanque *et al.*, 2005) (Figura N° 2).

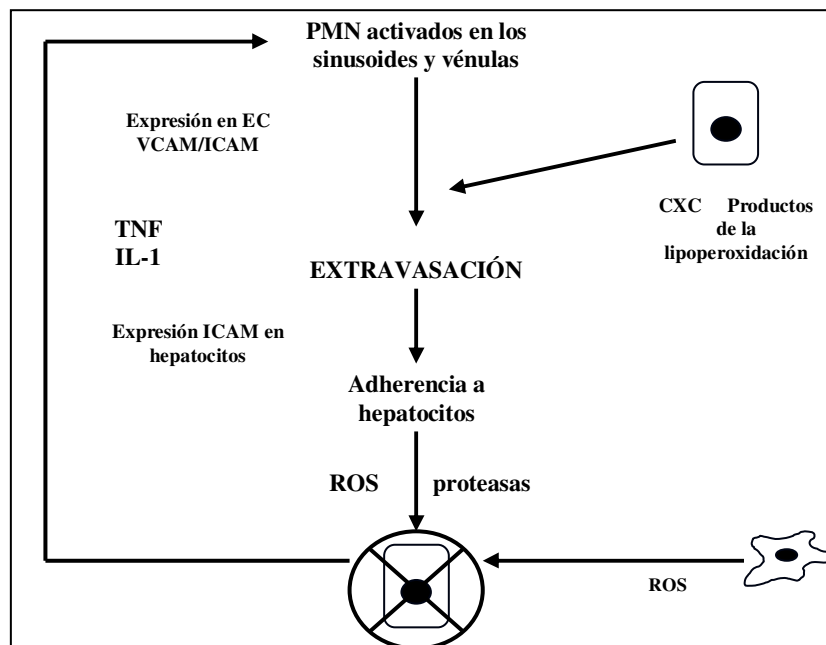


Figura N° 2: Fase tardía del daño por isquemia-reperfusión, extraída de Romanque *et al.*, 2005.

Si el daño endotelial es severo la migración transendotelial de los neutrófilos ocurre fácilmente, pero a menudo el daño endotelial no es de tal magnitud y se requiere la participación de moléculas de adhesión, como ICAM-1, cuya expresión en hepatocitos aumenta en respuesta a TNF- α , IL-1 e INF- γ (Lichtman y Lemasters, 1999).

2.1.3. Especies reactivas derivadas del oxígeno en el daño por isquemia/ reperfusión.

En el proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial, alrededor del 2-3% del O₂ consumido no es totalmente reducido a agua por la citocromo oxidasa, sufriendo una reducción univalente que genera sucesivamente anión superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radical hidroxilo (•OH).

Estas ROS también pueden ser generadas por el sistema del citocromo P450 microsomal y además por diversas reacciones oxidativas citosólicas, peroxisomales o procesos a nivel de membrana, como el que cataliza la NADPH oxidasa de fagocitos.

Se ha descrito que la generación de ROS aumenta en la inflamación, la hiperoxia y la aplicación de radiaciones UV y ionizantes, entre otros procesos, como también es importante destacar la participación de algunos metales, como hierro y cobre, que catalizan la generación de •OH (Videla, 2000; Romanque *et al.*, 2005).

La influencia de las ROS en la lesión hepática por I/R ha quedado demostrada en estudios que muestran disminución del daño al utilizar atrapadores de estas especies (Atalla *et al.*, 1985). Más aún, la disminución del daño hepático posterior a la I/R, en presencia de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, permiten establecer una relación entre la generación de ROS y el daño generado en ambas fases de la I/R (Nauta *et al.*, 1990; Marubayashi *et al.*, 1986; Nordström *et al.*, 1985; Younes *et al.*, 1988).

Entre las potenciales fuentes generadoras de ROS en el hígado sometido a I/R, uno de los primeros en ser estudiado fue el sistema de la xantina deshidrogenasa/xantina oxidasa (Nordström *et al.*, 1985). Por acción de proteasas dependientes de Ca^{+2} , la xantina deshidrogenasa es convertida a xantina oxidasa, enzima que en presencia del O_2 que ingresa durante la reperfusión, oxida a la hipoxantina hasta ácido úrico, generando O_2^- y H_2O_2 (Mc Cord, 1985; Mc Cord, 1987).

Por otro lado, la participación del Ca^{+2} en la patogenia del daño inducido por I/R, ha sido evidenciada por estudios que muestran disminución de la lesión en presencia de bloqueadores de canales de Ca^{+2} (Nauta *et al.*, 1991).

Otra fuente generadora de ROS en la I/R es la actividad NADPH oxidasa presente en las células de Küpffer y fagocitos hepáticos, habiéndose observado que su inhibición bloquea la generación de ROS y el daño hepático por I/R (Jaeschke *et al.*, 1990).

2.1.4. Especies reactivas derivadas del nitrógeno en el daño por isquemia/reperfusión.

Respecto a las RNS, el •NO se forma a partir de la L-Arginina por la acción de la •NO sintasa (NOS), enzima presente en tres isoformas, una inducible, la iNOS o NOS2, que es calcio dependiente y que se expresa principalmente en condiciones patológicas y dos isoformas constitutivas, la eNOS o NOS3, que se expresa principalmente en endotelio y participa en la regulación del flujo sanguíneo, presión arterial y agregación plaquetaria y la nNOS o NOS1, que se expresa en sistema nervioso donde •NO participa como neuromodulador (Knowles *et al.*, 1994; Romanque *et al.*, 2005).

En la I/R, la producción inicial de •NO deriva de la acción de la eNOS, sin embargo, alrededor de la cuarta a sexta hora de reperfusión, la generación de •NO deriva principalmente de la acción de la iNOS, que se expresa posterior a la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB) tanto en hepatocitos como en células de Küpffer (Serracino-Inglott *et al.*, 2000).

La iNOS, identificada en macrófagos, células epiteliales, hepatocitos, células estrelladas y colangiocitos, genera la mayor cantidad de •NO respecto a eNOS y manifiesta su actividad hasta que la proteína es degradada. En condiciones normales, la actividad iNOS hepática está prácticamente ausente, siendo gatillada en respuesta a inflamación y estrés oxidativo (Inoue *et al.*, 2000), lo que sumado a la ausencia de una regulación fina de su actividad y a la gran cantidad de •NO que esta enzima genera, sugiere que este exceso de •NO puede llevar a daño hepático (Clemens, 1999).

En la I/R el $\bullet\text{NO}$ endógeno y/o exógeno, protege a los hepatocitos y células endoteliales del daño por I/R, efecto que parece estar mediado por la vasodilatación inducida y represión de la expresión de moléculas de adhesión y Selectina-E a nivel endotelial (Cottart *et al.*, 1999; Romanque *et al.*, 2005).

Resulta interesante analizar la reacción que se produce entre los radicales libres $\text{O}_2\bullet^-$ y $\bullet\text{NO}$, ya que de ella pueden resultar efectos deletéreos, derivados tanto del consumo del $\bullet\text{NO}$, agente vasodilatador, como del producto de esta reacción que es el peroxinitrito (ONOO^-), que corresponde a otra RNS altamente pro-oxidante, ya que se inestabiliza después de ser protonado descomponiéndose en forma espontánea para formar el radical $\bullet\text{OH}$ y el dióxido de nitrógeno ($\text{NOO}\bullet$).

En conclusión, dependiendo del estado redox celular, el $\bullet\text{NO}$ puede actuar como hepatoprotector en presencia de un estrés oxidativo moderado y transiente o como inductor de daño en altas concentraciones como se da en los casos de estrés oxidativo severo y/o prolongado (Cutrín *et al.*, 2002; Tsukamoto, 2002).

2.1.5. Rol de las células de Küpffer en la isquemia/reperfusión.

Durante la fase inicial de la reperfusión las células de Küpffer se activan (Lemasters *et al.*, 1981) exhibiendo cambios morfológicos como aumento de volumen, protrusión a los sinusoides y citoplasma vacuolado. Esto contribuye a estrechar el lumen del espacio sinusoidal y con esto al fenómeno de no-reflujo (Pretto, 1991). El fenómeno de no-reflujo se debe a cambios en la microcirculación hepática lo cual impide que el flujo vascular a un órgano isquémico se reestablezca completamente después de liberar la oclusión vascular (Collard *et al.*, 1999).

La activación de las células de Küpffer conlleva a la generación de ROS y RNS, como también a la de TNF- α , IL-6, IL-1 y prostaglandinas, mediadores inflamatorios, junto con la de IL-10 e IL-13, mediadores antiinflamatorios (Jaeschke *et al.*, 1990; Romanque *et al.*, 2005). De hecho, la eliminación selectiva de estos macrófagos con cloruro de gadolinio (GdCl₃), disminuye la liberación de quemoquinas, la lipoperoxidación y atenúa el daño tisular (Mosher *et al.*, 2001; Giakoustidis *et al.*, 2003).

2.1.6. Participación del sistema del complemento en la isquemia/reperfusión.

La I/R provoca la activación del sistema del complemento siendo particularmente importantes las anafilotoxinas, C3a y C5a; y los componentes del complemento, iC3b y C5b-9 (Romanque *et al.*, 2005).

C5a, considerado uno de los mediadores más potentes de la inflamación, se une al receptor C5aR en polimorfonucleares, monocitos y macrófagos y aumenta la adhesividad de los neutrófilos, provocando su agregación y estimulando la producción de ROS (Arumugam *et al.*, 2004).

iC3b, derivado de la fragmentación de C3, es un ligando específico para la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular vía Integrina β_2 , CD11b-CD18 (Mac-1) (Collard *et al.*, 1999; Romanque *et al.*, 2005). C5b e iC3b también pueden alterar la homeostasis vascular.

Además de estimular los leucocitos y la quimiotaxis, el complemento amplifica la respuesta inflamatoria al inducir la producción de MCP-1 (methyl-accepting chemotaxis proteins), TNF- α , IL-6 e IL-1 (Collard *et al.*, 1999; Romanque *et al.*, 2005).

Así, la activación del sistema del complemento contribuiría a amplificar el daño por I/R de manera directa, por formación del complejo de ataque de membrana, e indirectamente, estimulando la producción de citoquinas proinflamatorias y la migración y adhesión de leucocitos (Romanque *et al.*, 2005).

Considerando los antecedentes anteriormente descritos se puede concluir que en la hepatotoxicidad gatillada por la I/R concurren diversos mecanismos, algunos de los cuales incrementan el estado de estrés oxidativo celular, concepto que es discutido a continuación.

2.2. Concepto de estrés oxidativo.

Bajo condiciones normales, la velocidad de formación de ROS y RNS, en estado estacionario, está en equilibrio, dado por una velocidad similar del consumo de estas especies por los mecanismos antioxidantes celulares, estrategias de defensa desarrolladas por las células y que constituyen prerequisites para la mantención de la viabilidad celular (Videla, 2000).

El desbalance del estado normóxico celular, a favor de las especies pro-oxidantes, constituye el fenómeno de estrés oxidativo, concepto introducido por Helmut Sies en 1985, que implica un nivel elevado de especies reactivas que puede conducir al deterioro oxidativo de biomoléculas esenciales y a la pérdida de su función biológica. Si esta condición sobrepasa los mecanismos de reparación y re-síntesis de moléculas alteradas, se alcanza un nivel crítico que puede desencadenar mecanismos moleculares que determinan **un punto de no retorno** con inducción de la muerte celular por incapacidad de compensar adecuadamente las alteraciones inducidas (Videla, 2000).

En la actualidad el estrés oxidativo ha sido involucrado en numerosos fenómenos fisiológicos y fisiopatológicos, entre ellos algunas enfermedades inmunológicas, disfunciones hormonales, alteraciones cardiovasculares y el daño por I/R (Videla, 2000).

Sin embargo, estudios más recientes han establecido que concentraciones moderadas de ROS y RNS son importantes mediadores de la regulación de vías de señalización intracelular. De hecho, muchas de las respuestas mediadas por ROS y RNS manifiestan efectos protectores frente al estrés oxidativo, permitiendo reestablecer la “homeostasis redox” mediante la **reprogramación de la expresión génica** de las células sobrevivientes, con remodelación o regeneración celular (Videla, 2000, Dröge, 2002).

Los efectos citoprotectores del estrés oxidativo moderado derivan de **(a)** la activación de factores de transcripción redox-sensibles, como NF- κ B y AP-1, entre otros, con la consiguiente estimulación de la expresión génica de proteínas relacionadas con la citoprotección y **(b)** la modificación oxidativa de grupos sulfhidrilos claves de algunas proteínas con el consiguiente cambio en su función (Dröge, 2002).

2.3. Aspectos generales del preconditionamiento.

Se puede definir al preconditionamiento como un proceso biológico endógeno que aumenta la resistencia de un órgano o tejido a un estímulo citotóxico posterior. Este proceso biológico es gatillado luego de exponer al órgano o tejido a una situación citotóxica que le otorga protección frente a una nueva exposición citotóxica más agresiva (Selzner *et al.*, 2003). Esta estrategia de citoprotección fue descrita por Murry (Murry *et al.*, 1986), al determinar que breves períodos de isquemia, seguidos de una reperusión inmediata y breve, confieren protección a corazones posteriormente sometidos a un período isquémico mayor.

Estudios posteriores, demostraron que el fenómeno anteriormente descrito, no era exclusivo del miocardio, sino que podía presentarse en una variedad de otros tejidos, como cerebro, músculo e hígado (Hardy *et al.*, 1996; Yellon y Dana, 2000).

Entre los mecanismos que darían cuenta de este fenómeno, se ha propuesto la participación de mediadores, como la adenosina, el $\bullet\text{NO}$ y el estrés oxidativo moderado, los cuales pueden activar proteínas quinasas, factores de transcripción y la expresión de proteínas citoprotectoras, entre ellas proteínas de shock térmico y $\text{TNF-}\alpha$ (Selzner *et al.*, 2003).

Estos hallazgos han llevado al desarrollo de diversas estrategias de preconditionamiento (Teoh *et al.*, 2002; Carini *et al.*, 2003), que incluyen, entre otros, **(i)** la I/R (Peralta *et al.*, 1997), **(ii)** la hipertermia (Terajima *et al.*, 2000), **(iii)** la hipotermia (Kato *et al.*, 2002), **(iv)** la administración de $\text{TNF-}\alpha$ (Teoh *et al.*, 2003), dadores de $\bullet\text{NO}$ (Carini *et al.*, 2003a) e inhibidores de receptores de quimioquinas (Bertini *et al.*, 2004) y **(v)** el estrés oxidativo moderado (Das y Maulik, 2003; Rudiger *et al.*, 2003).

2.3.1. Preacondicionamiento hepático por estrés oxidativo moderado. Hepatoprotección otorgada por L-3,3',5-triyodotironina.

La administración de L-3,3',5-triyodotironina (T_3) a ratas, gatilla estrés oxidativo hepático moderado, el cual se manifiesta en paralelo con la respuesta hipertérmica e incremento del consumo de oxígeno hepático (Videla, 2000).

Por otro lado, se ha descrito que ratas tratadas con tetrayodotironina (T_4) muestran una mayor tolerancia a la I/R cardíaca, que se relaciona además

con la mayor expresión génica de Hsp-70 como mecanismo citoprotector (Pantos *et al.*, 2001).

Estudios iniciales, realizados en el laboratorio, han señalado que el estrés oxidativo asociado a la calorigénesis hipertiroidea, luego de la administración de L-3,3',5-Triyodotironina (T_3), aumenta la expresión hepática de mediadores que promueven la citoprotección, respuesta que ocurriría por un mecanismo dependiente de la actividad de las células de Küpffer y del estado redox, vía activación del NF- κ B (Tapia *et al.*, 2003, Fernández *et al.*, 2005a; Fernández *et al.*, 2005b).

Recientemente el grupo de trabajo del laboratorio describió que la administración de una dosis única de T_3 , no sólo involucra el establecimiento de un estrés oxidativo hepático transiente, sino que además otorga una significativa hepatoprotección frente al daño inducido por la I/R, lo que constituye una novedosa maniobra preconditionante (PHT). Estudios del laboratorio indican que el PHT está asociado a la activación de los factores de transcripción NF- κ B y STAT3 así como también al incremento en la expresión de Haptoglobina, proteína hepática de respuesta aguda (Fernández *et al.*, 2007).

2.3.2. Preacondicionamiento hepático por estrés térmico. Participación del factor de transcripción HSF-1 en el preconditionamiento hepático por T_3 .

La inducción de hipertermia en ratas confiere preconditionamiento hepático, tanto frente a la administración de Tetracloruro de carbono como a la I/R, en correlación con aumentos en la expresión de

proteínas de shock térmico Hsp-70 y OH-1/Hsp-32 (Terajima *et al.*, 2000, Yamamoto *et al.*, 2000).

La acción hepatoprotectora de este tipo de preconditionamiento en el daño por I/R se ha asociado a la supresión de la activación de NF- κ B y subsecuente expresión de mediadores proinflamatorios, a través de la estabilización de I κ B, proteínas inhibidoras de NF- κ B (Yonezawa *et al.*, 2001; Uchinami *et al.*, 2002).

Por otro lado, tanto el **estrés térmico** como el **estrés oxidativo** aumentan la generación de ROS (Flanagan *et al.*, 1998) pudiendo gatillar procesos clave en la hepatoprotección contra el daño por I/R o xenobióticos (Carini *et al.*, 2003). Ambas condiciones, anteriormente descritas, conllevan a la activación del factor de transcripción de shock térmico-1 (HSF-1) (Pockley, 2001).

HSF-1, fue primeramente identificado en extractos celulares de *Saccharomyces cerevisiae* y *Drosophila melanogaster* y a la fecha se han identificado tres isoformas de HSF en mamíferos, HSF-1, HSF-2 y HSF-4. HSF-3, el cuarto miembro de la familia HSF, ha sido descrito en pollitos pero no en mamíferos (Christians *et al.*, 2002).

HSF-1 se expresa en células de mamíferos en respuesta a temperaturas elevadas y al estrés oxidativo inducido por la I/R, el etanol y algunos metales pesados (Bernelli-Zazzera *et al.*, 1992). De hecho, la actividad HSF-1 es inducida por tratamientos con agentes oxidantes, como H₂O₂, a través de mecanismos que modifican directamente su estructura proteica, entre otros (Christians *et al.*, 2002).

HSF-1 posee un dominio de unión a proteínas y a “elementos de respuesta para shock térmico” (HSE) en el DNA y además una superficie de trimerización helicoidal con un cierre de leucina con motivos espirales para la formación de trímeros (Kiang, 2004).

En condiciones basales, HSF-1 se encuentra en el citoplasma como un monómero incapaz de unirse al DNA, pero bajo condiciones de estrés es fosforilado por mecanismos dependientes de *ras*, vía las MAP quinasas ERK1, JNK y MAP quinasa p38, con posterior homotrimerización, translocación al núcleo y unión a HSE específicos, que regulan la expresión de genes blanco para HSF-1, que codifican proteínas de shock térmico (Hsp) (Bernelli-Zazzera *et al.*, 1992; Pockley, 2001; Christians *et al.*, 2002).

2.3.3. Proteínas de shock térmico.

Los eventos de estrés celular y muerte celular están asociados y las Hsp, inducidas en respuesta a este estrés, aparecen como una llave regulatoria en los puntos de control de la apoptosis, mecanismo adaptativo que regula la muerte celular sin comprometer la sobrevivencia del organismo (Garrido *et al.*, 2001).

Las Hsp interfieren con vías de señalización que llevan a la activación proteolítica de las caspasas, principales proteínas efectoras de la apoptosis. Dichas vías de señalización son extrínsecas, mediadas por receptores e intrínsecas, mediadas por mitocondrias (Christians *et al.*, 2002).

Las Hsp, son un grupo de proteínas altamente conservadas, cuya expresión es inducida por diferentes tipos de estrés. Subsecuentemente se

describió que muchas Hsp poseen importantes efectos de citoprotección, comportándose como chaperonas moleculares de otras proteínas (Garrido *et al.*, 2001; Christians *et al.*, 2002).

Su localización es estratégica ya que se encuentran tanto en citoplasma, como en mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplásmico, lo que proporciona una red organizada para controlar la calidad del plegamiento proteico en los distintos compartimientos subcelulares (Christians *et al.*, 2002).

Dentro de las funciones atribuidas a las chaperonas moleculares se incluyen: **(i)** importación de proteínas dentro de compartimientos celulares, **(ii)** plegamiento de proteínas de los compartimientos subcelulares que las poseen, **(iii)** degradación de proteínas inestables, **(iv)** disolución de complejos proteicos, **(v)** prevención de la agregación proteica, **(vi)** control de proteínas reguladoras y **(vii)** replegamiento de proteínas mal plegadas (Christians *et al.*, 2002).

Se les clasifica de acuerdo a su peso molecular (kDa) en 4 grandes familias, Hsp-90, Hsp-70, Hsp-60 y α Hsp, que son las de menor tamaño, existiendo proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas que interactúan con una amplia variedad de proteínas celulares (Garrido *et al.*, 2001).

Hsp-60 y Hsp-90 son proteínas constitutivas, pero α Hsp y Hsp-70 son inducidas por el estrés térmico y por el estrés oxidativo, además de algunas drogas anticancerígenas (Christians *et al.*, 2002).

2.3.4. Hsp-70: una potente proteína antiapoptótica.

Los efectos citoprotectores de Hsp-70 están asociados a **(i)** su rol de chaperona, dependiente de ATP, facilitando el replegamiento de proteínas con plegamiento alterado por condiciones de estrés, con la consecuente prevención de su degradación y/o agregación celular, **(ii)** el control de la actividad de proteínas reguladoras, como la estabilización de I κ B, (Pockley, 2001), **(iii)** su capacidad de unión a proteínas de la maquinaria apoptótica, impidiendo la activación de caspasas, río arriba o río abajo de la cascada y **(iv)** su capacidad de unión a actina, aumentando la resistencia del citoesqueleto al estrés oxidativo (Carini *et al.*, 2003).

Incrementos en el contenido de Hsp-70, reducen o bloquean la activación de las caspasas y suprimen el daño mitocondrial y la fragmentación nuclear (Garrido *et al.*, 2001). Específicamente, en la apoptosis inducida por TNF- α , Hsp-70 previene cambios morfológicos característicos de las células en apoptosis (Garrido *et al.*, 2001).

Por otro lado, la sobre-exposición a Hsp-70 protege del daño por isquemia al miocardio (Christians *et al.*, 2002) y aumenta la resistencia del hígado y otros órganos al daño isquémico (Selzner *et al.*, 2003). La inducción de Hsp-70 en células de la mucosa gástrica mediante geranilgeranilacetona, una droga antinuclear ampliamente utilizada en Japón, confiere protección frente a la isquemia hepática (Christians *et al.*, 2002).

En base a los antecedentes entregados y discutidos, esta propuesta estuvo centrada en que el PHT podría estar mediado por incrementos en la unión a DNA de HSF-1, la cual incrementaría la expresión de Hsp-70, proteína citoprotectora frente al daño inducido por la I/R.

3. HIPÓTESIS.

“El preconditionamiento hepático inducido por la administración de T₃ (PHT) es mediado por el aumento de la unión al DNA del factor de transcripción redox sensible HSF-1, el cual incrementa la expresión de la proteína de shock térmico Hsp-70, que promueve la citoprotección frente al daño inducido por la isquemia/reperfusión”.

4. OBJETIVOS.

4.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar cambios en la unión a DNA del factor de transcripción HSF-1 y expresión de la proteína de shock térmico Hsp-70, como mecanismos de preconditionamiento hepático inducidos por la administración de T₃, frente al daño inducido por una isquemia/reperfusión prolongada en el hígado de la rata.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar cambios en la unión al DNA de HSF-1 a través de su capacidad de unión a secuencias específicas de DNA, en ratas sometidas y no sometidas a preconditionamiento por la administración de T₃ (PHT), frente al daño inducido por I/R.
2. Estudiar la expresión de la proteína de shock térmico Hsp-70, en ratas sometidas y no sometidas a PHT, seguido de I/R.
3. Relacionar los cambios anteriores con el grado de protección conferido por el PHT frente a la I/R, midiendo cambios en **(i)** el estado de estrés oxidativo hepático, evaluado por los contenidos hepáticos totales de equivalentes totales de glutatión reducido (GSH) y proteínas oxidadas (grupos carbonilo) y **(ii)** el daño hepático, evaluado a través de actividades séricas de transaminasas (GOT y GPT) y deshidrogenasa láctica (LDH), como también mediante histologías hepáticas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Animales de experimentación.

En este estudio se utilizaron ratas Sprague-Dawley (180-250 grs.), obtenidas del Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, mantenidas con dieta sólida estándar (Alimentos Champion S.A., Santiago), agua *ad libitum*, temperatura ambiental controlada y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, las que conformaron grupos de un mismo sexo para un mismo objetivo.

Se extrajeron muestras de cada individuo, las cuales fueron analizadas individualmente dentro de los grupos establecidos.

El protocolo de tratamiento de los animales utilizados en este estudio, cumplió con las normas del “Comité de Bioética sobre investigación en animales” de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile y fue aprobado por dicho comité (protocolo CBA# 090 FMUCH).

5.2. Preacondicionamiento.

La inducción del PHT contempló la administración de una dosis única de T₃ (0,1 mg/Kg. peso corporal) (grupo tratado) vía intraperitoneal (*i.p.*), en volúmenes de aproximadamente 0,2 ml. El grupo control recibió volúmenes equivalentes del vehículo de la hormona, NaOH 0,1 N.

Se conformaron los siguientes grupos experimentales:

Grupo I: Ratas tratadas con NaOH 0,1N y sometidas a cirugía, sin I/R (control) (9 animales).

Grupo II: Ratas tratadas con NaOH 0,1N y sometidas a cirugía con I/R (9 animales).

Grupo III: Ratas tratadas con T₃ y sometidas a cirugía, sin I/R (control) (9 animales).

Grupo IV: Ratas tratadas con T₃ y sometidas a cirugía con I/R (9 animales).

5.3. Protocolo quirúrgico.

Previo a la cirugía, los animales fueron ayunados (10 a 12 horas), con acceso libre al agua. La cirugía se realizó sobre calentador (Barnstead Internacional, TermoFisher Scientific, USA) para asegurar la homeostasis de los animales y con técnica estéril, de acuerdo a modelos descritos de I/R en la rata (Nauta *et al.*, 1990; Nauta *et al.*, 1991) y adaptados en el “Laboratorio de hepatotoxicidad y estrés oxidativo”, Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Romanque *et al.*, 2005).

Los animales fueron anestesiados vía *i.p.* con Tiletamina/Zolazepam (Zoletil® 50, Lab. Virbac, Brasil) (50 mg/Kg. peso), en volúmenes de aproximadamente 0,2 ml. Se realizó incisión media supra e infraumbilical hasta exponer las vísceras, las cuales se desplazaron con gasa estéril para visualizar la tríada portal.

Utilizando tómulas de algodón estériles para tracción-contracción, se expuso la bifurcación del pedículo hepático que irriga los lóbulos superior medio y laterales izquierdo y derecho, donde se ubicó el clamp atraumático tipo Schwartz (Fine Science Tools, North Vancouver, Canadá) (Figura N° 3).

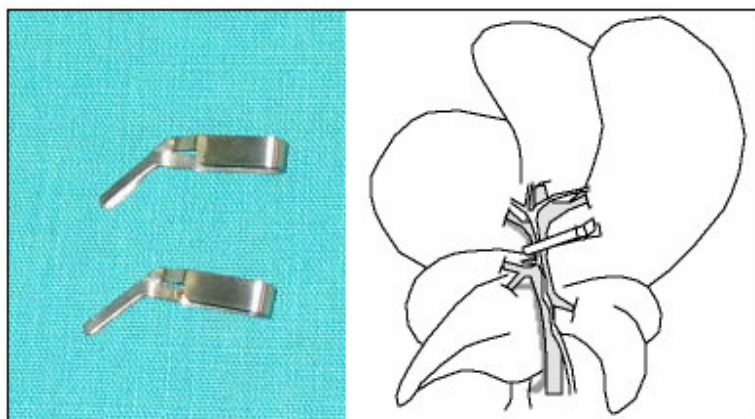


Figura N° 3: Clip de Shwartz y esquema del modelo de isquemia hepática parcial en el hígado de rata.

Al término de la isquemia (1 h) se retiró el clamp y en todos los grupos experimentales se cerró la cavidad abdominal con puntos simples separados con nylon 3-0 y se administró suero fisiológico (1% del peso corporal en ml) en forma subcutánea para reponer la pérdida de fluidos y favorecer la recuperación postoperatoria.

Los animales quedaron en recuperación en jaulas separadas, con acceso libre al agua y alimento, para el inicio de la reperfusión (20 h), al término de la cual los animales fueron anestesiados con Pentotal sódico 50 mg/Kg en volúmenes de 2 ml, intraperitoneal, para obtener muestras de **(a)** sangre (3 ml) por punción cardíaca (Venoject®), de la cual, previa centrifugación (1085 g por 10 minutos) se obtuvo suero, el cual fue almacenado a -20° C en alícuotas de 300 µl y luego utilizado para evaluar actividades séricas de transaminasas (GOT y GPT) y deshidrogenasa láctica (LDH); **(b)** tejido hepático (sólo los lóbulos isquemizados), del cual se separaron y guardaron

muestras, tanto para la evaluación histológica (cortes de lóbulo medio en formalina/PBS, seguido de inclusión en parafina, corte y tinción), como para los ensayos de HSF-1 y Hsp-70 (congelamiento en nitrógeno líquido y almacenamiento a - 80° C); **(c)** tejido hepático perfundido *in situ* vía porta para determinar contenidos hepáticos totales de GSH y proteínas oxidadas.

5.4. Parámetros de daño hepático.

5.4.1. Determinación de GOT, GPT y LDH séricas: Se utilizaron kits comerciales (Valtek Diagnostics, Santiago, Chile) y los resultados se expresaron en UI/L de suero.

5.4.2. Evaluación de la histología hepática: Se utilizó microscopía óptica para analizar cortes de hígado, previamente fijados en formalina amortiguada en PBS (10%) incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina-eosina. Los cortes fueron analizados por un patólogo de forma ciega e informados de acuerdo a la presencia de inflamación, hemorragia, fibrosis, necrosis, apoptosis y citoarquitectura del tejido.

5.5. Parámetros de estrés oxidativo hepático.

5.5.1. Evaluación del contenido total de equivalentes de GSH: En homogeneizados de hígado desproteinizados (HClO_4 0,5N) se determinó GSH mediante la técnica autocatalítica de Tietze (Tietze, 1969), en la cual se determinan los equivalentes totales de GSH hepático [GSH+2GSSG (glutación oxidado)] utilizando la reacción catalizada por la glutación reductasa en presencia de NADPH, la cual reduce al GSSG y genera dos moles de GSH/mol de GSSG. La reacción posterior del GSH con DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) genera TNB, compuesto coloreado cuya formación

se registra por el aumento de absorbancia a 412 nm. Para esta determinación, muestras de hígado perfundido *in situ* vía porta con amortiguador Tris 5mM, KCL 150 mM, pH 7.2, para remover la sangre, se homogeneizaron (1:100) en HClO₄ 0,5 N, seguido de centrifugación (10 minutos a 2000g a temperatura ambiente) y neutralización del sobrenadante (K₃PO₄ 1,75 M). Alícuotas de éste se utilizaron para cuantificar el GSH, en un medio de reacción a 30°C que contenía amortiguador fosfato de potasio 0,1 M, EDTA 1 mM pH 7.0, DTNB 0,08 mM, NADPH 0,24 mM y 0,11 U/ml de glutatión reductasa, registrando el aumento de A₄₁₂/minuto, que corresponde a la formación de TNB. Se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer 550 de doble haz, con celdas termorreguladas y los resultados fueron expresados en µmoles de GSH/g de hígado.

5.5.2. Evaluación del contenido de proteínas oxidadas: Se determinó la generación de grupos carbonilo en algunos aminoácidos, generados por la oxidación de ellos, mediante su reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) en fracciones libres de DNA, previa precipitación en medio ácido y detección espectrofotométrica de las hidrazonas derivadas. En las mediciones se utilizaron 200 mg de hígado, homogeneizados con 3 ml de amortiguador de homogeneización (50 mM fosfato de potasio, 0,1 % de digitonina, 40 µg/ml de difenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) y 1 mM de EDTA). Después de incubar (15 minutos, temperatura ambiente) y centrifugar (2300g durante 20 minutos) se mezcló el sobrenadante (1 ml) con DNPH 10mM (4 ml) (tubo 1). El control (tubo blanco) correspondió a otro volumen de sobrenadante al cual se adicionó HCl 2M. Luego de incubar ambos tubos (1 hora, temperatura ambiente, sin luz y con agitación periódica) se precipitó (10 minutos) con ácido tricloroacético (20%, 4 ml) y los precipitados, separados por centrifugación (2300g por 10 minutos). El DNPH libre y los lípidos

contaminantes, fueron removidos mediante 3 lavados con una mezcla etanol:etilacetato (1:1), seguido de centrifugación (5 minutos a 2300g) y suspensión del precipitado final en 2 ml de urea 6 M. El contenido de derivados carbonilos se cuantificó utilizando la absorbancia máxima, obtenida del espectro de absorción (350 – 390 nm) de las muestras tratadas con DNPH y el coeficiente de extinción molar del DNPH ($22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados fueron expresados como nmoles de carbonilos/mg de proteínas de las muestras, cuantificado a partir de la absorbancia a 280 nm de muestras precipitadas con HCl 2,5 M y disueltas en urea 6 M, utilizando como estándar una solución de albúmina de bovino (1 mg/ml) (Reznik y Parker, 1994).

5.6. Evaluación de la actividad de HSF-1.

5.6.1. Preparación de extractos de proteínas nucleares y citosólicas:

Se prepararon extractos de proteínas de las muestras hepáticas almacenadas a -80°C (Deryckere y Gannon, 1994), mediante homogeneización en amortiguador A (Hepes 10 mM pH 7.9, Nonidet P-40 al 0,6%, NaCl 150 mM y PMSF 0,5mM), centrifugación (30 segundos, 100g, 4°C), incubación del sobrenadante (5 minutos, 0°C) y centrifugación (5 minutos, 700g, 4°C). El sobrenadante obtenido, el cual contiene las proteínas citosólicas, se guardó a -80°C para ser utilizado en la cuantificación de Hsp-70. El precipitado, que contiene las proteínas nucleares, fue resuspendido en amortiguador B (Hepes 20 mM pH 7.9, glicerol al 25%, NaCl 420 mM, MgCl_2 1,2 mM, EDTA 0,2 mM, ditioneitol 0,5 mM, PMSF 0,5 mM, benzamidina 2 mM y 5 mg/ml de los inhibidores de proteasas pepstatina, leupeptina y aprotinina, (incubado 20 minutos, 0°C) y centrifugado (5000g, 30 segundos, 4°C). El sobrenadante obtenido, que corresponde al extracto nuclear, fue guardado a -80°C para ser utilizado en la cuantificación de HSF-1.

Las proteínas hepáticas totales fueron evaluadas por el método de Bradford (Bradford, 1976).

5.6.2. Evaluación de la actividad de unión a DNA de HSF-1 (prueba de retardo en la movilidad electroforética o EMSA): Muestras de extracto nuclear (10 µg) se incubaron en hielo con amortiguador “footprinting” y de diálisis nuclear, poli dI:dC, NP-40 al 0,1%, NaCl 150 mM y sondas de DNA doble hebra (0,2 a 0,5 ng) marcadas con ³²P. Se utilizó la siguiente secuencia de consenso:

5' GCC TCG AAT GTT CGC GAA GTT TCG A 3'

Como control de especificidad, duplicados de extractos nucleares fueron co-incubados con un exceso (10 a 100 veces) de DNA frío. Los complejos proteína-DNA fueron resueltos utilizando geles no-denaturantes de poliacrilamida al 6%, los que posteriormente fueron transferidos a papel Whatman 3M (Whatman, Inc, Clifton, NJ), secados al vacío (1 hora a 80°C) y expuestos a placa fotográfica. La intensidad de las bandas se evaluó utilizando el software Scion Image (Scion Corp., Frederick, MD, USA)

5.6.3. Evaluación de la expresión de Hsp-70 (inmunoelectrotransferencia o westernblot): Alícuotas de 10 µl de muestras de extracto citosólico (5µg/µl) fueron sometidas a electroforesis en geles de acrilamida (PAGE-SDS), sistema que posee un gel concentrador: [H₂O, Tris-HCl pH 6.8, acrilamida/bisacrilamida 30/0,8%, persulfato de amonio 10% y TEMED], y un gel separador al 12%, [H₂O, Tris-HCl pH 8.8, acrilamida/bisacrilamida 30/0,8%, persulfato de amonio, TEMED], utilizando el amortiguador de corrida, Tris base 0,025M, glicina 0,192 M, SDS 0,1%. Al término de la electroforesis, las proteínas ya separadas fueron

transferidas a una membrana de nitrocelulosa, utilizando un sistema semi-seco Fastblot y un amortiguador de transferencia [Tris base 25 mM, glicina 150 mM, Metanol 20%, pH 8.3]. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con leche descremada al 5% en TBS [Tris base 0,1 M, NaCl 1M, pH 7.5], luego lavada 3 veces (solución TBS y Tween-20 al 0,1%) e incubada con el primer anticuerpo (diluido 1:1000 en albúmina bovina al 1%). Luego de 3 lavados con la solución TBS y Tween-20 al 0,1%, la membrana fue incubada con el segundo anticuerpo (conjugado a peroxidasa de rábano picante [HRP]) y lavada 3 veces con TBS/Tween al 0,1% y TBS. Las proteínas fueron detectadas utilizando el sistema Quimioluminiscente (Pierce Biotecnology, Inc., Rockford, USA) con una solución de trabajo que contiene solución luminol/enhancer y solución peróxido estable, en una relación 1:1. El análisis de las bandas fue realizado densitométricamente, utilizando el programa ScionImagen (Scion Corporation, Frederick MA, USA).

Como control interno de carga se utilizó la detección de β -actina con un anticuerpo monoclonal (ICN Biomedicals, Inc., Ohio, USA).

5.7. Expresión de resultados y análisis estadístico.

Los resultados fueron expresados como promedios \pm su desviación estándar para cada grupo experimental (9 animales).

El tamaño de la muestra fue obtenido con ayuda del programa estadístico WINEPISCOP 2.0 (Blas *et al.*, 2001). Para la obtención de la misma fueron considerados valores existentes en la literatura (Lillie *et al.*, 1996) en la opción tamaño de la muestra del programa. Al trabajar con un nivel de confianza de 95% y una potencia de 80% el programa arrojó un tamaño de muestra mínimo de 9 individuos por grupo.

La significancia estadística entre grupos experimentales fue calculada por la prueba ANDEVA de doble entrada (2x2) y test de Tukey, utilizando para ello el programa InfoStat versión 2007 para Windows, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, en la Unidad de Tecnologías de la Información (UTI) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile con la ayuda de la Dra. Valeria Rojas.

6. RESULTADOS.

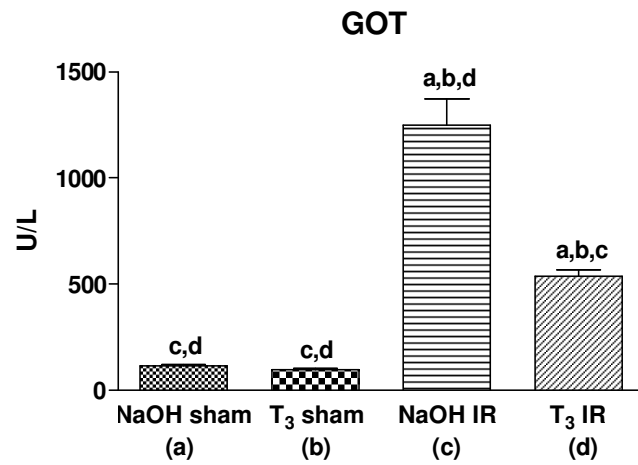
6.1. Actividad de transaminasas y LDH.

Las figuras 4A y 4B, muestran que en el grupo experimental de daño (NaOH/IR) hubo incrementos significativos de las transaminasas GOT y GPT (11,5 y 32 veces respectivamente), en relación al grupo control (NaOH/Sham). Ambos parámetros también incrementaron significativamente (GOT 4,4 veces, GPT 7 veces), respecto a controles, en el grupo experimental (T₃/IR) alcanzando valores significativamente menores que aquéllos de los animales dañados (ANDEVA p<0,05).

De manera similar, la LDH sérica (Figura 5) incrementó significativamente (8,8 veces) en el grupo experimental de daño (NaOH/IR), respecto a controles (NaOH/Sham), con incrementos significativos (2,9 veces) en relación a controles en el grupo experimental (T₃/IR) y valores significativamente menores que los del grupo dañado (NaOH/IR) (ANDEVA p<0,05).

En todos los parámetros descritos no hubo diferencias entre controles (NaOH/Sham) y controles de IR (T₃/Sham).

A.



B.

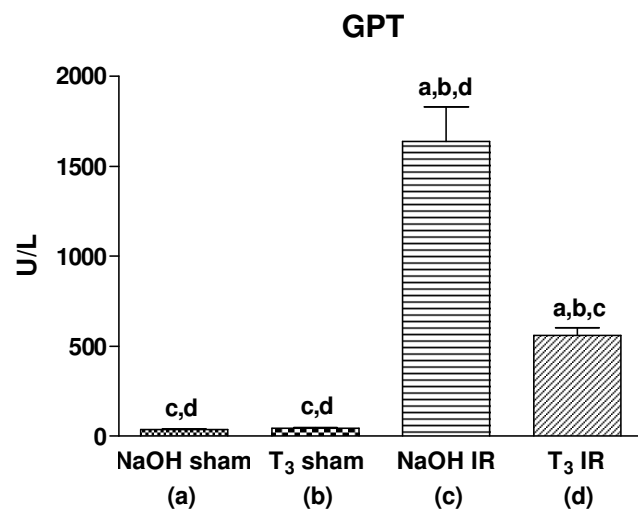


Figura N° 4: Niveles séricos de transaminasas en ratas precondicionadas con una dosis única de T₃. **A)** Valores de transaminasa glutámico/oxalacético (GOT) **B)** Valores de transaminasa glutámico/pirúvico (GPT). n= 9 animales por grupo. Promedio ± SEM. Las letras indican diferencias significativas (p< 0,05). ANDEVA doble entrada y test de Tukey.

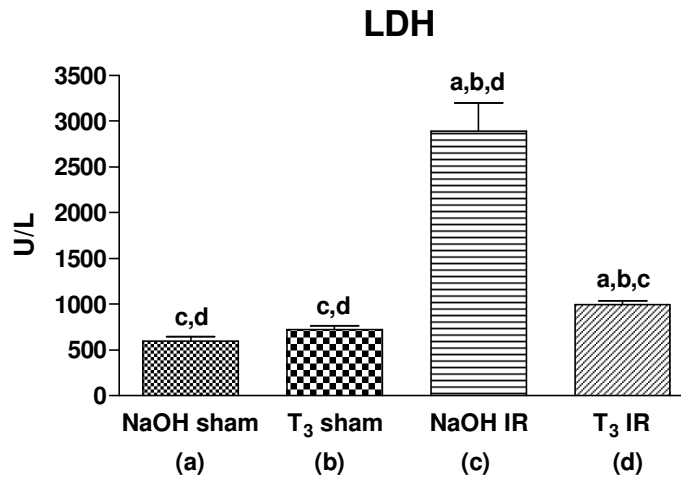


Figura N° 5: Niveles séricos de LDH en ratas precondicionadas con una dosis única de T₃. n= 9 animales por grupo. Promedio ± SEM. Las letras indican diferencias significativas (p< 0,05). ANDEVA doble entrada y test de Tukey.

6.2. Histología Hepática.

La evaluación histológica, realizada en cortes de tejido obtenidos de una sección del lóbulo hepático isquemizado derecho, teñidos con hematoxilina-eosina y posteriormente evaluados por un patólogo de forma ciega, mostró morfología hepática normal en los animales controles (Figura 6A) y distorsión substancial de la arquitectura hepática, con extensas áreas de necrosis en hepatocitos de la zona media, extendiéndose a las áreas pericentral y periportal e infiltración de neutrófilos en la zona media y tracto portal, con un ligero crecimiento de este último y vénulas centrales, en el grupo NaOH/IR (Figura 6B).

Por el contrario los hígados de los grupos T₃/Sham (Figura 6C) y T₃/IR (Figura 6D) mostraron arquitectura hepática normal, con un mínimo crecimiento de la vénula central y tracto portal, sin evidenciar signos de necrosis.

Cabe destacar que no se observó fibrosis en ninguno de los grupos estudiados

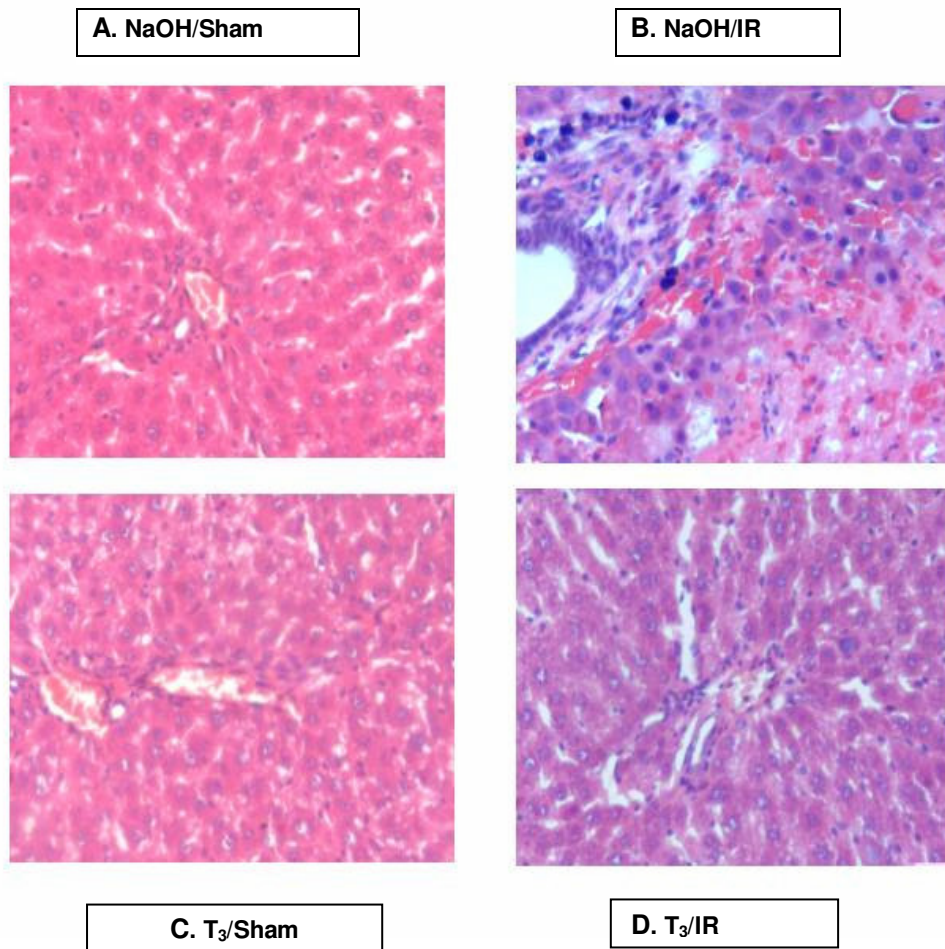


Figura N° 6: Cortes de hígado representativos de (A) rata sometida a simulación de cirugía, (B) animal sometido a una hora de isquemia seguido de 20 hrs. de reperusión, (C) rata tratada con T₃ y sometida a simulación de la cirugía y (D) animal tratado con T₃ y sometido a I/R. Tinción Hematoxilina-Eosina.

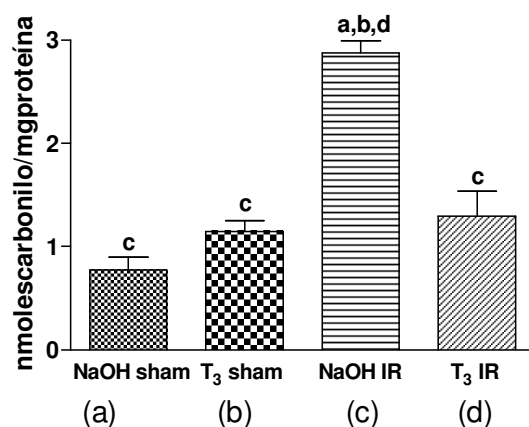
6.3. Parámetros de estrés oxidativo hepático.

En las figuras 7A y 7B se observa que los animales no preacondicionados y sometidos a I/R (NaOH/IR) presentaron una condición de estrés oxidativo aumentado. Lo anterior se explica por el incremento que mostraron en el valor de proteínas oxidadas, sumado a una disminución

significativa en los valores de equivalentes totales de GSH, en comparación con el resto de los grupos estudiados ($p < 0,05$). Por el contrario, las proteínas oxidadas y contenidos de GSH de los animales precondicionados con T_3 (T_3 /Sham y T_3 /IR) no fueron significativamente diferentes a los del grupo control (NaOH/Sham).

A.

Proteínas Oxidadas Hepáticas



B.

GSH TOTAL

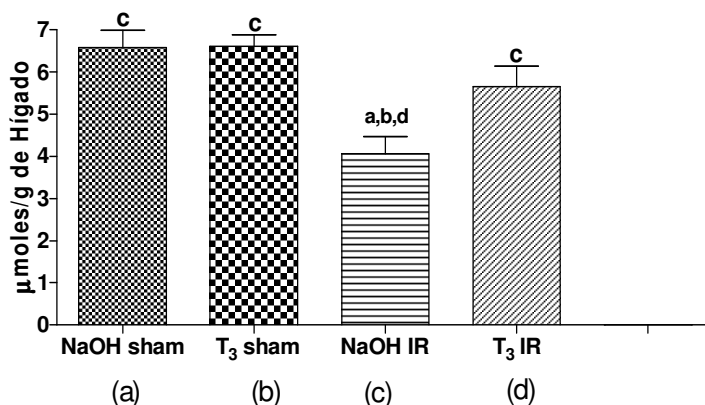


Figura N° 7: Parámetros de estrés oxidativo en el precondicionamiento hepático con T_3 . (A) Niveles de proteínas oxidadas en los distintos grupos experimentales, expresadas como nmoles de carbonilos/mg de proteínas. (B) Niveles de GSH total en los diferentes grupos analizados, expresados como μ moles de GSH/g de hígado. $n = 9$ animales por grupo. Promedio \pm SEM. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). ANDEVA doble entrada y test de Tukey.

Lo anterior queda claramente especificado al analizar el índice de estrés oxidativo, cuociente entre proteínas oxidadas (POX) y GSH total (POX/GSH), ya que se pudo observar que el mayor índice lo presentó el grupo con daño (NaOH/IR), en relación al resto de los grupos estudiados los cuales presentaron valores comparables (Figura 8).

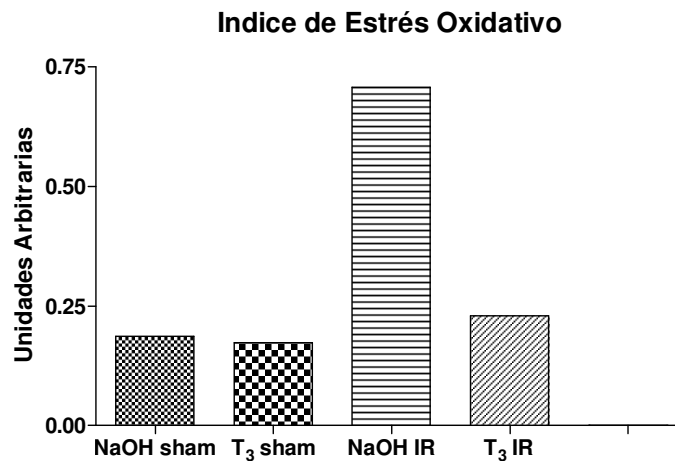
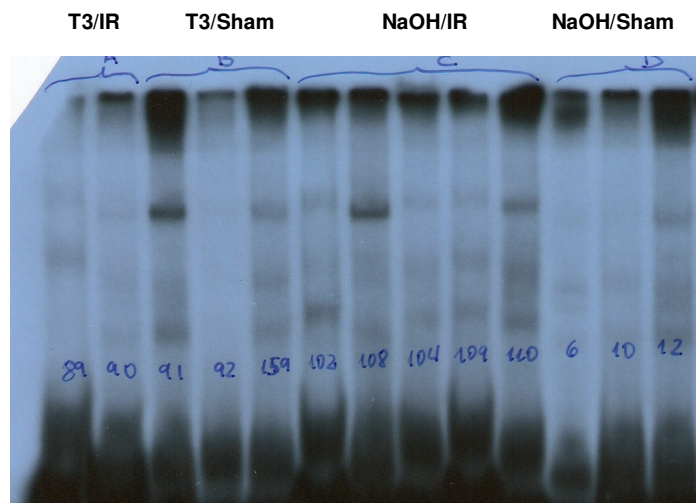


Figura N° 8: Índice de estrés oxidativo en el preacondicionamiento hepático con T₃. Relación entre los valores promedios de proteínas oxidadas y glutatión de los distintos grupos experimentales, expresados como unidades arbitrarias.

6.4. Evaluación de la actividad de HSF-1.

La figura 9A muestra las autorradiografías de las bandas de un ensayo EMSA para HSF-1 y la figura 9B los promedios de las cuantificaciones densitométricas. Al analizar estadísticamente la actividad de unión al DNA del HSF-1 se observan incrementos significativos, respecto a controles (Sham) en los 2 grupos sometidos a I/R (NaOH/IR y T₃/IR).

A



B

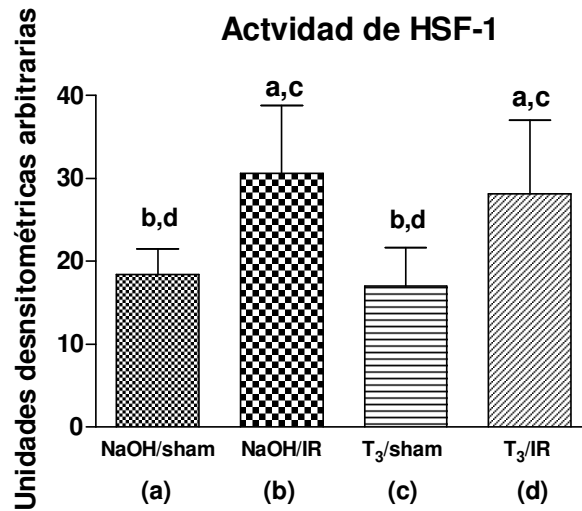


Figura 9: Efectos del precondicionamiento hepático con T₃ sobre la actividad de unión a DNA de HSF-1. (A) Autorradiografía representativa para la actividad de HSF-1, medida por la unión de proteínas nucleares a una sonda de consenso radiomarcada en geles de retardo (EMSA). (B). Cuantificación densitométrica de la actividad de HSF-1 en los distintos grupos experimentales. n= 9 animales por grupo. Las letras indican diferencias significativas (p< 0,05). ANDEVA doble entrada y test de Tukey.

6.5. Evaluación de la expresión de HSP-70.

La figura 10A muestra las autorradiografías de las bandas de un ensayo western blot para Hsp-70 y la figura 10B los promedios de las cuantificaciones densitométricas. El análisis estadístico de la expresión de Hsp-70 muestra un aumento significativo de esta proteína en el grupo sometido a I/R y no preacondicionado (NaOH/IR), respecto a los demás grupos experimentales ($p < 0,05$). Se observa además que en el grupo preacondicionado y sometido a I/R (T_3 /IR), la expresión de Hsp-70 es significativamente mayor que en el grupo control (NaOH/Sham) ($p < 0,05$).

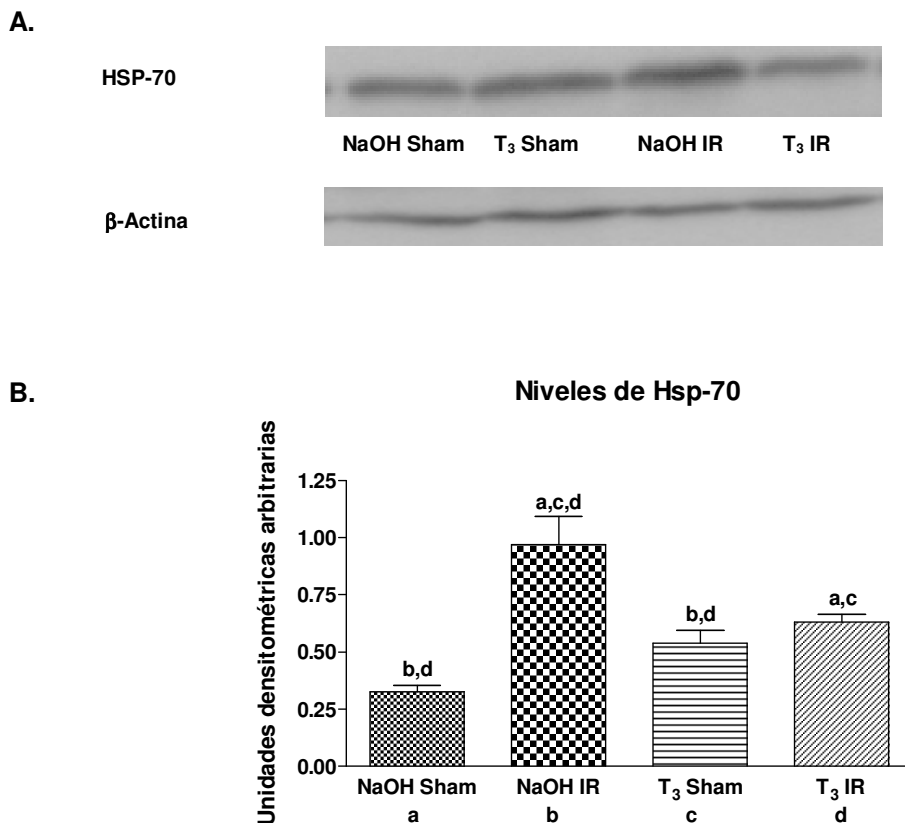


Figura 10: Niveles de HSP-70 en el preacondicionamiento con T_3 . **(A)** Autorradiografía representativa de la expresión de HSP-70 en extractos celulares hepáticos, de los diferentes grupos experimentales mediante western blot. Como control interno se determinó la expresión de β -actina. **(B)** Cuantificación densitométrica de los niveles de de HSP-70. $N = 9$ animales por grupo. Promedio \pm SEM. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). ANDEVA doble entrada y test de Tukey.

7. DISCUSIÓN.

La magnitud del estrés oxidativo es un determinante importante de la respuesta celular alcanzada. La exposición a especies reactivas pro-oxidantes (ROS y RNS) genera una amplia variedad de respuestas celulares, dependiendo del tipo celular, el nivel de ROS y/o RNS y la duración de la exposición (Figura 11).

Si bien niveles elevados de ROS y RNS generan daño celular, incrementos moderados y transitorios de estas especies desempeñan un rol regulatorio al mediar procesos de señalización asociados a la sobrevivencia celular (Fernández *et al.*, 2007). Más aún, en ciertas condiciones se observa que incrementos transitorios en los niveles de ROS y/o RNS generan protección frente al estrés oxidativo reestableciendo la homeostasis redox (Dröge, 2002).

Muchas de las respuestas celulares gatilladas por el estrés oxidativo están mediadas por la activación de factores de transcripción redox sensibles, como NF- κ B, AP-1, STATs y HSF-1, entre otros, los cuales llevan a cambios en la expresión génica conducentes a la sobrevivencia, la senescencia o la muerte celular (Martindale y Holbrook, 2002).

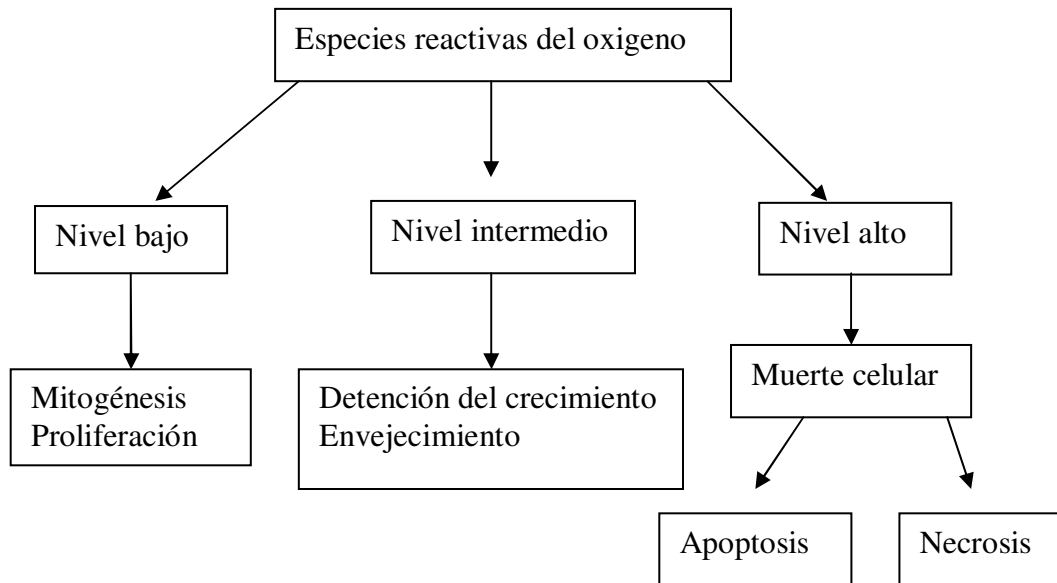


Figura N° 11: Respuestas celulares inducidas por las especies reactivas del oxígeno. Extraída de Romanque *et al.*, 2005.

En este sentido, la respuesta calorigénica inducida por la administración de una dosis única de T_3 (0,1mg/kg) a ratas, incrementa el estado de estrés oxidativo hepático, desbalance redox que ocurre dentro de las 24 hrs. posteriores a la administración de la hormona.

En estas condiciones se observan altas tasas de consumo de O_2 hepático e incrementos en la generación de ROS y RNS en diversos compartimentos intracelulares (mitocondria, retículo endoplásmico, peroxisomas y citoplasma) junto a una disminución de defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas, cambios que conllevan a una caída significativa en el contenido total de GSH y a un aumento de la oxidación de proteínas.

Estos cambios ocurren tanto en el parénquima hepático, como en las células de Küpffer, macrófagos que manifiestan aumentos de la actividad fagocítica y respuesta respiratoria, asociada a las actividades NADPH oxidasa y NOS. El desbalance redox hepático gatillado por T_3 correspondería a un

“estrés oxidativo moderado y transitorio” ya que éste se manifiesta sin cambios morfológicos o funcionales hepáticos y además, en períodos posteriores (48 hrs post-T₃) hay normalización de la actividad de las células de Küpffer y del estado redox hepático (Fernández *et al.*, 2007).

En la condición redox hepática, desarrollada por la hormona tiroídea, se ha observado una activación temprana del factor de transcripción NF- κ B a nivel de las células de Küpffer con incrementos en la expresión y niveles séricos de TNF- α (respuesta temporal), IL-1 α , IL-6 e IL-10 (Tapia *et al.*, 2003).

La vía gatillada por la unión del TNF- α a receptores TNFR1 en células parenquimáticas, gatilla incrementos en la unión a DNA del NF- κ B y expresión de iNOS, MnSOD y Bcl-2, proteínas citoprotectoras cuyos genes son NF- κ B dependientes (Fernández *et al.*, 2005a; Fernández *et al.*, 2005b).

La liberación de IL-6 se correlaciona con la activación de la cascada JAK/STAT e incremento en la expresión de haptoglobina y β -fibrinógeno (respuesta de fase aguda hepática).

Los antecedentes anteriormente descritos permiten plantear que la hormona tiroídea puede ejercer efectos hepatoprotectores vía inducción de mecanismos dependientes del estado redox en las células de Küpffer, las que secretan citoquinas capaces de mediar respuestas protectoras a nivel de los hepatocitos, efectos que se sumarían a las acciones mitogénicas de T₃.

Este estudio muestra que el daño hepático gatillado por la I/R se acompaña de un drástico incremento en el estado redox hepático, con depleción del GSH e incremento del contenido de proteínas oxidadas y que la administración de una dosis única de T₃, 48 hrs. antes de la aplicación del

protocolo de I/R, disminuye significativamente el daño hepatocelular inducido por la I/R.

El efecto protector de T_3 , evidenciado por la normalización de parámetros de daño hepático, transaminasas y LDH séricas e histologías hepáticas, se relaciona con la supresión del estrés oxidativo hepático inducido por la I/R, como lo evidencian la normalización de los contenidos hepáticos de GSH y proteínas oxidadas. Es importante señalar que la protección conferida por T_3 podría estar relacionada con la prevención del daño oxidativo a biomoléculas, gatillado por los ROS generados en la I/R.

Respecto a la contribución a esta hepatoprotección del HSF-1, factor de transcripción redox-sensible asociado a respuestas citoprotectoras y que actúa en las vías de señalización de $TNF-\alpha$ (Christians *et al.*, 2002), el presente estudio indica que la vía gatillada por HSF-1 no participa en el preconditionamiento hepático por T_3 .

En concordancia, la expresión de Hsp-70, chaperona antiapoptótica, relacionada con respuestas frente a situaciones de estrés y regulada por HSF-1, aumentó significativamente sólo en animales isquemizados y no preconditionados, sin cambios en los grupos tratados con T_3 .

Sin embargo, un estudio cinético (0 a 72 horas) de la actividad de unión a DNA de HSF-1 reveló incrementos en períodos posteriores a las 48 horas post- T_3 , lo que explica la ausencia de respuesta de esta vía en el modelo de preconditionamiento estudiado. (Datos no mostrados).

HSF-1 y Hsp-70 son blancos atractivos en estrategias terapéuticas diseñadas para estimular mecanismos protectores endógenos contra las

consecuencias deletéreas del estrés oxidativo. Con nuevos avances tecnológicos, se podría anticipar la importancia de Hsp, solo o en combinación con otras vías de respuesta al estrés y finalmente reducir el daño y acelerar la recuperación funcional de órganos susceptibles en organismos vivos.

Finalmente, es importante destacar que este estudio sugiere la posibilidad de la utilización clínica de T₃, como preconditionante hepático frente a la I/R asociada a cirugías hepáticas bajo exclusión vascular, ya que se trata de una molécula endógena ampliamente utilizada en terapéutica y bien tolerada.

8. CONCLUSIONES.

La administración de T_3 tiene un efecto preconditionante hepático, frente a la I/R, evidenciado por normalizaciones de la histología hepática, actividades séricas de LDH y transaminasas y del estado redox hepático, de los animales tratados con T_3 respecto a animales no preconditionados y sometidos a I/R.

La actividad de la vía regulada HSF-1 no mostró diferencias significativas, tanto en la unión a DNA del factor de transcripción, como en la expresión de Hsp70, proteína que aumentó significativamente sólo en animales isquemizados y no preconditionados. Por lo tanto, se concluye que la vía de señalización celular regulada por HSF-1, no participa en la protección hepática conferida por T_3 frente a la I/R.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- **Arumugam T, Shiels I, Woodruff T, Granger D, Taylor S.** The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. *Shock*. 21: 401-409. 2004.
- **Atalla S, Toledo-Pereyra L, Mackenzie G, Cederna J.** Influence of oxygen-derived free radicals scavengers on ischemic liver. *Transplantation* .40. 584-589. 1985.
- **Bernelli-Zazzera A, Cairo G, Schiaffonati L, Tacchini L.** Stress proteins and reperfusion stress in the liver. *Ann New York Acad Sci USA*. 663: 120-124. 1992.
- **Bertini R, Allegretti M, Bizzarri C, Moriconi A, Locati M, Zampella G, Cervellera M, Di Cioccio V, Cesta M, Galliera E, Martinez F, Di Bitondo R, Troiani G, Sabbatini V, D'Anniballe G, Anacardio R, Cutrin J, Cavalieri B, Mainiero F, Strippoli R, Villa P, Di Girolamo M, Martin F, Gentile M, Santoni A, Corda D, Poli G, Mantovani A, Ghezzi P, Colotta F.** Noncompetitive allosteric inhibitors of the inflammatory chemokine receptors CXCR1 and CXCR2: Prevention of reperfusion injury. *Proc Nat Acad Soc*. 101: 11791-11796. 2004.
- **Blas N, Ortega C, Frankena K, Noordhuizen J.** *Winepiscope 2.0*. University Wageningen. 2001.
- **Bradford M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248 – 254. 1976.
- **Carini R, Albano E.** Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology*. 125: 1480-1491. 2003.
- **Carini R, De Cesaris M, Splendore R, Domenicotti C, Nitti M, Pronzato M, Albano E.** Signal pathway responsible for hepatocyte preconditioning by nitric oxide. *Free Rad Biol & Med*. 34: 1047-1055. 2003a.
- **Clemens M.** Nitric oxide in liver injury. *Hepatology*. 30: 1-5. 1999.

- **Collard C, Lekowski R, Jordan J, Agah A, Stahl G.** Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol.* 36: 941-948. 1999.
- **Cottart C, Do L, Blanc M, Vaubourdolle M, Descamps G, Durand D, Galen F, Clot J.** Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology.* 29: 809-813. 1999.
- **Cutrín J, Perrelli M, Cavalieri B, Peralta C, Roselló-Catafau J, Poli G.** Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med.* 33: 1200-1208. 2002.
- **Christians E, Yan L, Benjamin I.** Heat shock factor 1 and heat shock proteins: Critical partners in protection against acute cell injury. *Crit Care Med.* 30: s43-s50. 2002.
- **Das D, Maulik N.** Preconditioning potentiates redox signaling and converts death signal into survival signal. *Arch Biochem Biophys.* 420: 305-311. 2003.
- **Deryckere F, Gannon, F.** A one-hour miniprep technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues. *Biotechniques.* 16: 405. 1994.
- **Dröge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82: 47-95. 2002
- **Fernández V, Tapia G, Varela P, Videla L.** Redox-regulation of thyroid hormone-induced Küpffer cell-dependent I κ B- α phosphorylation in relation to inducible nitric oxide synthase expression. *Free Radic. Res.* 39: 411-418. 2005a
- **Fernández V, Tapia G, Varela P, Castillo I, Mora C, Moya F, Orellana M, Videla L** Redox up-regulated expression of rat liver manganese superoxide dismutase and Bcl-2 by thyroid hormone is associated with inhibitor of κ B- α phosphorylation and nuclear factor- κ B activation. *J Endocrinol.* 186: 539–547. 2005b.

- **Fernández V, Castillo I, Tapia G, Romanque P, Uribe-Echevarría S, Uribe M, Cartier-Ugarte D, Santander G, Vial M, Videla L.** Thyroid hormone preconditioning: protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat. *Hepatology*, 45: 170-177, 2007.
- **Flanagan S, Moseley P, Buettner G.** Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Lett.* 431: 285-286. 1998.
- **Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G.** Heat Shock Proteins: Endogenous Modulators of Apoptotic Cell Death. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 286: 433-442. 2001.
- **Giakoustidis D, Iliadis S, Tsantilas D, Papageorgiu G, Kontos N, Kostopoulou E, Botsoglou N, Gerasimidis T, Dimitriadou A.** Blockade of Kuppfer cell by gadolinium chloride reduces lipid peroxidation and protects liver from ischemia-reperfusion injury. *Hepatogastroenterology.* 50: 1587-1592. 2003.
- **Hardy K, McClure D, Subwongcharoen S.** Ischaemic preconditioning of the liver: a preliminary study. *Aust N Z J Surg.* 66: 707-710. 1996.
- **Inoue T, Kwon A-H, Oda M, Kaibori M, Kamiyama Y, Nishizawa M, Ito S, Okumura T.** Hypoxia and heat inhibit inducible nitric oxide synthase gene expression by different mechanisms in rat hepatocytes. *Hepatology.* 32: 1037-1044. 2000.
- **Jaeschke H, Farhood A, Smith W.** Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J.* 4: 3355-3359. 1990.
- **Kato A, Sing S, Mcleish K, Edwards M, Lentsch A.** Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,* 282: G608-G616. 2002.
- **Kiang J.** Inducible heat shock protein 70 kd and inducible nitric oxide synthase in hemorrhage/resuscitation-induced injury. *Cell Research.* 14: 450-459, 2004.

- **Knowles R, Moncada S.** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 298: 249-258. 1994.
- **Lemasters J, Bunzendahl H, Thurman R.** Centrilobular injury following hypoxia in isolated perfused rat liver. *Science* 213: 661-663. 1981.
- **Lemasters J, Thurman R.** Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. *Liver Transplantation and Surgery*, 1: 124-138, 1995
- **Lichtman S, Lemasters J.** Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver. *Semin Liver Dis.* 19. 171-187. 1999.
- **Lillie L, Temple N, Florence Z.** Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, haematology and clinical chemistry. *Human & experimental Toxicology.* 15: 612-616. 1996.
- **Martindale J, Holbrook N.** Cellular response to oxidative stress: signalling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology.* 192: 1-15. 2002.
- **Mc Cord J.** Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl J Med.* 312: 159-163. 1985.
- **McCord J.** Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc.* 46: 2402-2406. 1987.
- **Mosher B, Dean R, Harkema J, Remik D, Palma J, Crockett E.** Inhibition of Kupffer cells reduces CXC chemokine production and liver injury. *J Surg Res.* 99: 201-210. 2001.
- **Marubayashi S, Kiyohiko D, Ochi K, Kawasaki T.** Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: Prevention of damage by α -tocopherol administration. *Surgery.* 99: 184-191. 1986
- **Murry C, Jennings R, Reimer K.** Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 74: 1124 – 36. 1986.

- **Nauta R, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh D, Miller D, Butterfield A.** Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Surg Gynecol Obst.* 171: 120-125.1990.
- **Nauta R, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh D, Miller D, Butterfield A.** The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg.* 213: 137-142. 1991.
- **Nordström G, Seeman T, Hasselgren P.** Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery.* 97: 679-683.1985.
- **Pantos C, Malliopolou V, Mourouzis I, Karamanoli E, Tzeis S, Carageorgiu H, Varonos D, Cokkinos D.** Long-term thyroxine administration increases heat stress protein-70 mRNA expression and attenuates p38 MAP kinase activity in response to ischemia. *J Endocrinol.* 170: 207-215. 2001.
- **Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Roselló-Catafau J.** Protective effect preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology.* 25: 934-937. 1997
- **Pockley AG** Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert Rev Mol Med.* Sep 21: 1-21. 2001.
- **Pretto Jr. E. A.** Reperfusion injury of the liver. *Transpl Proc.* 23: 1912-1914.1991.
- **Reznick A, Parker L.** Oxidative damage to proteins. Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzimology.* 233: 357-363. 1994.
- **Romanque P, Uribe M, Videla L.** Mecanismos moleculares en el daño por isquemia-reperfusión hepática y en el preacondicionamiento isquémico. *Rev Méd Chile.* 133: 469-476. 2005.
- **Rudiger H, Graf R, Clavien P.** Sub-lethal oxidative stress triggers the protective affects of ischemic preconditioning in the mouse liver. *J Hepatol.* 39: 972-977. 2003.

- **Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien P.** Protective Strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology*. 125: 917-936. 2003.
- **Serracino-Inglott F, Mathie R.** Nitric oxide and hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatogastroenterology*. 47: 1722-1725. 2000.
- **Tapia G, Fernández V, Varela P, Cornejo P., Guerrero J, Videla L.** Thyroid Hormone-Induced Oxidative Stress Triggers Nuclear Factor- κ B Activation and Cytokine Gene Expression in Rat Liver. *Free Radic. Biol. Med.* 35: 257-65. 2003.
- **Teoh N, Dela Pena A, Farrell G.** Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF- κ B, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology*. 36: 94-102. 2002.
- **Teoh N, Leclercq I, Dela Pena A, Farrell G.** Low-dose of TNF- α protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: implications for preconditioning. *Hepatology*. 37: 118-128. 2003.
- **Terajima H, Enders G, Thiaener A, Hammer C, Kondo T, Thiery J, Yamamoto Y, Yamaoka Y, Messmer K.** Impact of hypothermic preconditioning on postischemic hepatic microcirculatory disturbances in an isolated perfusion model of rat liver. *Hepatology*. 31: 407-415. 2000.
- **Tietze F.** Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*. 27: 502-552. 1969.
- **Tsukamoto H.** Redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells. *Antioxid Redox Signal*. 4: 741-748. 2002.
- **Uchinami H, Yamamoto Y, Kume M, Yonezawa K, Ashikawa Y, Taura K, Nakajima A, Hata K, Yamaoka Y.** Effect of heat shock preconditioning on NF- κ B/I- κ B pathway during I/R injury of the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 282: G962-G971. 2002.
- **Videla L.** Energy metabolism, thyroid calorigenesis, and oxidative stress: functional and cytotoxic consequences. *Redox Rep*. 5: 265-275. 2000.

- **Yamamoto H, Yamamoto Y, Yamagami K, Kume M, Kimoto S, Toyokuni S, Uchida K, Fukumoto M, Yamaoka Y.** Heat-shock preconditioning reduces oxidative protein denaturation and ameliorates liver injury by carbon tetrachloride in rats. *Res Exp Med.* 199: 309-318. 2000.
- **Yellon D, Dana A.** The preconditioning phenomenon: A tool for the scientist or clinical reality? *Circ Res.* 87: 543-550. 2000.
- **Yonezawa K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Ashikawa Y, Uchinami H, Taura K, Nakajima A, Hata K, Yamaoka Y.** Suppression of tumor necrosis factor- α production and neutrophil infiltration during ischemia-reperfusion injury of the liver after heat shock preconditioning. *J Hepatol.* 35: 619-627. 2001.
- **Younes M, Strubelt O.** The involvement of reactive oxygen species in hypoxic injury to rat liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 59: 369-381. 1988.

