

UCH-FC
MA6-B
D468
C.1



Efecto del pretratamiento hormonal con triyodotironina y metilprednisolona sobre la regeneración hepática post hepatectomía parcial

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Magister en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias – Universidad de Chile

Por

Amanda Paz D'Espessailles Tapia

Abril, 2013

**Directores de Tesis:
Pamela Romanque – Julio Alcayaga**

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata:

Amanda D'Espessailles Tapia

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 30 de enero del 2013.

Director de Tesis

Dr. Julio Alcayaga

Co-Director de Tesis

Dra. Pamela Romanque

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Sergio Lavandero

Dr. Álvaro Glavic





Tesis dedicada a todos los que me han acompañado en esta aventura.

BIOGRAFÍA



Amanda D'Espessailles nació en el año 1986, en Santiago. El 2005 entró al Programa de Bachillerato, dando comienzo a su formación académica. El año 2010 egresó de la carrera de Licenciatura en Ciencias mención Biología de la Universidad de Chile. Desde el año 2009 trabaja en el laboratorio de Estrés Oxidativo y Hepatotoxicidad de la Facultad de Medicina -de la misma casa de estudios- lugar donde desarrolló su tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias, en el año 2013.

AGRADECIMIENTOS



Quisiera agradecer a todos los que han estado conmigo durante estos años, siendo parte tanto de mi formación científica como personal.

A mi familia, amigos de la vida, de la universidad y compañeros de trabajo, que han hecho de esta travesía una diversión. A todos aquellos que han hecho (y que hacen día a día) que estudiar ciencia valga la pena. Gracias.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT de iniciación 11090240 entregado a Dra. Pamela Romanque en 2010.



INDICE DE MATERIAS

	Página
INDICE DE MATERIAS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Regeneración Hepática.....	1
1.1.1 Características Generales.....	1
1.1.2 Modelo de estudio: hepatectomía parcial.....	2
1.2 Vías de señalización post HP.....	4
1.2.1 Circulación Portal.....	4
1.2.2 Mecanismos moleculares de regeneración hepática.....	5
1.3 Regeneración hepática en situaciones de trasplante.....	9
1.4 Trasplante hepático.....	10
1.4.1 Protocolo de resucitación hormonal combinado como tratamiento hormonal en el manejo de donantes.....	11
II HIPÓTESIS.....	15
III OBJETIVO GENERAL.....	16
IV OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
V MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1 Tratamiento de los animales de experimentación.....	18
5.1.1 Animales de experimentación.....	18
5.1.2 Procedimiento quirúrgico.....	18

5.1.3 Grupos experimentales.....	19
5.1.4 Cálculo de tamaño de la muestra.....	21
5.2 Evaluación de la Proliferación Hepática.....	21
5.2.1 Recuperación de masa hepática.....	21
5.2.2 Índice mitótico.....	22
5.2.3 Tinción Inmunohistoquímica para Ki-67.....	22
5.2.4 Medición de Tamaño Celular.....	22
5.2.5 Niveles de expresión de ciclina D1 (CyD1) y de quinasa dependiente de ciclina 2 (Cdk2) mediante RT-PCR.....	23
5.2.6 Niveles de expresión de HGF mediante RT-PCR.....	24
5.3 Parámetros de daño hepático.....	25
5.3.1 Determinación de actividad sérica de transaminasas.....	25
5.3.2 Contenido de Proteínas Oxidadas.....	25
5.3.3 Evaluación de las histologías.....	25
5.4 Evaluación de la función hepática.....	26
5.4.1 Albúmina sérica.....	26
5.5 Evaluación de estado inflamatorio.....	26
5.5.1 Niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias.....	26
5.6 Análisis estadístico.....	26
VI RESULTADOS.....	27
6.1 Evaluación de la proliferación hepática.....	27
6.1.1 Curva de recuperación de masa hepática.....	27
6.1.2 Índice mitótico.....	29
6.1.3 Tinción inmunohistoquímica para Ki-67.....	31
6.1.4 Área celular.....	34
6.1.5 Niveles de expresión de ciclina D1 (CyD1).....	37
6.1.6 Niveles de expresión de HGF.....	39
6.2 Evaluación del daño hepático.....	41
6.2.1 Actividad de transaminasas séricas GOT y GPT.....	41
6.2.2 Contenido total de proteínas oxidadas.....	43
6.2.3 Evaluación histológica.....	44

6.3 Evaluación de la función hepática.....	48
6.3.1 Niveles de albúmina sérica.....	48
6.4 Evaluación del estado inflamatorio.....	49
6.4.1 Niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias.....	49
6.4.1.1 Niveles de expresión del mRNA de IL-6.....	49
6.4.1.2 Niveles de expresión del mRNA de TNF- α	51
VII DISCUSIÓN.....	53
VIII CONCLUSIONES.....	64
IX REFERENCIAS.....	65
X ANEXO.....	71

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Promotores e inhibidores participando en la regeneración hepática después de HP.	8
Tabla 2.	Secuencias de partidores para cada gen estudiado.	23
Tabla 3.	Score de necrosis, inflamación y esteatosis modificado de Ishak.	45

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Principales pasos en la regeneración hepática post HP.	3
Figura 2	Vías y tipos celulares participando en regeneración hepática después de daño o hepatectomía parcial.	6
Figura 3	Grupos experimentales y tiempos según cada tratamiento.	20
Figura 4	Curva de recuperación de masa hepática global en animales pretratados con PRHC.	28
Figura 5	Curva de recuperación de masa hepática según tiempo en animales pretratados con PRHC.	29
Figura 6	Curva global de conteo de mitosis a 0, 16, 24, 72 y 120 horas post HP en animales pretratados con PRHC	30
Figura 7	Conteo mitosis según tiempo en animales pretratados con PRHC.	31
Figura 8	Panel de microfotografías representativas del conteo de células positivas para tinción IHQ para Ki-67 a 24, 72 y 120 horas post HP en animales pretratados con T ₃ , MP y MP+T ₃ .	32
Figura 9	Curva global conteo de células positivas para tinción IHQ para Ki-67 a 24, 72 y 120 horas post HP en animales pretratados con PRHC.	33

Figura 10	Curva global de variación de tamaño celular en animales pretratados con PRHC.	35
Figura 11	Variación de tamaño celular según tiempo en animales pretratados con PRHC.	36
Figura 12	Niveles de expresión de CyD1 mediante RT-PCR a 16 y 24 horas post HP en animales pretratados con PRHC.	38
Figura 13	Niveles de expresión de HGF mediante RT-PCR a 16 y 24 horas post HP en animales pretratados con PRHC	40
Figura 14	Actividad sérica de la transaminasa GPT en animales pretratados con PRHC.	42
Figura 15	Actividad sérica de la transaminasa GOT en animales pretratados con PRHC.	43
Figura 16	Contenido total de proteínas oxidadas en animales pretratados con PRHC.	44
Figura 17	Fotografías representativas de cortes histológicos de hígados de animales pretratados con PRHC a 24 horas post HP.	46
Figura 18	Fotografías representativas de cortes histológicos de hígados de animales pretratados con PRHC a 120 horas post HP.	47
Figura 19	Cambios en niveles de albúmina sérica después de HP en animales pretratados con PRHC.	48
Figura 20	Niveles de expresión de IL-6 mediante RT-PCR a 16 y 24 horas post HP en animales pretratados con PRHC.	50

Figura 21	Niveles de expresión de TNF- α mediante RT-PCR a 16 y 24 horas post HP en animales pretratados con PRHC.	52
Figura 22	Niveles de expresión de CDK2 mediante RT-PCR según tratamiento a 16 y 24 horas post HP.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinasa B; proteína quinasa serina/treonina específica.
AP-1	Proteína activadora 1.
C3a	Componente del complemento C3a.
C5a	Componente del complemento C5a.
Cdk2	Quinasa dependiente de ciclina 2.
CyD1	Ciclina D1.
CK	Células de Küpffer.
CAM	Campos de aumento mayor.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
EGF	Factor crecimiento epidermal.
ERK1/2	Quinasas reguladas por señales extracelulares.
GPT	Alamina aminotransferasa o ALT.
GOT	Aspartato aminotransferasa o AST
HP	Hepatectomía parcial.
HSC	Células estrelladas.
HGF	Factor de crecimiento hepático.
ICAM	Molécula de Adhesión Intracelular.
IκB	Inhibidor de NF-κB.
IL-6	Interleuquina 6.
IFN-γ	Interferón gamma.
LPS	Lipopolisacáridos.
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos.
ME	Muerte encefálica.
MP	Metilprednisolona.
mTOR/S6	Blanco para rapamicina en mamíferos/fosfo quinasa S6.
NF-κB	Factor nuclear kappa B.
PDK1	Quinasa 1 dependiente de Inositol.



PI3-K	Fosfoinositol 3 quinasa.
PRHC	Protocolo de resucitación hormonal combinado.
SEM	Error estándar de la media.
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3.
T₃	3,3',5-triyodo-L-tironina; triyodotironina.
TGF-α	Factor de crecimiento transformante alfa.
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta.
TNFR1	Receptor 1 de TNF.
TR	Receptor de hormona tiroidea
TRβ	Receptor beta de hormona tiroidea

RESUMEN

El tratamiento farmacológico de los donantes de órganos en muerte cerebral con el protocolo de resucitación hormonal combinado (PRHC), compuesto de metilprednisolona (MP) y triyodotironina (T_3), fue desarrollado para aumentar la viabilidad y función de los injertos, principalmente corazón y pulmón. Su aplicación ha resultado exitosa en términos de recuperación de donantes y número de órganos, aunque se desconoce su efecto sobre parámetros relacionados con la recuperación de otros órganos, tales como hígado y riñón. En este estudio, ratas *Sprague-Dawley* macho se pretrataron con MP (0,34 mg/Kg), T_3 (0,05 mg/Kg) o sus vehículos, en inyección intraperitoneal única y fueron sometidas a hepatectomía parcial (HP) del 70%, conformando tres grupos experimentales (n=4) y sus respectivos controles (n=4): A. T_3 , NaOH; B. MP, vMP; C. MP+ T_3 , vMP+NaOH. Los grupos fueron evaluados a las 0, 16, 24, 72 y 120 horas post HP. Se estudió el efecto de este protocolo sobre la recuperación de masa hepática, regeneración, parámetros de daño, estrés oxidativo y función hepática. Se encontró que pretratar con MP+ T_3 no provoca cambios deletéreos en la recuperación total de masa, capacidad de proliferación y función del hígado respecto a los controles ($P < 0,05$, ANOVA Unifactorial). Además, el PRHC disminuyó el daño y estrés oxidativo del tejido, indicando que el pre-tratamiento con MP+ T_3 reduce el daño inflamatorio provocado por la cirugía, sin presentar efectos negativos en la regeneración ni función del tejido hepático post hepatectomía. Estos resultados preclínicos sugieren que el uso de este protocolo sería seguro en el tratamiento de potenciales donantes multiórganos en muerte cerebral.

ABSTRACT

The pharmacological treatment of brain death donors with combined hormonal resuscitation protocol (CHRP), consisting of triiodothyronine and methylprednisolone (MP+T₃), was developed to increase the viability and function of transplanted organs, primarily heart and lung, with successful results in term of donors and organs recovery; however, its effect over specific parameters in organs like liver and kidney, is unknown. In this experimental study, male *Sprague-Dawley* rats were pretreated with MP (0.34 mg/Kg), T₃ (0.05 mg/kg) or their vehicles with a single intraperitoneal injection and then subjected to partial hepatectomy (HP) of 70%. Three experimental groups (n=4) and their respective controls were conformed: A. T₃, NaOH; B. MP, VMP; C. T₃+MP, vMP+NaOH. The groups were evaluated at 0, 16, 24, 72 and 120 hours post-surgery. The effects of this protocol on regeneration, liver mass recovery, liver injury parameters, oxidative stress and liver function were analyzed. The results showed that MP+T₃ pretreatment does not deleteriously affect total mass recovery, proliferation and liver function compared to controls. In addition, the CHRP decrease oxidative stress and liver injury. These results indicate that MP+T₃ pretreatment minimize the inflammatory damage caused by the surgical procedure, without negative side effects on liver tissue regeneration post hepatectomy. These preclinical results suggest that the use of this protocol would be safe for treatment of potential multiorgan donors in brain death.

I INTRODUCCION

1.1 Regeneración Hepática.

1.1.1 Características Generales: La regeneración hepática, posterior a resección parcial de tejido hepático, ocurre por la hiperplasia compensatoria del tejido remanente, no existiendo regeneración del tejido original, en el sentido estricto de la palabra; es decir, los lóbulos o segmentos resecaados no reaparecen en términos anatómicos, sino que el tejido restante entra en replicación, sustituyendo funcionalmente la masa perdida (Michaelopolous y DeFrances, 1997; Taub, 2004; Fausto y cols., 2006). Además de ser un proceso compensatorio, el tamaño del hígado resultante es determinado por las demandas del organismo. La proliferación se detiene cuando la masa original ha sido restablecida y el proceso no afecta la funcionalidad del hígado en el organismo (Holt y cols., 2000). La regeneración gatillada por pérdida quirúrgica de masa hepática no requiere de la participación de células progenitoras o "Stem Cells", sino que se debe a la proliferación sincrónica de los hepatocitos maduros en el hígado remanente, que corresponden al 80% de las células hepáticas y que normalmente se encuentran en estado de quiescencia, pero que pueden ser inducidos a entrar al ciclo celular y a replicarse mediante la participación de cascadas de señalización activadas en respuesta a daño. El

20% restante corresponde a células no parenquimatosas, incluyendo Células de Küpffer (CK), endoteliales, linfocitos y células estrelladas (HSC) (Taub 2004).

1.1.2 Modelo de estudio 'hepatectomía parcial': La hepatectomía parcial (HP) reduce la masa hepática sin producir necrosis significativa, estimula la iniciación inmediata de la regeneración sin una respuesta inflamatoria concomitante y permite precisar cronológicamente los procesos involucrados. Además, desde el comienzo la regeneración de los lóbulos residuales está mediada por procesos relacionados sólo con el tejido hepático, en contraste con otros modelos de estudio de daño hepático (CCl₄) en que los eventos tempranos están acompañados de necrosis e inflamación aguda (Kaplowitz, 2002). En el modelo animal de HP del 70% en ratas, los lóbulos izquierdos y mediales son ligados y extraídos, resultando en una pérdida del 2/3 de la masa total (Higgins y Anderson, 1931). Después de la HP cerca del 95% de los hepatocitos salen del estado de reposo (G₀), entran a G₁, atraviesan la fase S, G₂ y finalmente entran en mitosis (Taub, 2004). En ratas, se observa un aumento en la síntesis de DNA a las 12 horas después de la HP, encontrándose un máximo a las 24 horas.

Durante la regeneración, los diferentes tipos celulares no se dividen en el mismo período temporal. El inicio de la proliferación en los hepatocitos es sincronizado y comienza en las células que rodean a la vena portal del lóbulo hepático y avanza hacia la vena central alrededor de 24 después de la HP, seguido por las células del ducto biliar, las CK, las HSC y, finalmente, las

células endoteliales (Mangnall y cols., 2003). En ratas, dentro de los tres primeros días ocurre la mayor parte del aumento de la masa hepática y el proceso completo se recupera entre 5 a 7 días (Grisham, 1962). Al final de la síntesis del DNA hay apoptosis de hepatocitos como mecanismo de control de la respuesta regenerativa, recuperándose la masa hepática adecuada (Sakamoto y cols., 1999), y aunque la arquitectura celular se normaliza, la forma del hígado no es restaurada sino que el hígado final es una versión desarrollada de los remanentes hepáticos posteriores a la HP.

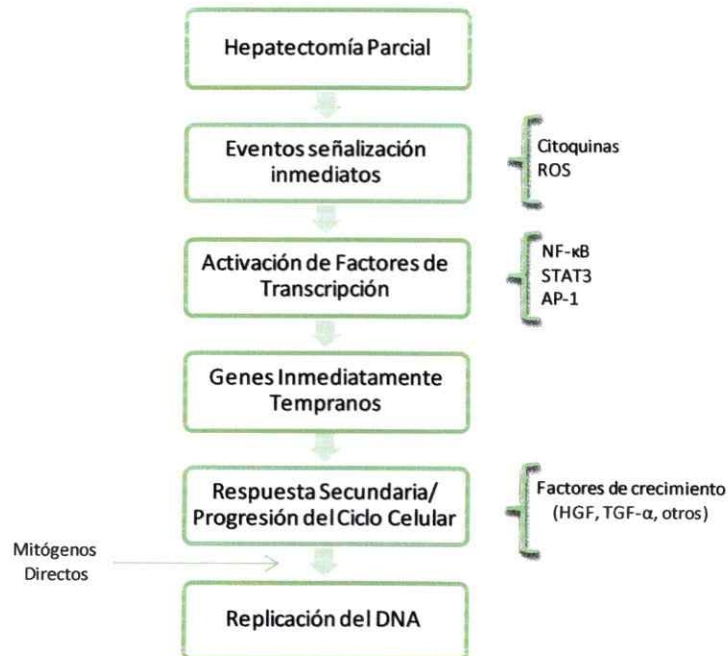


Figura 1. Principales pasos en la regeneración hepática post HP. Los eventos tempranos están asociados con citoquinas (TNF- α e IL-6) y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), en relación a la activación de factores de transcripción (Adaptado de Fausto, 2001).

1.2 Vías de señalización post HP.

1.2.1 Circulación portal: Posterior a la HP en ratas y ratones se observan alteraciones hemodinámicas que inducen cambios globales en el órgano; el componente arterial de la sangre por unidad de tejido hepático no cambia, mientras que la contribución de la vena portal se triplica debido a que la circulación portal continúa atravesando un hígado reducido a un tercio de su tamaño original (Michalopoulos, 2010). Es decir, cada hepatocito quedaría expuesto a un flujo sanguíneo portal aumentado tres veces. Por otro lado, dentro de los primeros quince minutos después de la HP se desencadenan varios cambios en el tejido hepático (aumento en la actividad de urokinasa, migración de β -catenina al núcleo, entre otros), lo que sugiere que i) el aumento del volumen del flujo portal es suficiente estímulo para iniciar las cascadas de señalización o que ii) la sangre portal contiene moléculas señalizadoras (factores de crecimiento, citoquinas, entre otros) que al presentarse en mayor cantidad, debido al aumento de flujo, resultan en la iniciación de las actividades regenerativas. Diversos estudios han mostrado que el flujo portal por sí mismo es importante para desencadenar cambios tempranos (Marubashi y cols., 2004), pero también que las moléculas señalizadoras son fundamentales para el inicio de la regeneración. Esto nos conduce a uno de los paradigmas de la regeneración hepática en que no se ha determinado una señal única que desencadene la proliferación, sino una red de factores que, coordinados, orquestan el proceso de recuperación de la masa hepática.

1.2.2 Mecanismos moleculares de regeneración hepática: Las interacciones intracelulares entre las células hepáticas están mediadas por factores de crecimiento (factor de crecimiento epidermal, EGF; factor de crecimiento hepático, HGF; factor de crecimiento transformante, TGF- α y β) y citoquinas (interleuquina 6, IL-6; factor de necrosis tumoral, TNF- α ; interferón γ , IFN- γ) (Pahlavan y cols., 2006), siendo estos parte de los cerca de 100 genes cuya expresión es inducida posterior a la HP, la mayoría relacionados con la entrada de los hepatocitos al ciclo celular. Estos factores de crecimiento y citoquinas activan rápida y sincronizadamente eventos celulares esenciales de la regeneración hepática y la protección, enviando señales a los hepatocitos. Por otro lado, factores de transcripción específicos como el factor nuclear (NF)- κ B, el transductor de señales y activación de la transcripción (STAT)3 y proteína activadora (AP)-1, y vías de señalización intracelulares que involucran proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), son rápidamente activadas en los hepatocitos remanentes minutos después de HP (Taub, 2004).

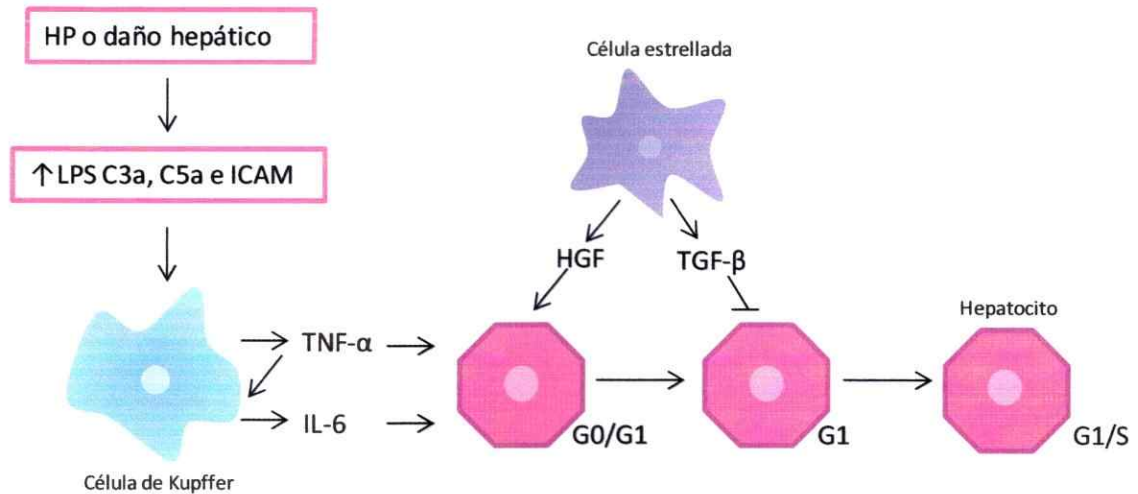


Figura 2. Vías y tipos celulares participando en regeneración hepática después de daño o hepatectomía parcial. Factores derivados bacterias intestinales como lipopolisacáridos (LPS) alcanzan el hígado a través del flujo sanguíneo portal activando células no-parenquimales (CK) y aumentando la producción de las citoquinas TNF- α e IL-6. HGF es producido en el hígado por las células estrelladas y actúa como mitógeno (modificado de Taub, 2004; Taki-Eldin y cols., 2012).

El desarrollo temporal de las vías de señalización activadas específicamente durante la regeneración hepática puede ser dividido en tres fases: iniciación, proliferación y terminación (Fausto y cols., 2005).

i. Iniciación o priming.

La recuperación de la masa hepática posterior a HP depende primeramente de la proliferación de hepatocitos. Corresponde a la fase temporal en la cual los hepatocitos quiescentes entran al ciclo celular (transición G_0 a G_1) y dura entre 4 a 6 horas después de la HP (Fausto, 2001). En esta fase, las CK son activadas por estímulos como LPS, fragmentos de proteínas del complemento, como C3a, C5a y moléculas de adhesión como la Molécula de Adhesión Intracelular (ICAM), y comienzan a producir y secretar TNF- α e IL-6 (Fausto,

2006). Las CK expresan el receptor 1 de TNF- α (TNFR1) en la superficie y potencian (o amplifican) la respuesta inicial por acción autocrina. La vía de señalización TNF- α /TNFR1 en las CK es mantenida por NF- κ B (Webber y cols., 1998). La activación de NF- κ B mediada por TNF- α ocurre dentro de los primeros 30 minutos y se mantiene por 4-5 horas. NF- κ B es un heterodímero compuesto primariamente de las subunidades p50 y p65, que es mantenido en estado inactivo en el citoplasma al estar asociado con el inhibidor de κ B (I κ B); el incremento de TNF- α promueve la activación de NF- κ B a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la activación de un inhibidor del complejo quinasa I κ B (Deng y cols., 2001). Cabe destacar que si bien en el hígado en regeneración TNF- α estimula el crecimiento de los hepatocitos, en condiciones normales, la unión de TNF- α a su receptor y posterior activación de NF- κ B puede causar apoptosis. Se ha postulado que la diferencia en las respuestas podría estar mediada por los niveles de ROS (Fausto, 2000).

Por lo tanto, las interacciones entre los hepatocitos y las células no parenquimales (activación de STAT3, NF- κ B, AP-1) están mediadas por dichas citoquinas, marcan la transición G₀/G₁ del ciclo celular y participan en la sobrevivencia de los hepatocitos (Zimmers y cols., 2003; Fujiyoshi y Ozaki, 2011). IL-6 también juega un rol importante en la fase de proliferación, induciendo la producción hepática de HGF desde las HSC (Michalopoulos, 2007).

Tabla 1. Promotores e inhibidores participando en la regeneración hepática después de HP.

Etapas de la regeneración hepática	Factores	Respuestas
Iniciación	TNF- α , IL-6	Activación de receptor TNF. Activación de STAT3, NF- κ B y AP-1. Activación de genes tempranos: aumento susceptibilidad de los hepatocitos a factores de crecimiento. Transición G ₀ /G ₁ .
Proliferación/ Progresión	HGF, EGF, TGF- α	Propagación de la información requerida para apoyar la respuesta proliferativa. Aumento de la exposición de los hepatocitos a factores de crecimiento.
Terminación	TGF- β , activina	Retorno al estado de quiescencia. Apoptosis del exceso de células.

ii. Progresión y ciclo celular.

Después de la transición G₀/G₁ en la fase de iniciación, la progresión del ciclo celular depende de la señalización iniciada por factores de crecimiento, especialmente de HGF/Met, TGF- α y EGF que inducirían la expresión de genes relacionados con el ciclo celular. Esta fase abarca desde el periodo G₁, el paso a la fase S y la subsecuente mitosis. La expresión de las ciclinas D1 y E es estimulada en esta fase del ciclo celular por los factores de crecimiento. HGF, un potente factor de crecimiento que promueve la proliferación y síntesis del DNA de hepatocitos, es producido en las HSC y actúa vía paracrina. HGF actúa uniéndose directamente su receptor tirosina-quinasa específico, c-met, en la superficie de los hepatocitos. La señal enviada por HGF/c-met es transmitida río abajo, hacia varias vías de señalización incluyendo Ras-Raf-MEK, ERK1/2, PI3-K/PDK1/Akt y mTOR/S6. Estas vías contribuyen a la regeneración promoviendo

la síntesis de DNA, la progresión del ciclo celular, el crecimiento y la protección de las células (Huh y cols., 2004).

iii. Terminación.

Las células que entraron al ciclo celular repetirán el proceso hasta que la masa hepática alcance un peso apropiado para el organismo, lo que ocurre tanto por un aumento en el número de hepatocitos como por aumento en el tamaño de éstos (Michalopoulos, 2007).

No existe consenso en la señal de terminación de la regeneración, pero se considera que el factor de crecimiento transformante (TGF)- β y/o activina actúan para terminar la mitosis a través de la interacción con sus respectivos receptores, causando que la mayoría de los hepatocitos retornen al estado quiescente y, además, desencadenando la apoptosis de las células excedentes en el tejido que sufrió proliferación.

1.3 Regeneración hepática en situaciones de trasplante.

La regeneración hepática es un proceso que involucra la interacción de numerosos tipos celulares hepáticos, vías de señalización, señales paracrinas, autocrinas y señales provenientes de otros órganos. En seres humanos la regeneración hepática ocurre posterior a enfermedades hepáticas donde existe necrosis de hepatocitos; por ejemplo, daño hepático por isquemia o hepatitis y también luego del trasplante del órgano, dependiendo del daño que haya sufrido en el proceso (Taub, 2004).

La regeneración es un proceso importante posterior al trasplante hepático, ya que se recupera la masa de hepatocitos que se puede haber perdido en hígados dependiendo de las condiciones del donante (donante en muerte cerebral, cadavérico, con politraumatismo o portador de infecciones), debido al tiempo de permanencia en isquemia fría en su traslado desde el donante al receptor, a causa de la reperfusión en el receptor o por respuesta aloinmune (Taki-Eldin y cols., 2012). Por otro lado, en el caso de donantes vivos, la regeneración suple el síndrome de 'pequeño para su tamaño' en el receptor (small for size) y recupera la masa hepática perdida en los donantes vivos (Kiuchi y cols., 1999).

1.4 Trasplante hepático.

La situación de escasez de donantes es una problemática a nivel mundial. Los donantes de órganos, de acuerdo a la ley vigente en nuestro país, deben cumplir con el requisito de encontrarse en muerte encefálica (ME), y es ésta la condición de la mayoría de los donantes; durante la ME se producen una serie de alteraciones hemodinámicas, hormonales e inflamatorias que pueden alterar o dañar irreversiblemente la función de los órganos (Van Der Hoeven y cols., 2000). Para minimizar la ocurrencia de estos eventos se han desarrollado protocolos de manejo de donantes: liberalización de criterios de selección y modulación hormonal para la recuperación de órganos considerados 'no viables' (Shah, 2008). Estos tratamientos hormonales fueron desarrollados inicialmente para trasplantes de órganos intratorácicos, en particular corazón.

Los protocolos que incluyen la aplicación de hormonas tiroideas, vasopresina y corticoides son los más utilizados, y se ha demostrado que aumentan la cantidad y calidad de los órganos extraídos (Novitzky y cols., 2006).

1.4.1 Protocolo de resucitación hormonal combinado como tratamiento hormonal en el manejo de donantes: El protocolo de resucitación hormonal combinado (PRHC) corresponde a la aplicación de la hormona tiroidea 3,5,3'-triyodo-L-tironina (T_3) y metilprednisolona (MP) previo a la resección. Como se ha comentado, la administración de hormonas tiroideas, vasopresina y corticoides aumentan la cantidad y calidad de los órganos intratorácicos extraídos, manteniendo la homeostasis celular en el paciente con ME. Estos tratamientos son utilizados en el manejo de donantes, pero no existen estudios específicos analizando su efecto en el trasplante hepático (Novitzky y cols., 2006).

i. Hormonas tiroideas.

Las hormonas tiroideas tienen efectos metabólicos y celulares en varios órganos. La acción nuclear de T_3 está mediada por los receptores nucleares (TRs) de la hormona tiroidea, específicamente por $TR\beta$ (Kowalik y cols., 2010). Se considera que la suplementación exógena de T_3 actúa como mitógeno primario, ya que es capaz de inducir proliferación de los hepatocitos *in vitro* e *in vivo* (Francavilla y cols., 1994; Malik, 2005) sin pérdida de masa celular, lo que se denomina hiperplasia directa (Columbano y Shinozuka, 1996). En modelos experimentales de animales hipotiroideos o con tiroidectomía se observa solo

un retraso temporal en la regeneración post HP. Se ha encontrado que T_3 en dosis de 0,2 mg/Kg induce la proliferación de los hepatocitos en ausencia de cambios tempranos en la activación de NF- κ B y STAT3, aumento en la expresión de genes inmediatamente tempranos (priming) ni en la liberación de TNF- α o IL-6, cambios considerados fundamentales en la regeneración hepática después de la HP (Ledda-Columbano y cols., 2000). Es decir, las vías de señalización transduccionales involucradas en la proliferación de hepatocitos (en la fase de transición de G_0 a G_1) mediada por receptores nucleares son completamente diferentes a los mecanismos de la regeneración hepática que se activan post HP (Columbano y Shinozuka, 1996). Pibiri y colaboradores (2001), encontraron que T_3 (en dosis de 0,2 mg/Kg) estimula la proliferación a través de la modificación de la expresión de diversos genes/proteínas involucradas en el control del ciclo celular, específicamente acelerando la inducción de ciclina D1, que participa en la progresión del ciclo celular. En otros estudios, se ha encontrado que la aplicación exógena de T_3 previa a una HP muestra los mismos patrones de aceleración de la regeneración hepática, incluso aplicada previo a una HP de 90% o en animales adultos en que la regeneración post HP está disminuida (Columbano y cols., 2008).

ii. Corticoides: metilprednisolona.

Fisiológicamente en los hepatocitos, los corticoides regulan el crecimiento celular y el contenido de ácidos grasos (Repa y cols., 2000). En dosis altas, los glucocorticoides inhiben la proliferación de hepatocitos y disminuyen la

expresión de un gran número de genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos (Ibdah y cols., 2000), por lo que el uso de glucocorticoides puede disminuir la regeneración hepática, agravar la esteatosis e inhibir el crecimiento. Se ha mostrado que la inyección de cortisona, hidrocortisona y dexametasona reducen la proliferación de hepatocitos en ratas adultas después de la HP (Rizzo y cols., 1971; Tsukamoto y Kojo, 1989). Los mecanismos de acción son variados y complejos; los glucocorticoides y su receptor actúan en varias vías inflamatorias, mediados por cambios genómicos y no genómicos. Por un lado, los glucocorticoides inducen expresión de proteínas antiinflamatorias como fosfatasa MAPK 1 que inhibe la vía de señalización de las MAPKs, inhibiendo respuestas inflamatorias. Por otro, el receptor de los glucocorticoides puede interactuar directamente con NF- κ B bloqueando su actividad transcripcional al mantenerlo inactivo en el citoplasma, ya que activo conduce a la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6. Se ha demostrado que la administración de corticoides durante el pre o post operatorio puede inhibir la sobreproducción de citoquinas inflamatorias tales como TNF- α e IL-6, y reducir el estrés quirúrgico (Takemura y cols., 1999).

MP es un glucocorticoide sintético utilizado en la clínica para inhibir la liberación o prevenir las alteraciones que producen las citoquinas proinflamatorias, entre otros efectos. Fujioka y cols. (2001) demostraron que aplicar una dosis baja de 3mg/Kg previo a la HP produce una disminución en los niveles de IL-6 e inhibe la disfunción hepática sin alterar la recuperación de masa hepática. Resultados

similares se encontraron con dosis bajas de dexametasona en hígados sometidos a HP (Shibata y cols., 2012) indicando que la disminución en las citoquinas inflamatorias debido a los corticoides en dosis bajas no necesariamente afecta la proliferación de los hepatocitos.

II HIPOTESIS

El pretratamiento con dosis únicas de 0,05 mg/kg de T₃ y/o 34 mg/kg de MP, mantiene y/o aumenta la capacidad regenerativa de los hepatocitos post-hepatectomía parcial, disminuyendo parámetros de daño hepático, inflamación, y estrés oxidativo.

III OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto del pretratamiento combinado con T₃ y MP sobre la regeneración hepática, parámetros de inflamación, daño, función y estrés oxidativo a distintos tiempos post hepatectomía parcial en la rata.

IV OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar la curva de recuperación de masa hepática a las 16, 24, 72 y 120 horas post hepatectomía parcial (70%).
- Determinar el grado de daño hepático a través de: (i) la medición de la actividad de transaminasas séricas (GOT/GPT), (ii) score de daño, inflamación y esteatosis en la observación de la histología hepática.
- Evaluar parámetros de estrés oxidativo tisular a través de la medición de niveles totales de proteínas oxidadas.
- Evaluar la proliferación hepática de los distintos grupos a través de la recuperación de: (i) masa hepática (objetivo específico 1), (ii) índice mitótico, (iii) tinción Ki67 (inmunohistoquímica), (iv) medición área celular, (v) expresión de Ciclina D1 (RT-PCR) y (vi) expresión HGF (RT-PCR).
- Determinar parámetros inflamatorios a través de los niveles de mRNA hepáticos de TNF-alfa e IL-6.
- Evaluar función hepática: albúmina sérica.

V MATERIALES Y METODOS

5.1 Tratamiento de los animales de experimentación.

5.1.1 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Sprague-Dawley* (Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) con un peso corporal entre 190 a 200 g sometidas a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y acceso libre a agua y alimento (dieta sólida Champion, S.A., Chile).

5.1.2 Procedimiento quirúrgico.

Hepatectomía hepática parcial (HP) del 70% fue realizada de acuerdo al método descrito por Higgins y Anderson (1931). La cirugía se realizó bajo anestesia inhalatoria con isoflurano al 1,5-2,5 % con flujo constante de oxígeno de 2 L/min sobre manta térmica con control continuo de la temperatura rectal. Los animales recibieron una dosis única de Zoletil 50 ® 40-60 mg/Kg intraperitoneal (Tiletamina 125 mg y Zolazepan 125 mg, Laboratorio Virbac, Francia, S.A.) 15 minutos antes de la cirugía como inductor anestésico. Se utilizó Tramal (Clorhidrato de Tramadol, 1 a 4 mg/Kg, Laboratorio Sanderson, Chile) como analgésico intramuscular. Se realizó laparotomía media supra umbilical hasta exponer cavidad abdominal, se seccionó el ligamento falciforme se ligaron los lóbulos superior medio derecho e izquierdo con sutura seda 2-0.

Se controló la hemostasia con cauterización y los lóbulos fueron resecados. Las paredes abdominales (músculo y piel) fueron suturadas con seda 3-0 y los animales fueron sometidos a cuidados post-operatorios (inyección subcutánea de suero fisiológico y suero glucosado).

Los animales fueron eutanasiados con Zoletil 50 ® (60-80 mg/Kg) a 0, 16, 24, 72 o 120 horas después de la HP. Se tomaron muestras de través de punción cardiaca, las que fueron centrifugadas a 2000 rpm x 15 min para la obtención de suero; muestras que fueron almacenadas a -20 y a -80°C en BHT como antioxidante para análisis posteriores. Las muestras de tejido fueron fijadas en formalina tamponada por 24 horas para posterior inclusión en parafina o congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a las normas nacionales vigentes con la Aprobación del Comité de Bioética N° CBA#0310 FMUCH.

5.1.3 Grupos experimentales.

Los animales fueron divididos en 3 grupos experimentales (n=4) y sus respectivos controles, según lo indicado en la fig. 1. Grupo (A) pretratado con dosis única de T₃ (Sigma, St Louis, USA) de 0,05 mg/kg de peso corporal dos horas previo a la HP y su control fue pretratado con una dosis equivalente del vehículo NaOH 0,1N (Fernández et al, 2007). Grupo (B) pretratado con dosis única de metilprednisolona (MP, Solu-medrol ®, Pfizer, Suiza) de 34 mg/kg de peso corporal tres horas previo a la HP y su control recibió un volumen

equivalente del disolvente de MP. Grupo (C) pretratado con una dosis única de MP (34 mg/kg) seguido de una inyección de T_3 (0,05 mg/Kg), tres y dos horas previas a HP respectivamente. Su control correspondió a inyección isovolumétrica de disolvente de MP y de NaOH a los mismos tiempos. En todos los grupos experimentales se completó una curva de regeneración a 0, 16, 24, 72 y 120 horas post HP.

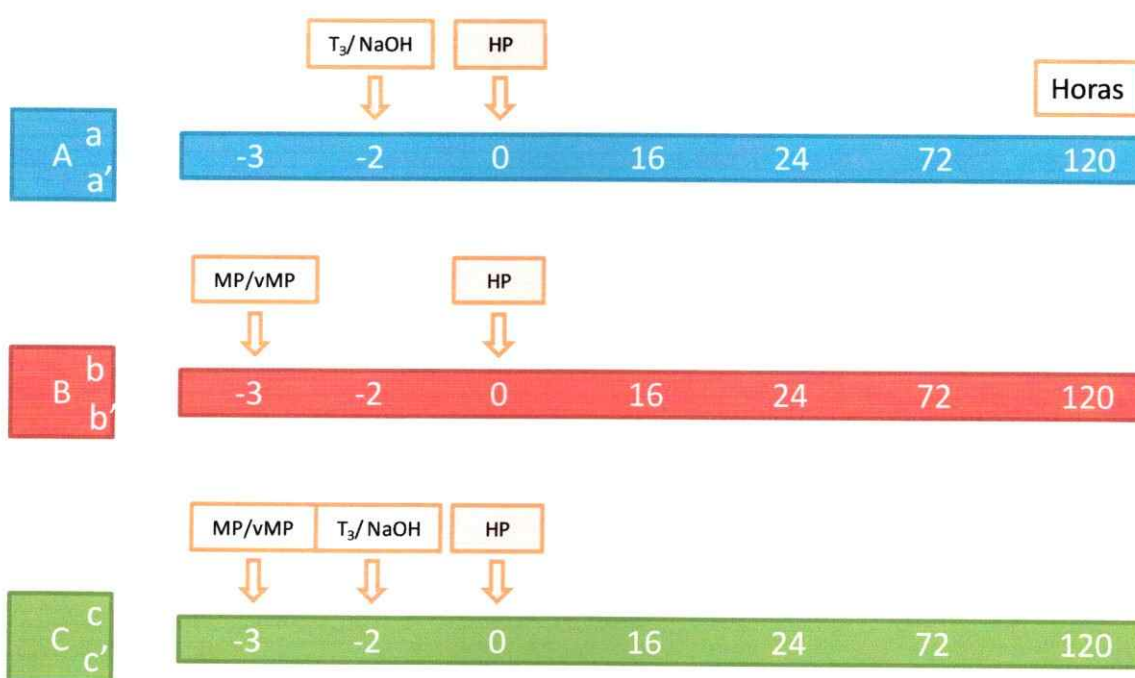


Figura 3. Grupos experimentales y tiempos según cada tratamiento. Se conformaron 3 grupos experimentales de animales pretratados con T_3 , MP o T_3 +MP y sus respectivos controles (letras primas), NaOH, vMP o NaOH+vMP. Dosis únicas de T_3 (o su equivalente en NaOH) fueron inyectadas 2 horas previas a la cirugía y MP (o vMP) fue inyectado 3 horas previas a la cirugía. Animales fueron sacrificados a 0, 16, 24, 72 y 120 horas post HP.

5.1.4 Cálculo de tamaño de la muestra.

Fue calculado según la fórmula:

$$n = \frac{2x(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 x(DS^2)}{|d|^2}$$

Los valores considerados para los coeficientes de riesgo Z_{α} y Z_{β} serán de 1,645 y 1,282 (riesgo de 0,05), respectivamente. La desviación estándar utilizada para el cálculo es de 19 y el cambio promedio (d) esperado fue basado en datos obtenidos en la literatura (Bockhorn y cols., 2007. Aumento en un 90% de la expresión de Ki67 en hígados de ratas pretratadas con T_3 respecto a controles). Según la fórmula, para encontrar diferencias significativas entre lo propuesto y sus controles, el número (n) ideal sería de 6,87 animales. Sin embargo, por consideraciones bioéticas, se analizaron 4 animales por grupo experimental, dando un total de 120 animales.

5.2 Evaluación de la Proliferación Hepática.

5.2.1 Recuperación de masa hepática.

La restitución de la masa hepática fue determinada como porcentaje de masa hepática recuperada y calculada utilizando la razón peso del hígado/peso corporal del animal después de la HP. El peso del hígado remanente luego de la HP (29,06% del peso total) fue estimado con 4 animales eutanasiados para tal efecto.

5.2.2 Índice mitótico.

Se evaluó la presencia de figuras mitóticas en secciones histológicas teñidas con tinción hematoxilina-eosina, contando el número de células en mitosis en al menos 10 campos adyacentes a aumento mayor (400x) bajo microscopio óptico (OLYMPUS CX31, Tokio, Japón). Este parámetro fue expresado como N° de mitosis/campo.

5.2.3 Tinción Inmunohistoquímica para Ki-67.

La tinción inmunohistoquímica para Ki-67 se realizó en cortes de tejido fijados en formalina, incluidos en parafina y montados en portaobjetos silanizados. Se desparafinó e hidrató cada muestra para proceder con la recuperación del antígeno en buffer citrato pH 6 1X (10mM de Citrato de Sodio 0,05% Tween-20) por 30 minutos a 95°C. Previo a la tinción se bloqueó la biotina endógena con la solución Biotin Blocking System (Dako, California, USA). La tinción con anti-Ki67 se realizó según las instrucciones del fabricante (Dako, California, USA). Se evaluó la presencia de núcleos positivos de hepatocitos, para Ki-67 con microscopio óptico (OLYMPUS CX31, Tokio, Japón) en 10 campos a aumento mayor (400x) en todas las muestras en orden aleatorio. Este parámetro fue expresado como N° de células positivas/campo.

5.2.4 Medición de Tamaño Celular.

Se evaluó el área celular (μm^2) de hepatocitos con el programa Micrometrics™ en secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina y observadas bajo

microscopio óptico (OLYMPUS CX31, Tokio, Japón) a aumento mayor (400x) en al menos 5 campos adyacentes.

5.2.5 Niveles de expresión de ciclina D1 (CyD1) y de quinasa dependiente de ciclina 2 (Cdk2) mediante RT-PCR.

Se extrajo mRNA a partir de tejido hepático con kit comercial (E.Z.N.A.® Tissue RNA Kit, Omega Bio-tek, Georgia, USA) utilizando las instrucciones del proveedor, a todos los grupos a 16 y 24 horas post HP. El RNA total extraído se cuantificó espectrofotométricamente (260 y 280 nm) y se calculó la relación 260 nm:280 nm (RNA:Proteínas) para determinar su grado de pureza. Se determinó la concentración de RNA total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) utilizando el valor de absorbancia a 260 nm, el factor de dilución y que una solución de RNA con densidad óptica (DO) de 1.0 corresponde a 40 ng/mL. Para confirmar la integridad del RNA, las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% (20 min a 80 Volts), siendo visualizadas por tinción con bromuro de etidio.

Tabla 2. Secuencias de partidores para cada gen estudiado.

Gen	Secuencia partidor
<i>18s</i>	F 5'-GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA-3' R 5'-TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG-3'
<i>Cdk2</i>	F 5'-TGT GCG GCT TAA GAA AAT CC-3' R 5'-TCC AGC AGC TTG ACG ATG TTA-3'
<i>CyD1</i>	F 5'-CGC GCC CTC CGT TTC TTA CTT C-3' R 5'-GCT GCA GGC GGC TCT TCT TCA-3'
<i>HGF</i>	F 5'-GAC CGG CTT GCA ACA GGA TTC TT-3' R 5'-GAT GGT GC AGG AAG CAG GAG GAG-3'
<i>IL-6</i>	F 5'-TCC TAC CCC AAC TTC CAA TGC TC-3' R 5'-TTG GAT GGT CTT GGT CCT TAG CC-3'
<i>TNF-α</i>	F 5'-AAA TGG GCT CCC TCT ATC AGT TC-3' R 5'-TCT GCT TGG TGG TTT GCT ACG AC-3'

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir del mRNA se utilizó el sistema Super Script II ® (Invitrogen Life Technologies Inc., CA, USA). Se utilizaron hexanucleótidos al azar como partidores (Random Primer), RNA (0,5 µg/µL), dNTP (10mM), DTT 0,1 M, RNasa H (40 U/µL), buffer de síntesis de cDNA 5x y transcriptasa inversa Super Script II (15 U/µL), siguiendo las instrucciones del proveedor. El cDNA obtenido fue utilizado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el sistema GoTaq ® (Promega, Madison, USA) y partidores específicos para los genes *18s*, *CyD1*, *Cdk2*, *HGF*, *TNF-α*, *IL-6*, (ver tabla 2). Se utilizó un termociclador (TPersonal Biometra®, Goettingen, Germany) para realizar los ciclos correspondientes para cada gen. Se cargaron 5 µL de cada producto de PCR (250 pb) en gel de agarosa al 0,8 %. La electroforesis se realizó durante 20 minutos a 80 Volts, visualizando las muestras por tinción con bromuro de etidio. Como control se utilizó *18s* de 350 pb. Las bandas se analizaron por densitometría utilizando el programa Scion Image. La cuantificación se realizó de acuerdo a la relación *CyD1/18s* o *Cdk-2/18s*, según corresponda.

5.2.6 Niveles de expresión de HGF mediante RT-PCR.

La extracción de mRNA y el RT-PCR fueron realizados según lo explicado en el punto 2.5. La cuantificación se realizó de acuerdo a la relación *HGF/18s*.

5.3 Parámetros de daño hepático.

5.3.1 Determinación de actividad sérica de transaminasas.

Para las determinaciones de las actividades séricas de las enzimas GOT y GPT se utilizaron sistemas comerciales (Valtek Diagnostics, Santiago, Chile). Los resultados fueron expresados como UI de actividad enzimática/L de suero.

5.3.2 Contenido de Proteínas Oxidadas.

Para la medición del contenido de proteínas carboniladas de los todos grupos a 16 y 24 horas, muestras de tejido previamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C fueron tratadas con 2,4-dinitrofenilhidrazina para formar una base de Schiff, para la producción de su correspondiente hidrazona que fue medida espectrofotométricamente entre 350 y 390 nm para determinar concentración de carbonilos y a 280 nm para determinar concentración total de proteínas (Reznick and Packer, 1994). Los valores fueron expresados como nmol/mg de proteínas carboniladas.

5.3.3 Evaluación de las histologías.

Muestras montadas en portaobjetos fueron teñidas con hematoxilina-eosina para análisis histológicos y estructurales. Se analizaron cualitativamente, utilizando un score modificado de Ishak (Ishak y cols., 1995) donde se determinó el grado de inflamación, esteatosis y necrosis, asignándose los valores de 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) y 3 (severo) para cada grupo experimental a tiempos de 24 y 120 horas.

5.4 Evaluación de la función hepática.

5.4.1 Albúmina sérica.

La cuantificación de los niveles séricos de albúmina se realizó con kit ELISA Abcam, siguiendo las instrucciones del proveedor (ab108790 Albumin Rat ELISA Kit, Abcam, Cambridge, USA) para todos los grupos a 16 y 24 horas post HP. Los valores fueron expresados en mg/dL de albúmina en suero.

5.5 Evaluación de estado inflamatorio.

5.5.1 Niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias.

La extracción de mRNA y el RT-PCR fueron realizados según lo explicado en el punto 5.2.5. La cuantificación se realizó de acuerdo a la relación *IL-6/18s*, *TNF- α /18s*, según corresponda.

5.6 Análisis estadístico.

Los resultados fueron expresados como promedios \pm error estándar (SEM) para el número de animales por grupo experimental indicados en cada figura. La significancia estadística entre grupos experimentales se calculó por ANOVA unifactorial y la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls (GraphPad Software, California, EE.UU) con un límite de confianza de 5% ($p < 0,05$).

VI RESULTADOS

6.1 Evaluación de la proliferación hepática.

6.1.1 Curva de recuperación de masa hepática.

La tasa de recuperación de masa hepática, estimada como porcentaje peso del hígado/peso corporal del animal fue medida a las 16, 24, 72 y 120 horas después de la HP (fig.4). En condiciones controles, el hígado corresponde a un 3,8% del peso total del animal, relación indicada con línea punteada en la figura 4. Se observa un aumento continuo en la recuperación de la masa hepática a través de los días, para todos los grupos, el cual alcanzó niveles dentro del rango basal del hígado en relación al peso corporal del animal, luego de 120 horas post HP.

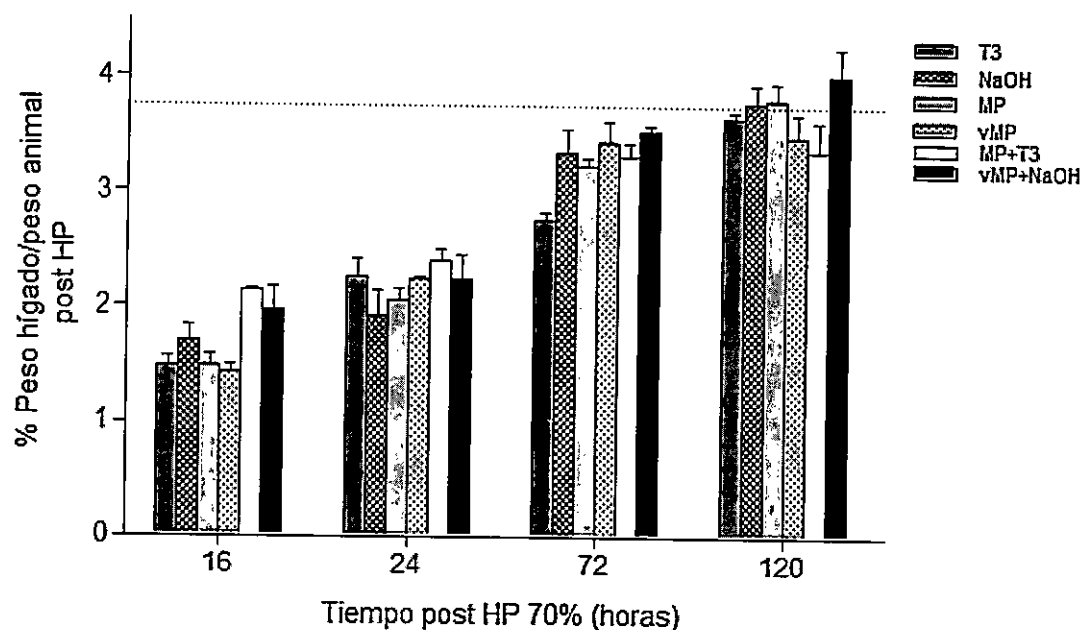


Figura 4. Curva de recuperación de masa hepática global en animales pretratados con PRHC. Cambios en la relación peso hígado/peso animal a 16, 24, 72 y 120 horas después de HP para todos los tratamientos. La línea punteada indica la relación peso hígado/peso animal normal. Cada barra representa el promedio \pm SEM (n=4).

En la figura 5 se muestra el detalle de la recuperación de masa hepática, de acuerdo al tiempo y grupo experimental. A las 16 horas post HP (fig. 5A), el grupo pretratado con MP+T₃ mostró un incremento significativo de la masa hepática ($2,135 \pm 0,019$ %) respecto a los otros grupos, mientras que a las 24 horas (fig. 5B) no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos. A las 72 horas post HP (fig. 5C), el grupo pretratado con T₃ ($2,758 \pm 0,063$ %) mostró un peso significativamente menor respecto a los otros grupos experimentales (MP, $3,435 \pm 0,180$ %; MP+T₃, $3,313 \pm 0,113$ %), mientras que a las 120 horas post HP (fig. 5D) el grupo MP+T₃ ($3,352 \pm 0,257$ %) fue significativamente menor respecto a su control ($4,023 \pm 0,243$ %).

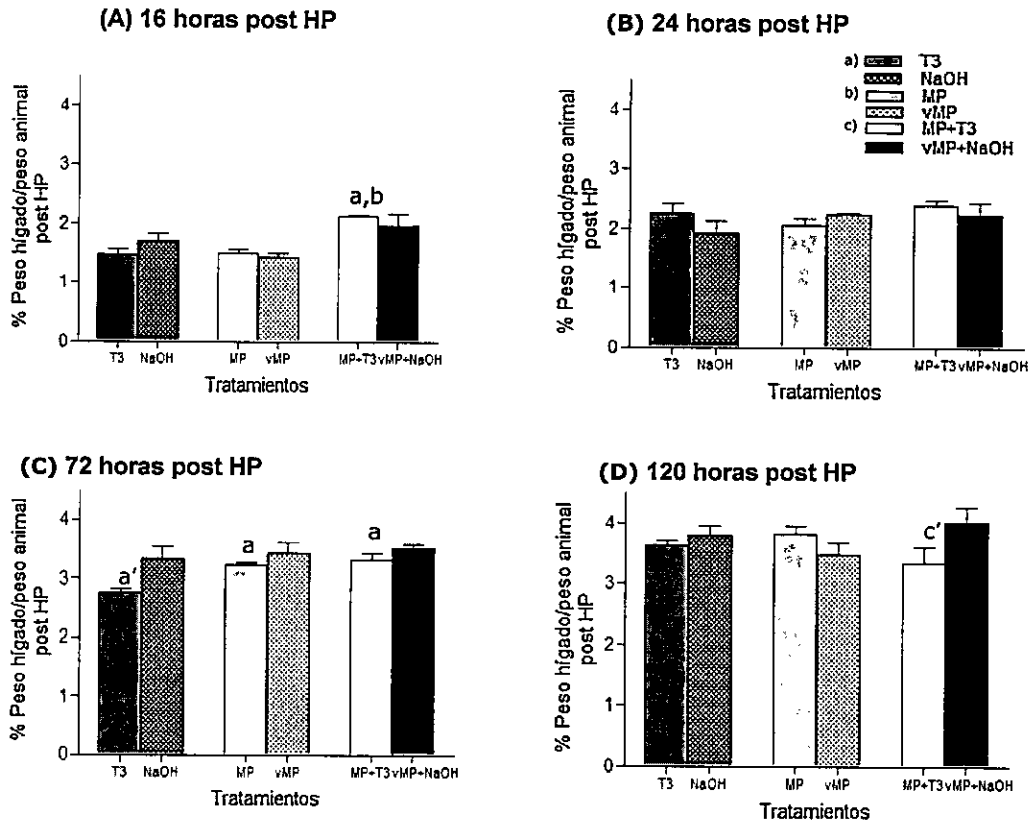


Figura 5. Curva de recuperación de masa hepática según tiempo en animales pretratados con PRHC. Barras muestran la relación peso hígado/peso animal después de HP, cada punto representa el promedio \pm SEM ($n=4$). Las letras y las letras primas sobre cada barra representan diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA Unifactorial y test de Newman Keuls) entre los grupos y el grupo con su control, respectivamente. **(A)** 16 horas post HP. **(B)** 24 horas post HP. **(C)** 72 horas post HP y **(D)** 120 horas post HP, completando la curva de recuperación de masa hepática.

6.1.2 Índice mitótico.

En la figura 6 se observan los cambios en el conteo de mitosis según tratamiento a 0, 16, 24 y 120 horas después de la HP. A tiempo 0 el grupo control NaOH mostró un aumento basal significativo ($0,575 \pm 0,103$ mitosis/campo) en el número de mitosis por campo respecto a T_3 ($0,025 \pm 0,025$ mitosis/campo). Los grupos MP ($1,475 \pm 0,144$ mitosis/campo) y MP+ T_3 ($1,375$

$\pm 0,266$ mitosis/campo) presentaron un máximo de figuras mitóticas a las 24 horas, mientras que en T_3 ($1,600 \pm 0,216$ mitosis/campo) fue a las 72 horas post HP. A 16 y 120 horas post HP no se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados; resultado que se repitió entre MP y MP+ T_3 a todos los tiempos estudiados.

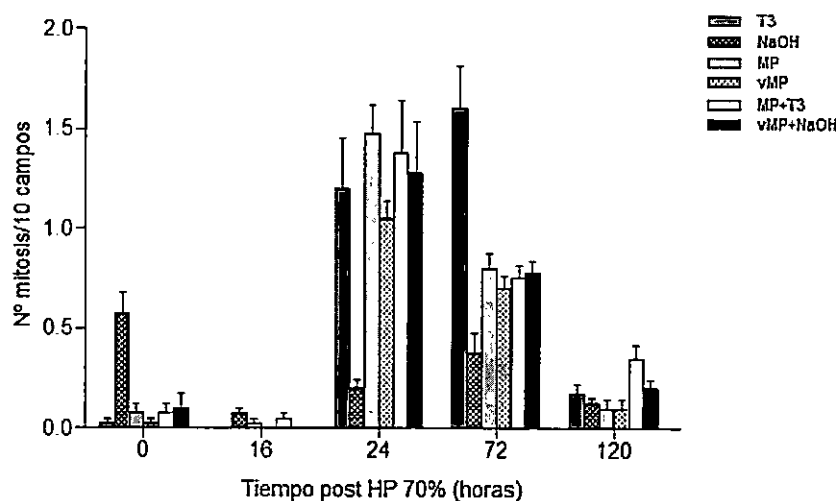


Figura 6. Curva global de conteo de mitosis a 0, 16, 24, 72 y 120 horas post HP en animales pretratados con PRHC. Cada barra representa el promedio \pm SEM ($n=4$) de mitosis contadas en al menos 10 campos a aumento máximo de 400x.

En la figura 7 se observa el detalle del recuento de mitosis para los tiempos 24 y 72 horas post HP. A las 24 horas post HP (fig. 7A) el grupo tratado con T_3 ($1,20 \pm 0,26$ mitosis/campo) presentó un aumento significativo en el número de mitosis por campo vs su control NaOH ($0,20 \pm 0,04$ mitosis/campo). A las 72 horas post HP (fig. 7B) el recuento mitótico para T_3 ($1,60 \pm 0,22$ mitosis/campo) fue significativamente mayor que MP ($0,80 \pm 0,07$ mitosis/campo) y MP+ T_3 ($0,75 \pm 0,07$ mitosis/campo).

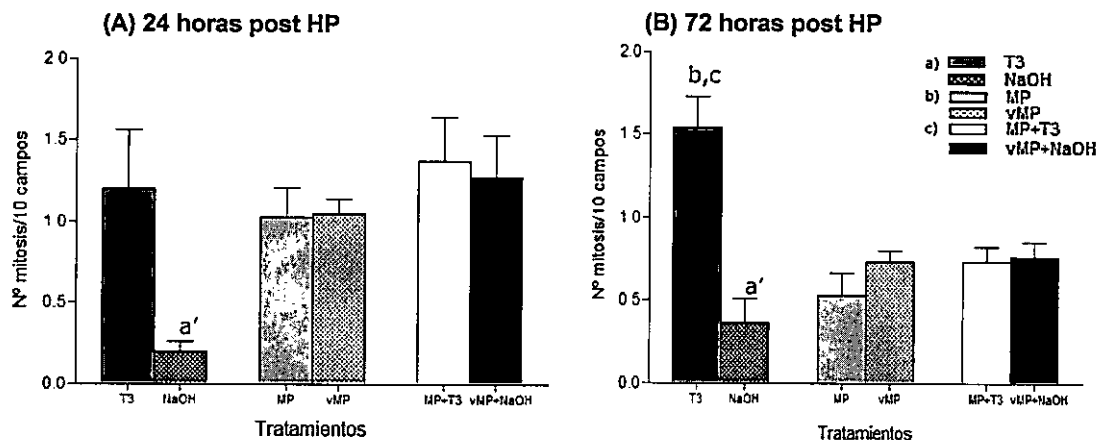


Figura 7. Conteo mitosis según tiempo en animales pretratados con PRHC. (A) 24 horas, (B) 72 horas post HP. Cada barra representa el promedio \pm SEM ($n=4$) de mitosis contadas en al menos 10 campos a aumento mayor de 400x. Las letras y las letras primas sobre cada barra representan diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA Unifactorial y test de Newman Keuls) entre los grupos y el grupo con su control, respectivamente.

6.1.3 Tinción inmunohistoquímica para Ki-67.

En la figura 8 se observan imágenes representativas de la tinción IHQ para Ki-67 según los grupos experimentales a 24, 72 y 120 horas post HP. A las 16 horas no se encontraron células positivas, por lo cual no se muestran fotografías representativas de este tiempo.

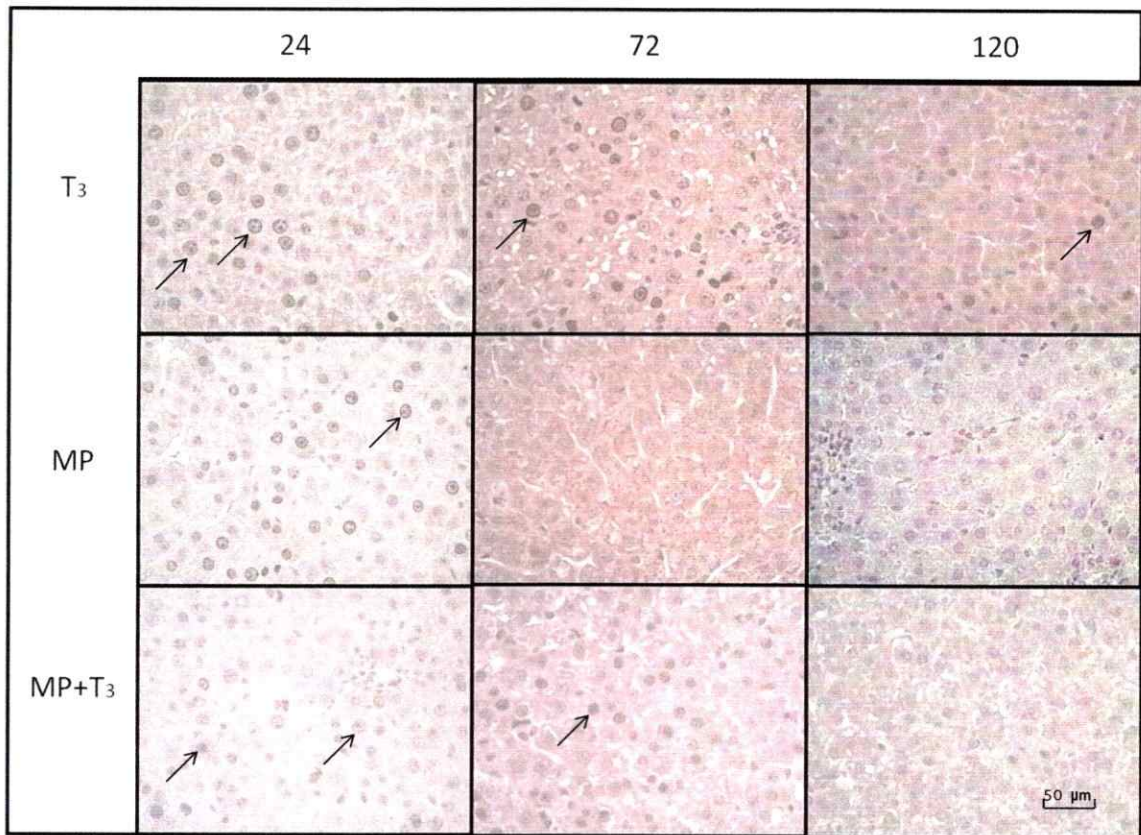


Figura 8. Panel de microfotografías representativas del conteo de células positivas para tinción IHQ para Ki-67 a 24, 72 y 120 horas post HP en animales pretratados con T₃, MP y MP+ T₃. Cada fotografía representa cortes histológicos para la tinción IHQ a aumento mayor de 400x. Las flechas indican núcleos positivos para la tinción IHQ para Ki-67.

En la figura 9 se observa la gráfica de las fotografías mostradas en la figura 8, con el recuento de los núcleos positivos para Ki67 contados en 10 campos de aumento mayor (CAM). A las 24 horas post HP se observó la mayor presencia de núcleos positivos en todos los grupos y sus controles; los valores de MP ($78,90 \pm 3,59$ células/campo) fueron significativamente mayor que T₃ ($44,08 \pm 3,80$ células/campo) y MP+T₃ ($59,00 \pm 10,01$ células/campo), mientras que sólo T₃ ($44,08 \pm 3,80$ células/campo) presentó cambios significativos respecto a su

control NaOH ($13,20 \pm 0,20$ células/campo). A 72 horas post HP los valores de T₃ ($33,22 \pm 7,37$ células/campo) son mayores que su control NaOH ($12,45 \pm 4,15$ células/campo) y que el grupo MP ($15,07 \pm 5,36$ células/campo). A 120 horas post HP se observó que los valores de MP+T₃ ($2,22 \pm 0,27$ células/campo) fueron significativos respecto a su control vMP+NaOH ($29,77 \pm 8,65$ células/campo), mientras que el grupo MP no presentó cambios respecto a su control a ninguno de los tiempos estudiados.

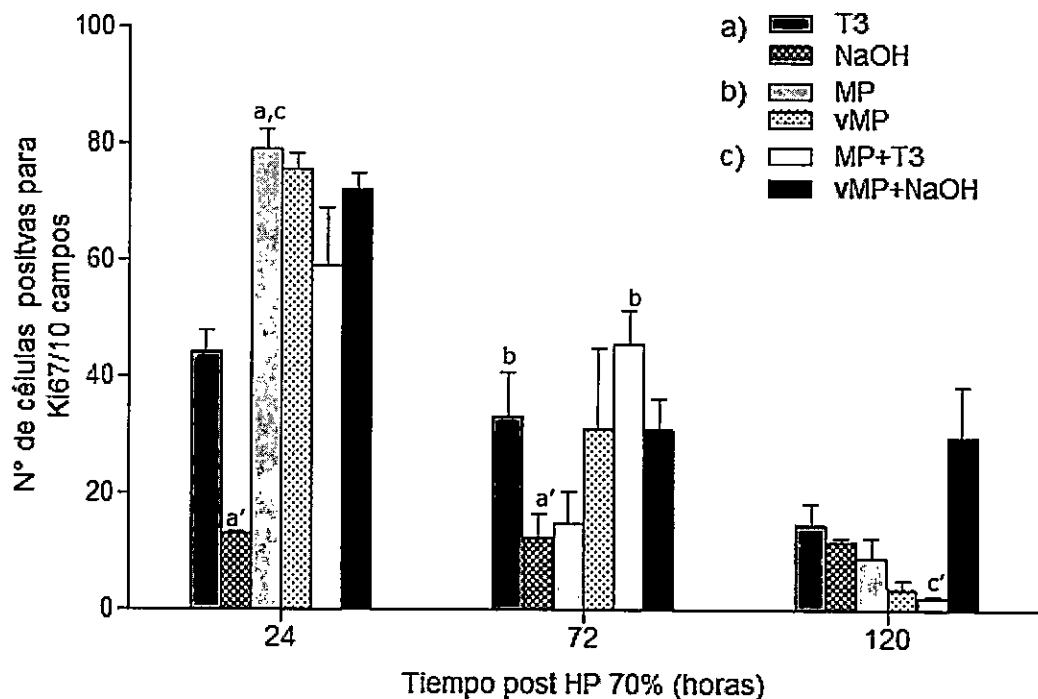


Figura 9. Curva global conteo de células positivas para tinción IHQ para Ki-67 a 24, 72 y 120 horas post HP en animales pretratados con PRHC. Cada barra representa el promedio \pm SEM ($n=4$) de células positivas para la tinción IHQ contadas en al menos 10 campos a aumento mayor de 40X. Las letras y letras primas sobre cada barra representan diferencias significativas ($p<0,05$, ANOVA Unifactorial y test de Newman Keuls) entre los grupos y el grupo con su control, respectivamente.

6.1.4 Área celular.

En la figura 10 se observan los cambios en el área celular según tratamiento a 0, 16, 24, 72 y 120 horas después de la HP. Se observa que en el grupo pretratado con T_3 el tamaño celular aumenta en proporción al tiempo post HP, siempre en valores mayores que su control NaOH, que muestra el mismo comportamiento. Las áreas observadas en el grupo MP ($648,39 \pm 6,09 \mu\text{m}^2$) muestran un máximo a las 24 horas post HP y luego retornan a los valores basales de tiempo 0; el control de MP (vMP) muestra tendencia a presentar células de mayor tamaño en todos los tiempos, lo que no fue estadísticamente significativo. El grupo pretratado con MP+ T_3 ($746,38 \pm 30,83 \mu\text{m}^2$) presenta un máximo de crecimiento celular a las 72 horas post HP, para disminuir a las 120 horas.

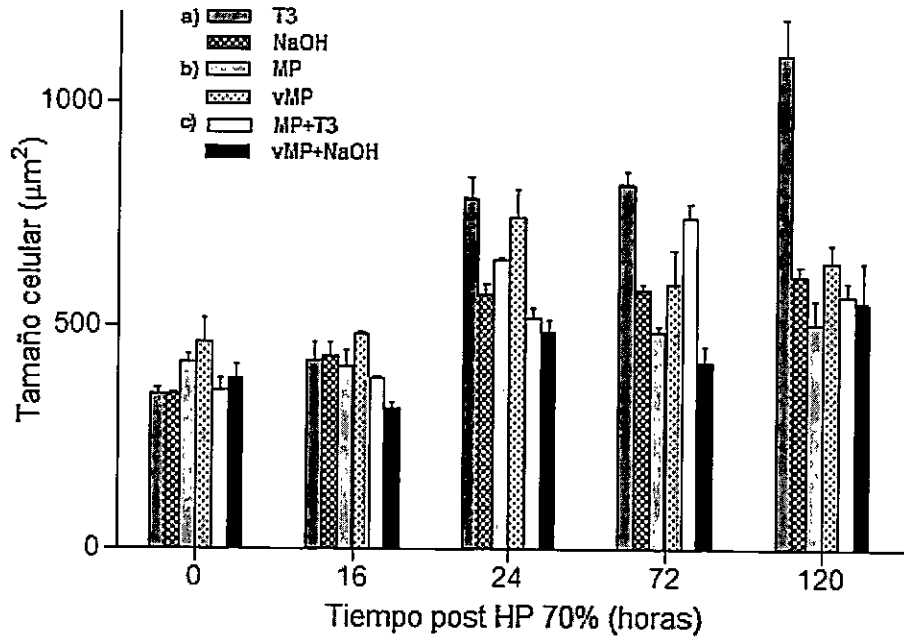


Figura 10. Curva global de variación de tamaño celular en animales pretratados con PRHC. Cada barra representa el promedio \pm SEM ($n=4$) de áreas celulares contadas en al menos 10 campos a aumento mayor de 400x.

A 0 y 16 horas post HP no se encontraron variaciones significativas entre los grupos ni sus controles. A 24 horas (fig. 11A) post HP se observó que T₃ ($787,85 \pm 47,24 \mu\text{m}^2$) presenta células de un tamaño significativamente mayor que su control NaOH ($572,25 \pm 25,06 \mu\text{m}^2$) y que el grupo pretratado con MP+T₃ ($517,77 \pm 24,06 \mu\text{m}^2$); resultado que se repitió en MP ($648,39 \pm 6,09 \mu\text{m}^2$) vs. MP+T₃ ($517,77 \pm 24,06 \mu\text{m}^2$). A 72 horas post HP (fig. 11B) los valores de T₃ ($819 \pm 27,38 \mu\text{m}^2$) continúan siendo significativamente mayores que su control NaOH ($580 \pm 13,36 \mu\text{m}^2$) y que MP ($489,26 \pm 13,53 \mu\text{m}^2$); el grupo MP+T₃ ($746,38 \pm 30,83 \mu\text{m}^2$) mostró valores significativamente mayores que su control ($419,49 \pm 37,40 \mu\text{m}^2$) y que MP ($489,26 \pm 13,53 \mu\text{m}^2$). A 120 horas post

HP (fig. 11C) T₃ (1108,35 ± 83,50 μm²) presentó valores mayores que su control (646,36 ± 39,27 μm²), MP (507,14 ± 53,82 μm²) y MP+T₃ (571,04 ± 28,91 μm²).

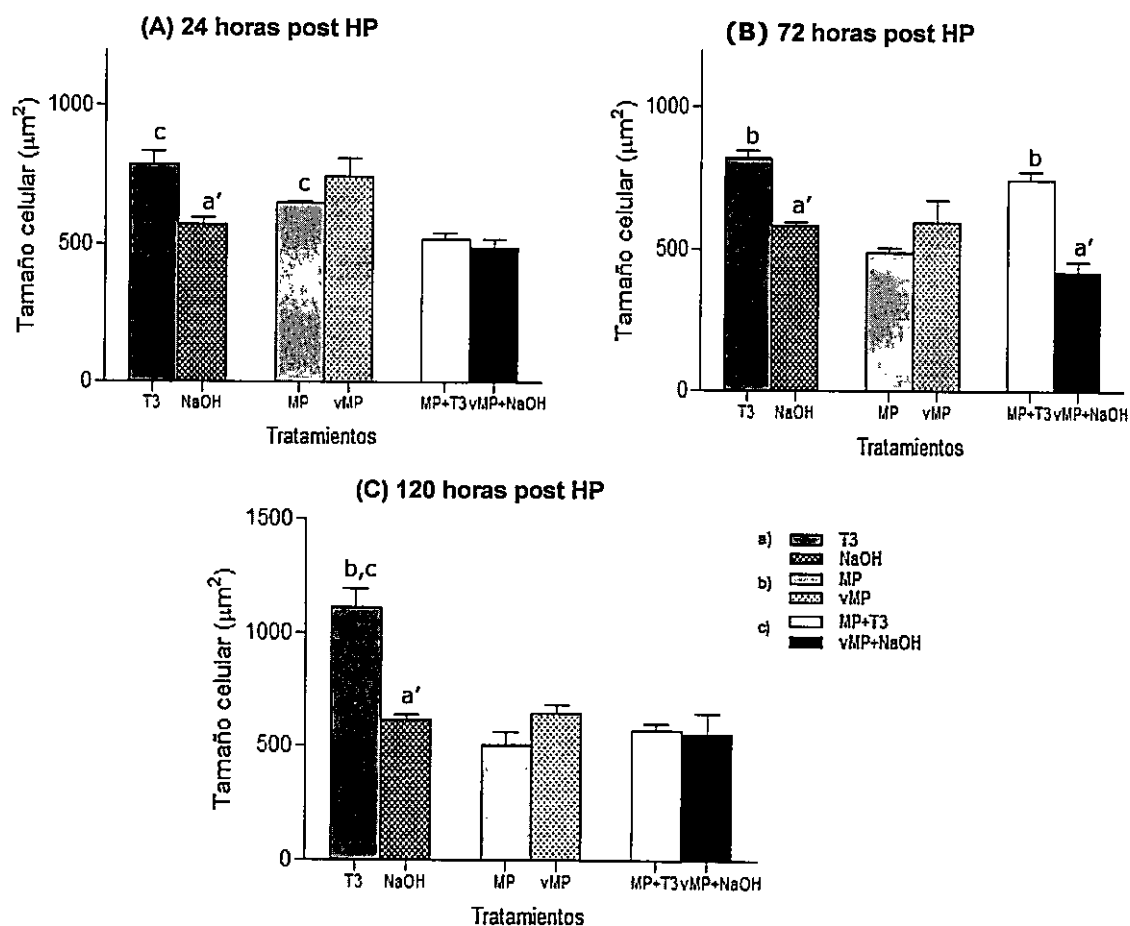
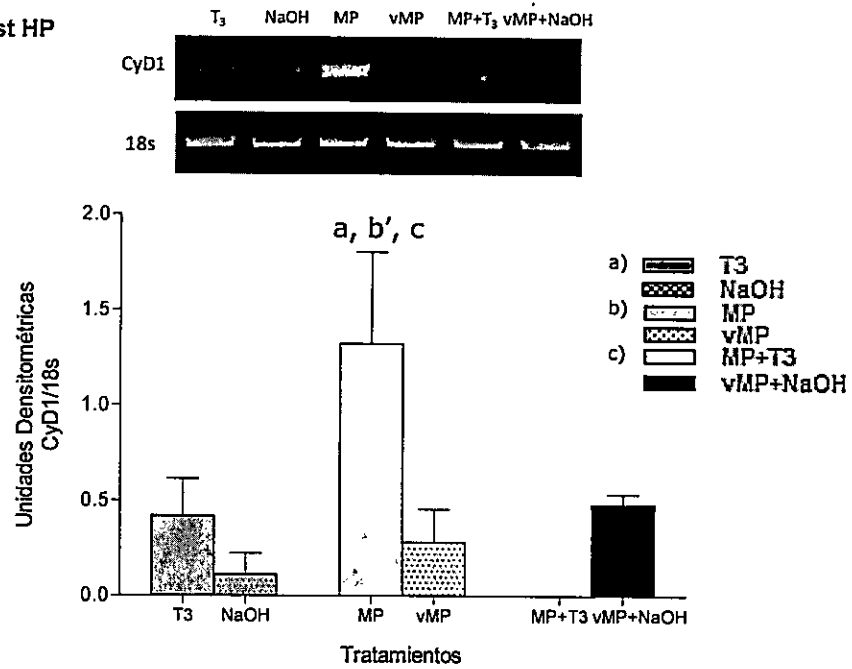


Figura 11. Variación de tamaño celular según tiempo en animales pretratados con PRHC. (A) 24, (B) 72, (C) 120 horas post HP. Cada barra representa el promedio ± SEM (n=4) de área celular medida en al menos 10 campos a aumento mayor de 40X. Las letras y las letras primas sobre cada barra representan diferencias significativas (p<0,05, ANOVA Unifactorial y test de Newman Keuls) entre los grupos y el grupo con su control, respectivamente.

6.1.5 Niveles de expresión de ciclina D1 (CyD1).

En la figura 12 se observan los niveles expresión de CyD1 como unidades densitométricas de *CyD1/18s* a las 16 y 24 horas post HP para cada grupo. 16 horas post HP (fig. 12A) el grupo MP ($1,3 \pm 0,48$ UD) presentó valores significativamente mayores en la expresión del mRNA de CyD1 respecto a su control vMP ($0,28 \pm 0,17$ UD) y respecto a los grupos T₃ ($0,42 \pm 0,19$ UD) y MP+T₃ ($0,00074 \pm 0,00054$ UD). A diferencia de lo observado a las 16 horas, en la figura 12B se observa que a 24 horas post HP no hay variaciones significativas en la expresión de CyD1 entre todos los grupos experimentales.

(A) 16 horas post HP



(B) 24 horas post HP

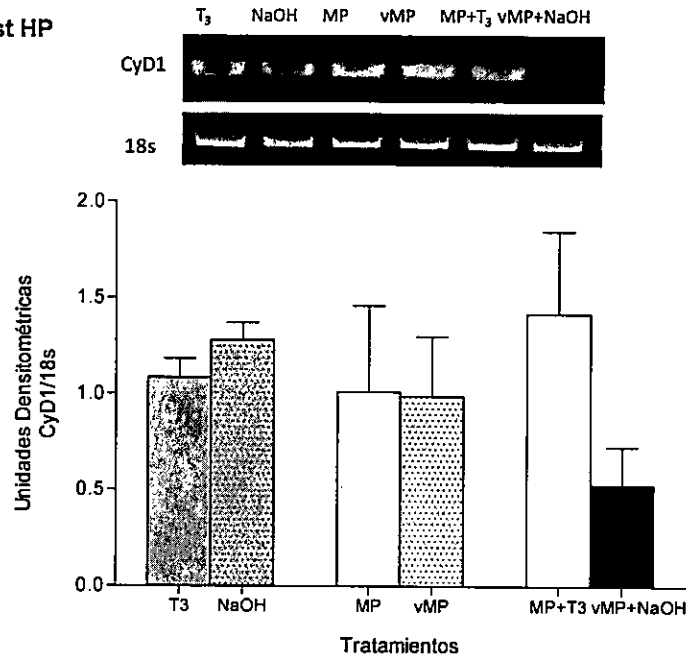
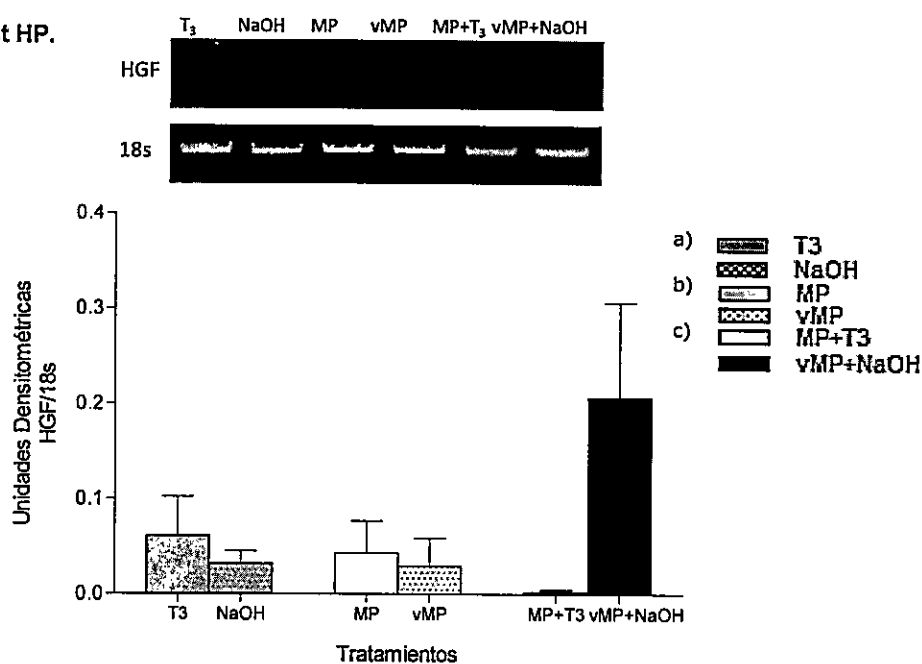


Figura 12. Niveles de expresión de CyD1 mediante RT-PCR a 16 y 24 horas post HP en animales pretratados con PRHC. Cada barra representa el promedio \pm SEM (n=4) de unidades densitométricas. (A) 16 horas post HP (B) 24 horas post HP. Las letras y las letras primas sobre cada barra representan diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA Unifactorial y test de Newman Keuls) entre los grupos y el grupo con su control, respectivamente.

6.1.6 Niveles de expresión de *HGF*.

En la figura 13 se observan los niveles expresión de *HGF* como unidades densitométricas de *HGF/18s* para cada grupo a las 16 y 24 horas post HP. No se encontraron variaciones significativas al comparar los niveles de mRNA de *HGF* entre los grupos T₃, MP y MP+T₃ ni con sus respectivos controles a 16 (T₃, $0,062 \pm 0,041$ UD; MP, $0,43 \pm 0,034$ UD; MP+T₃, $0,022 \pm 0,0021$ UD) (fig. 13 A) y a 24 horas (T₃, $0,16 \pm 0,024$ UD; MP, $0,15 \pm 0,036$ UD; MP+T₃, $0,035 \pm 0,0052$ UD) (fig. 13B) post HP.

(A) 16 horas post HP.



(B) 24 horas post HP.

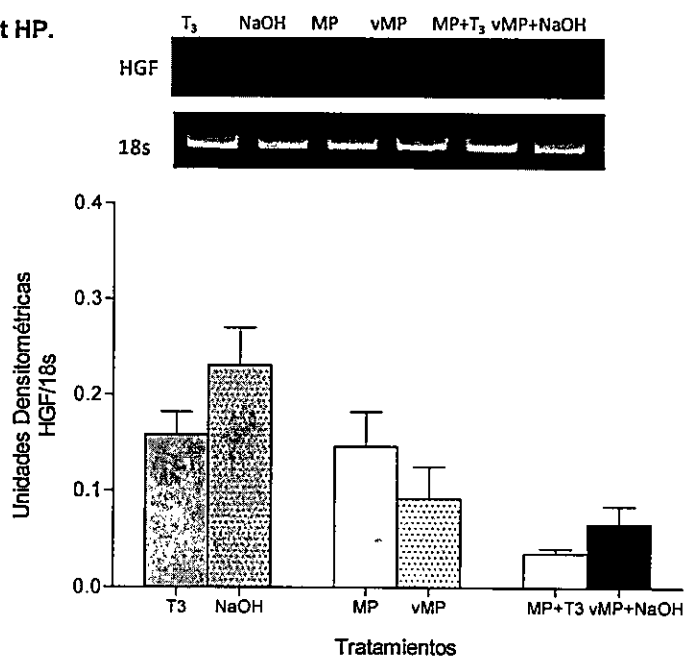


Figura 13. Niveles de expresión de *HGF* mediante RT-PCR a 16 y 24 horas post HP en animales pretratados con PRHC. Cada barra representa el promedio \pm SEM ($n=4$) de unidades densitométricas. (A) 16 horas post HP (B) 24 horas post HP. Las letras primas sobre cada barra representan diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA Unifactorial y test de Newman Keuls) entre los grupos y el grupo con su control, respectivamente.

6.2 Evaluación del daño hepático.

6.2.1 Actividad de transaminasas séricas GOT y GPT.

En las figuras 14 y 15 se observan los niveles de actividad sérica de GPT (glutámico pirúvico transaminasa) y GOT (glutámico oxaloacética transaminasa) post HP. A tiempo 0 los niveles de transaminasas fueron normales aumentando significativamente a las 16 y 24 horas post HP y retornando a valores basales a tiempos posteriores. T₃ y MP mostraron un aumento significativo en las actividades de GPT (fig. 14A) y GOT (fig. 15) desde 16 a 24 horas, a diferencia de MP+T₃ que mostró niveles menores en la actividad de GOT a los mismos tiempos, disminución que, sin embargo, no fue estadísticamente significativa en relación a su control. A las 16 horas post HP, los valores de GPT sérica presentados por T₃ ($66,63 \pm 21,48$ U/L) fueron significativamente menores respecto a su control NaOH ($368,13 \pm 33,17$ U/L) (fig. 14B), mientras que las 24 horas post HP, el grupo experimental pretratado con MP±T₃ ($247 \pm 20,65$ U/L) tuvo niveles de transaminasas menores que los grupos pretratados con T₃ ($536,97 \pm 106,17$ U/L) y MP ($344,95 \pm 29,31$ U/L) (fig. 14C).

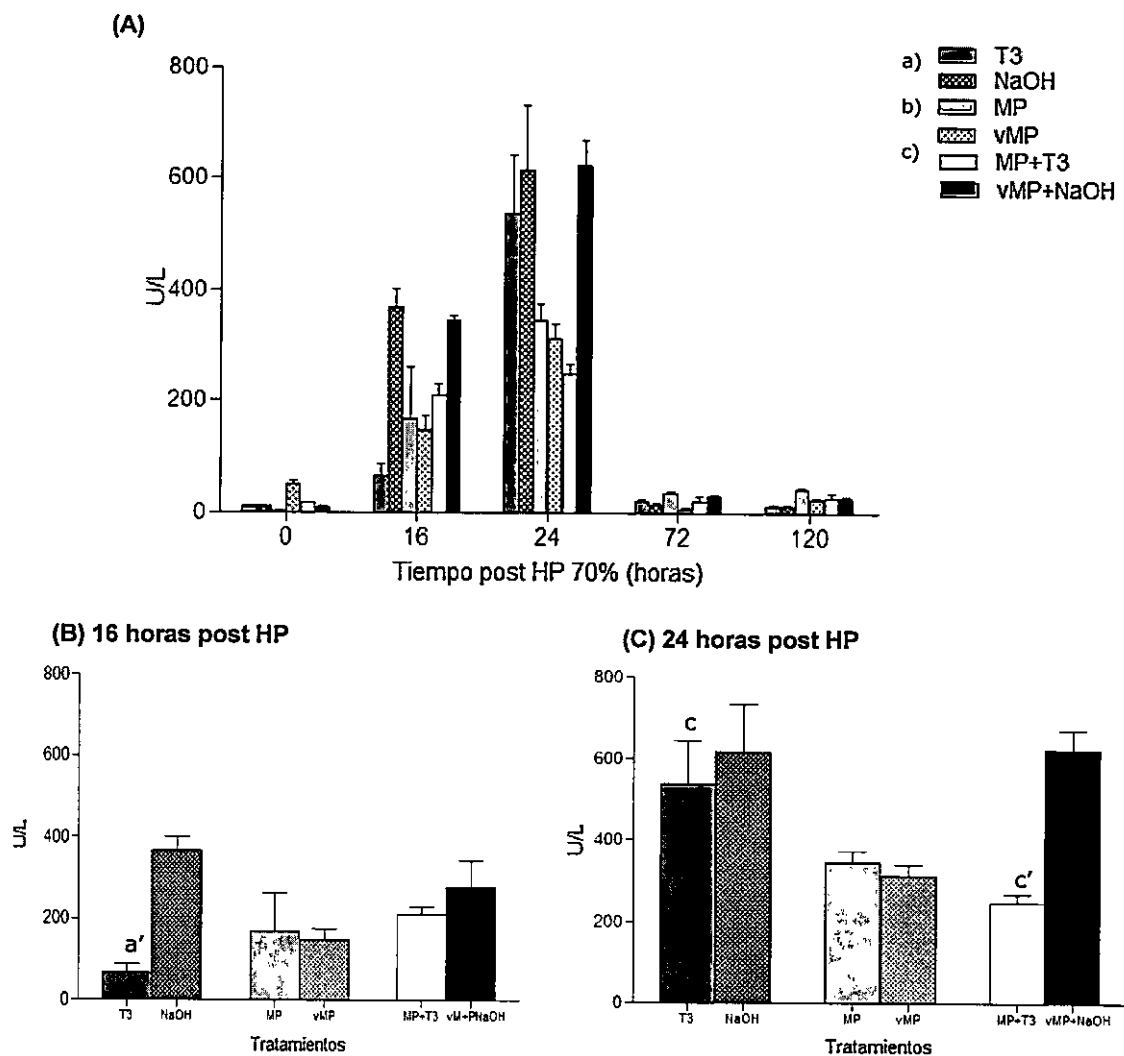


Figura 14. Actividad sérica de la transaminasa GPT en animales pretratados con PRHC. (A) Cambios globales en los niveles de GPT sérica después de HP a 0, 16, 24, 72 y 120 horas. (B) Detalle 16 horas post HP. (C) Detalle 24 horas post HP. Cada barra representa el promedio \pm SEM ($n=4$). Las letras y las letras primas sobre cada barra representan diferencias significativas entre los grupos y el grupo con su control, respectivamente ($p<0,05$, ANOVA Unifactorial y test de Newman Keuls).

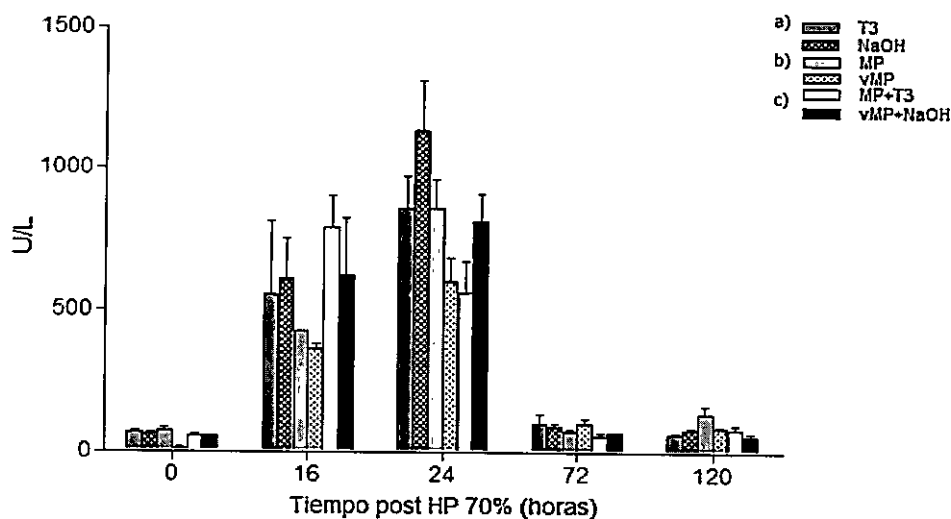


Figura 15. Actividad sérica de la transaminasa GOT en animales pretratados con PRHC. Cambios globales en los niveles de GOT sérica después de HP a 0, 16, 24, 72 y 120 horas. Cada barra representa el promedio \pm SEM ($n=4$).

6.2.2 Contenido total de proteínas oxidadas.

En la figura 16 se muestran los valores totales de proteínas oxidadas para animales pretratados con PRHC a 16 y 24 horas post HP. A 16 horas se observan valores máximos de oxidación de proteínas, con excepción del grupo pretratado con NaOH que no difirió entre las 16 y 24 horas post HP. Además, a las 16 horas post HP (fig. 16A) sólo el grupo experimental MP+T₃ ($7,56 \pm 0,79$ nmoles carbonilo/mg proteína) varió significativamente respecto a su control vMP+NaOH ($13,69 \pm 0,85$ nmoles carbonilo/mg proteína); resultado que se repitió a las 24 horas (fig. 16B) para el grupo pretatado con T₃ ($2,48 \pm 0,61$ nmoles carbonilo/mg proteína) vs. NaOH ($10,79 \pm 1,23$ nmoles carbonilo/mg proteína).

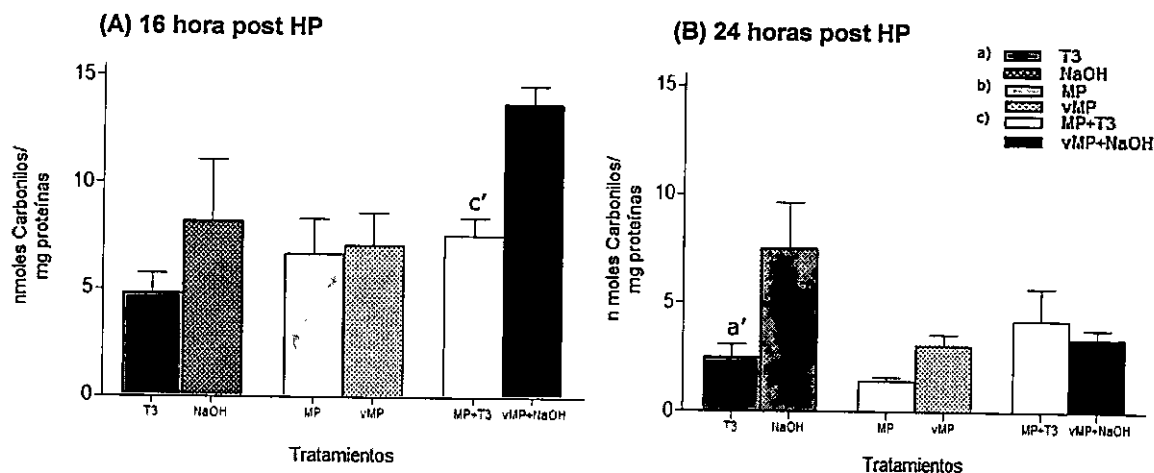


Figura 16. Contenido total de proteínas oxidadas en animales pretratados con PRHC. (A) Contenido total de proteínas carboniladas a 16 horas post HP. **(B)** Contenido total de proteínas carboniladas a 24 horas post HP. Cada barra representa el promedio \pm SEM ($n=4$). Las letras y letras primas sobre cada barra representan diferencias significativas entre los grupos experimentales y entre el grupo y su control respectivamente ($p < 0,05$, ANOVA Unifactorial y test de Newman Keuls).

6.2.3 Evaluación histológica.

Se evaluaron 3-4 cortes histológicos por grupo experimental a 24 y 120 horas post HP para analizar arquitectura hepática y confeccionar el score de daño, inflamación y esteatosis (tabla 3). En las figuras 17 y 19 se observan imágenes representativas de las histologías para todos los grupos a 24 y 120 horas post HP, a aumento de 100x y el detalle a aumento mayor de 400x, respectivamente. En el aumento mayor, además, se observan mitosis aisladas cuantificadas en la sección 1.2.

Tabla 3. Score de necrosis, inflamación y esteatosis modificado de Ishak.

Horas de Regeneración	Tratamiento	Necrosis	Inflamación	Esteatosis
24	T ₃	0	1	1,3
	NaOH	2	1,5	1
	MP	0	0	1
	vMP	1	0,2	0 a 1
	MP+T ₃	1	0,25	1
	vMP+NaOH	1,25	1	0,25
120	T ₃	0	0	0
	NaOH	0	0	0
	MP	0	0	1
	vMP	0,5	0	0
	MP+T ₃	0	0	0
	vMP+NaOH	1,25	1	0,25

Los valores obtenidos corresponden al análisis promedio de 3-4 placas histológicas. Valores de referencia: 0=ausente, 1=leve, 2=moderado, 3=severo.

En la tabla 3 se observa un score (modificado de Ishak y cols., 1995) promedio obtenido por cada grupo respecto a los parámetros de inflamación, necrosis y esteatosis al observar bajo microscopio óptico un 3-4 placas histológicas en aumento mayor de 400x.

A 24 horas post HP (fig. 17) en todos los grupos se observa arquitectura hepática conservada, con presencia de espacios porta y vena central de calibres y características normales y hepatocitos con disposición en cordones. El grupo pretratado con T₃ presenta microfocos de necrosis y esteatosis microvesicular; su control NaOH presentó presencia de infiltrado inflamatorio

leve a moderada, necrosis moderada y el mismo grado de esteatosis que T_3 (tabla 3). En el grupo pretratado con MP no se observó focos de necrosis ni inflamación, constatándose presencia de anisocitosis y anisocariosis en los hepatocitos, junto a esteatosis microvesicular y leve; en el control vMP se observó focos necróticos y neutrófilos aislados (microfocos de inflamación) y un grado menor de esteatosis. El grupo pretratado con $MP+T_3$, presentó microfocos de necrosis, esteatosis microvesicular leve de predominio periportal; su control, vMP+NaOH, presentó multifocos aislados de necrosis, inflamación leve, anisocariosis y anisocitosis sin presencia de esteatosis.

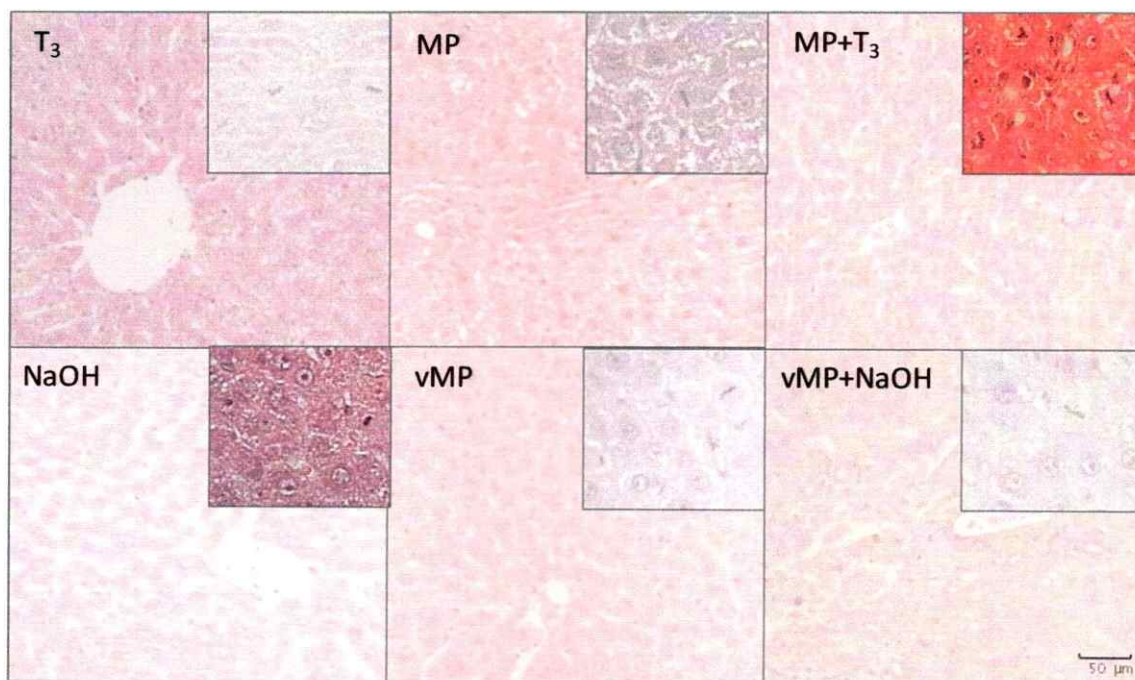


Figura 17. Fotografías representativas de cortes histológicos de hígados de animales pretratados con PRHC a 24 horas post HP. Fotografías principales obtenidas a aumento de 100x; detalles obtenidos a aumento mayor de 400x; tinción hematoxilina-eosina.

A 120 horas post HP (fig. 18) no se observa esteatosis ni inflamación en ninguno de los grupos (tabla 3). En el grupo pretratado con T_3 se observó áreas pericentrales con organización conservada y desorganización periportal al igual que NaOH, grupo que mostró mayor presencia de glóbulos rojos en los sinusoides. En el grupo NaOH se observó presencia de polimorfonucleares dentro de los vasos. El grupo pretratado con MP presentó desorganización en el las zonas 2 y 3 del acino hepático, mostrando una estructura menos organizada que su control vMP (que además, mostró reorganización de la estructura sinusoidal retrasada respecto a NaOH). El grupo pretratado con MP+ T_3 presentó arquitectura normal, con presencia de algunos hepatocitos con citoplasma vesiculoso; su control, vMP+NaOH sólo conservó la organización de la zona 1 del acino.

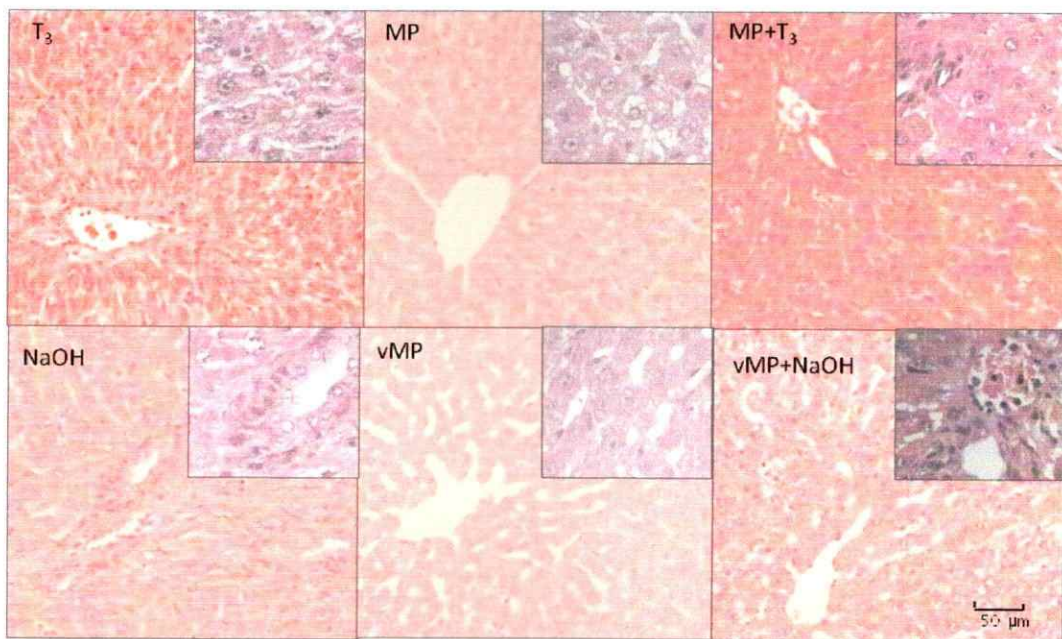


Figura 18. Fotografías representativas de cortes histológicos de hígados de animales pretratados con PRHC a 120 horas post HP. Fotografías principales obtenidas a aumento de 100x; detalles obtenidos a aumento mayor de 400x; tinción hematoxilina-eosina.

6.3. Evaluación de la función hepática.

6.3.1 Niveles de albúmina sérica.

En la fig. 19 se indican los cambios en la concentración de albúmina sérica. Todos los grupos analizados a 16 y 24 horas post HP obtuvieron valores dentro del rango normal de 3,8-4,8 g/dL de albúmina en suero.

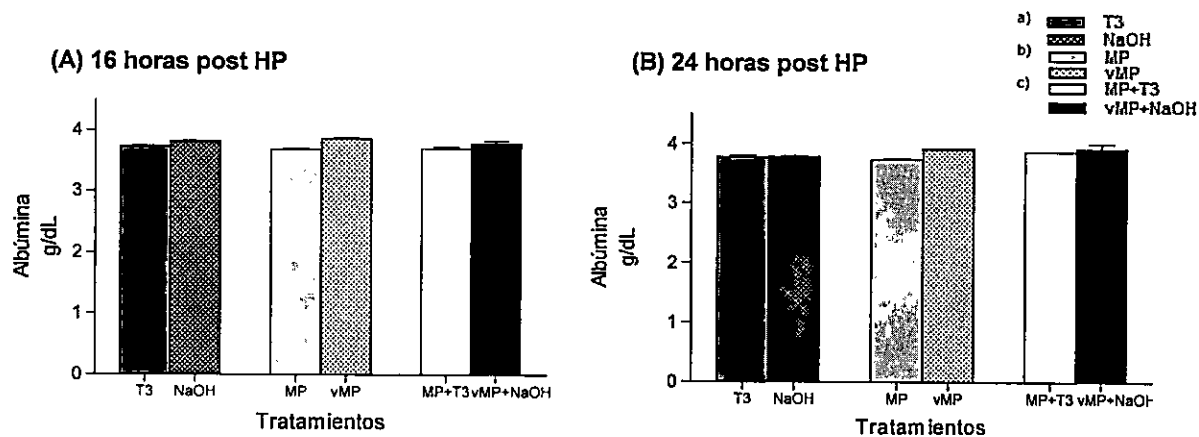


Figura 19. Cambios en niveles de albúmina sérica después de HP en animales pretratados con PRHC. (A) 16 horas post HP. (B) 24 horas post HP. Cada barra representa el promedio \pm SEM ($n=4$).

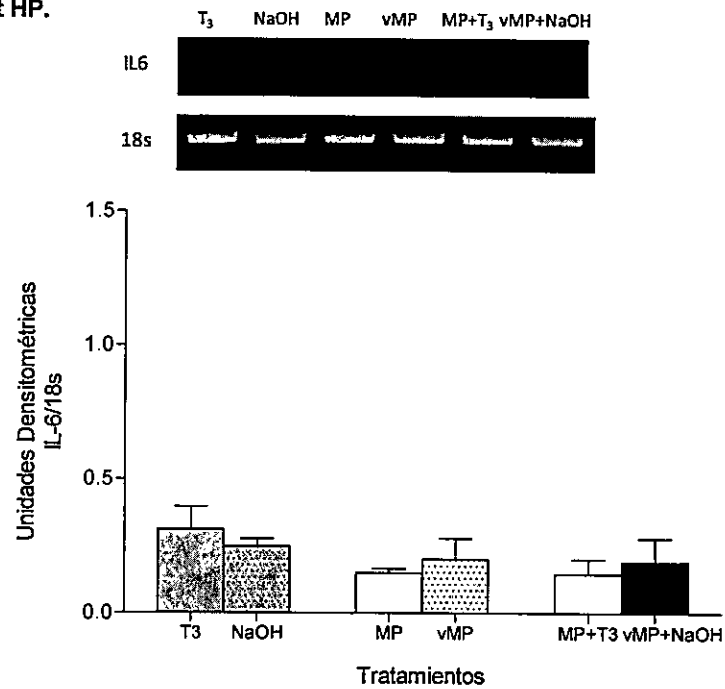
6.4 Evaluación del estado inflamatorio.

6.4.1 Niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias.

6.4.1.1 Niveles de expresión del mRNA de *IL-6*.

En la figura 20 se observan los niveles expresión de *IL-6* como unidades densitométricas de *IL-6/18s* a 16 y 24 horas post HP para cada grupo. Tanto a 16 (T_3 , $0,31 \pm 0,085$ UD; MP, $0,15 \pm 0,015$ UD; MP+ T_3 , $0,15 \pm 0,056$ UD) (fig. 20A), como a 24 horas post HP (T_3 , $0,51 \pm 0,039$ UD; MP, $0,63 \pm 0,063$ UD; MP+ T_3 , $1,1 \pm 0,36$ UD) (fig. 20B) no se observaron variaciones significativas entre los grupos MP, T_3 y MP+ T_3 ni entre éstos y sus respectivos controles.

(A) 16 horas post HP.



(B) 24 horas post HP.

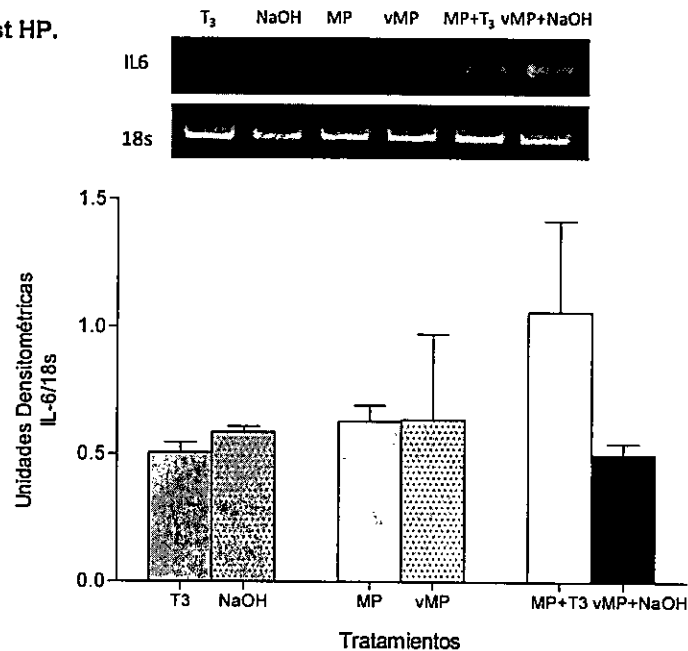


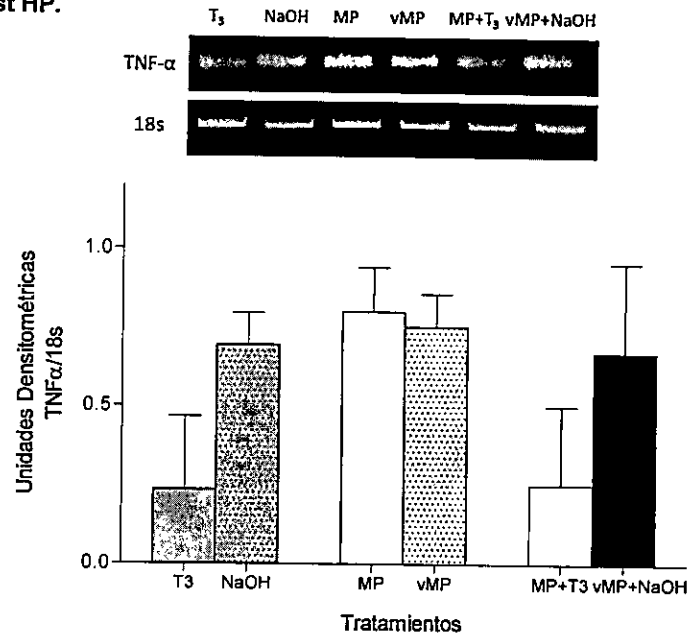
Figura 20. Niveles de expresión de *IL-6* mediante RT-PCR a 16 y 24 horas post HP en animales pretratados con PRHC. Cada barra representa el promedio \pm SEM (n=4) de unidades densitométricas. (A) 16 horas post HP (B) 24 horas post HP. Las letras y las letras primas sobre cada barra representan diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA Unifactorial y test de Newman Keuls) entre los grupos y el grupo con su control, respectivamente.

6.4.1.2 Niveles de expresión del mRNA de *TNF- α* .

En la figura 21 se observan los niveles expresión de *TNF- α* como unidades densitométricas de *TNF- α /18s* a 16 y 24 horas post HP para cada grupo.

Se observa (fig. 21A) que al analizar los niveles de expresión de todos los grupos a 16 horas, no se encontraron variaciones significativas. Sin embargo, a 24 horas (fig. 21B) se encontró que el grupo combinado de MP+T₃ (0,23 \pm 0,098 UD) presentó valores significativamente menores en los niveles de expresión del mRNA de TNF α que T₃ (0,8 \pm 0,044 UD) y MP (0,65 \pm 0,24 UD) por separado. Por otro lado, MP presentó diferencias con su control, vMP (0,15 \pm 0,033 UD).

(A) 16 horas post HP.



(B) 24 horas post HP.

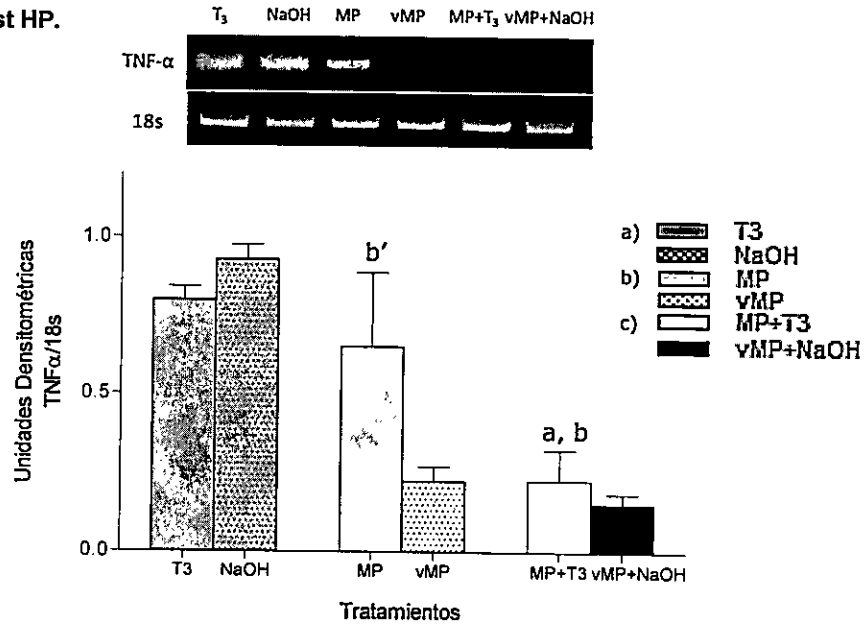


Figura 21. Niveles de expresión de *TNF- α* mediante RT-PCR a 16 y 24 horas post HP en animales pretratados con PRHC. Cada barra representa el promedio \pm SEM (n=4) de unidades densitométricas. (A) 16 horas post HP, (B) 24 horas post HP. Las letras y las letras primas sobre cada barra representan diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA Unifactorial y test de Newman Keuls) entre los grupos y el grupo con su control, respectivamente.

VII DISCUSION

La regeneración hepática es un proceso complejo asociado a factores de crecimiento, citoquinas y hormonas, que involucra no solo a los hepatocitos, sino a todos los tipos celulares hepáticos. En el ser humano es indispensable una rápida y exitosa regeneración del hígado en casos de resecciones hepáticas mayores, debido a la presencia de tumores hepáticos primarios o metástasis, posterior al daño hepatocelular de diversas causas y durante el trasplante del órgano, tanto para permitir la regeneración de células dañadas durante el proceso de procuramiento y preservación, como para evitar el síndrome de 'pequeño para su tamaño' (small for size) en caso de trasplante con donante vivo. Es importante garantizar que los tratamientos aplicados al donante no incidan en la capacidad de regeneración del hígado. Más aún, el control sobre el proceso podría reducir la morbilidad de los individuos en situaciones de donantes vivos, acelerando la recuperación del injerto.

El protocolo de resucitación hormonal fue desarrollado por la necesidad de atenuar los efectos deletéreos provocados en el organismo por el proceso de muerte cerebral, que es la condición de la mayoría de los donantes de órganos. La utilización de esteroides y hormonas tiroideas, inicialmente, apuntó a la mantención de la homeostasis hemodinámica y el flujo sanguíneo a los distintos órganos, lo que permite mantener la calidad de los tejidos y de esta manera

aumentar el número de órganos que se pueden recuperar en el procuramiento, disminuyendo el daño asociado al proceso y optimizando la funcionalidad de éstos en el receptor.

Considerando que el uso de la combinación de MP y T_3 en clínica está aprobado en algunos países, pero restringido en otros, en parte por el potencial efecto deletéreo sobre algunos órganos, esta tesis evaluó el efecto de la administración combinada de hormona tiroidea y metilprednisolona sobre la regeneración, recuperación y funcionalidad del hígado posterior a una hepatectomía parcial del 70%.

i) Pre-tratamiento con T_3 .

En pacientes con muerte cerebral la administración de T_3 permite la recuperación del estado eutiroideo, que se pierde en relación a la muerte cerebral y el cese de los mecanismos de control del eje neuroendocrino, pero también deben ser considerados los efectos órgano-específico de esta hormona al ser administrada exógenamente. En estudios anteriores se demostró que en la rata la utilización de una dosis de 0,1 mg/Kg de T_3 precondiciona al hígado frente al daño por isquemia-reperfusión (Fernández y cols., 2008), evento que está presente en el proceso de trasplante hepático. En otro estudio, se demostró que el uso de una dosis menor (0,05 mg/Kg) junto con la aplicación de ácidos grasos esenciales, reproducía el efecto precondicionante de una

dosis mayor de T_3 (Mardones y cols., 2011). Respecto a la regeneración, T_3 es un reconocido mitógeno hepático directo, que a tiempos tempranos actuaría acelerando la regeneración vía aumento de la expresión de CyD1 mediada por la unión de la hormona a su receptor nuclear $TR\beta$ (Kowalik y cols., 2010) y no por las vías clásicas post HP. Otros estudios (Fernández y cols., 2007) han demostrado que la aplicación de T_3 desencadena la proliferación celular a través de cascadas asociadas a la generación de $TNF-\alpha$ dependiente de las células de Küpffer, fosforilación de JNK y activación de AP-1, después de 60 horas post aplicación de la hormona. Esta evidencia apunta a que la HP y T_3 estimulan la síntesis de DNA por diferentes vías que finalmente convergen (Pibiri y cols., 2001). Por otro lado, en investigaciones anteriores (Malik y cols., 2003) se encontró que animales pretratados con T_3 y sometidos a HP presentaron un efecto sinérgico en la entrada al ciclo celular respecto a grupos tratados sólo con T_3 o sólo con HP, reflejado en el aumento del recuento de células positivas para bromo desoxiuridina. Esta alta tasa de proliferación, sin embargo, no estuvo asociada a aumento de masa a las 24 horas post HP, pero sí 4 días después de la cirugía. Los resultados obtenidos con la aplicación de 0,05 mg/Kg de T_3 , consistentes en un aumento en el recuento de mitosis (fig. 6) y células positivas para Ki-67 (fig. 9), sin aumento en masa hepática (fig. 4), coinciden con lo informado en la literatura.

Respecto a la expresión de CyD1, se esperaba observar un aumento en el grupo T₃ vs. su control a 24 horas post HP, según lo observado por Columbano y cols. (2007). La ausencia de diferencias observadas respecto a la expresión de esta ciclina y al aumento de peso hepático a tiempos posteriores, podría deberse a que la dosis utilizada en este estudio (0,05 mg/Kg) es veinte veces inferior a la utilizada en la literatura por otros autores (Malik y cols., 2003), probablemente por un efecto dosis dependiente. Los niveles de expresión de TNF- α , IL-6 y HGF no permiten obtener conclusiones respecto a su participación en la proliferación modulada por T₃ debido a que la activación de estos genes para desencadenar el ciclo proliferativo ocurre a tiempos tempranos de entre 60 minutos y 8 horas post HP (Mangall y cols., 2003). T₃ es parte de una familia de mitógenos primarios que inducen proliferación de los hepatocitos vía hiperplasia directa, que no involucra pérdida de masa celular (Columbano y Shinozuka, 1996). La mayoría de estos mitógenos actúan vía receptores nucleares en ausencia de cambios tempranos en la activación de NF- κ B, STAT3, aumento en la expresión de genes inmediatamente tempranos (priming) ni en la liberación de TNF- α o IL-6, cambios considerados fundamentales en la regeneración hepática después de la HP (Ledda-Columbano y cols., 2000). Por otro lado, es conocido que T₃ produce hipertrofia en los hepatocitos (Sola y cols., 1991), por lo que este factor debe considerarse dentro del aumento de masa hepática. Estas observaciones son consistentes con lo obtenido en los animales pretratados con T₃ (fig. 10) que presentaron

hepatocitos de hasta un doble del tamaño, con disminución de la relación núcleo/citoplasma, respecto de lo observado en otros grupos, aún luego de recuperar la masa hepática adecuada para el organismo.

El daño esperado al realizar la HP se observó en la medición de la actividad de las transaminasas séricas GPT y GOT a 16 y 24 horas post HP, para disminuir a tiempos posteriores (fig. 14 y 15). En otros trabajos (Tapia y cols., 2003) se ha demostrado que T_3 produce una respuesta calorigénica y de estrés oxidativo hepático moderado que sería el mecanismo responsable de su acción precondicionante frente a daño por isquemia y reperfusión (Fernández y cols., 2008), disminuyendo en un 91% el contenido total de proteínas oxidadas al pre-tratar con T_3 . En la medición de proteínas oxidadas totales, se observó que el grupo pretratado con T_3 presentó valores de proteínas carboniladas menores vs. su control a ambos tiempos evaluados (16 y a 24 horas post HP, fig. 16), coincidiendo con trabajos anteriores.

Las histologías reafirman que el pretratamiento con T_3 disminuye el grado de inflamación y necrosis, y generó un grado mayor de esteatosis transitoria, respecto a su control NaOH (tabla 3). La acumulación transitoria de lípidos en los hepatocitos es una característica temprana y necesaria de la regeneración después de la HP en roedores, y podría estar relacionada con la fuente de energía que sustenta la proliferación (Rudnick y Davidson, 2012). Al no observarse cambios necro-inflamatorios importantes en las secciones histológicas estudiadas (fig. 17), se puede establecer que el efecto mitogénico

de T_3 es efectivamente por hiperplasia directa y no por daño hepático, lo que coincide con lo comunicado en la literatura (Malik y cols., 2003). Respecto a la alta presencia de figuras mitóticas en los grupos controles NaOH a tiempo cero (fig. 6) se ha encontrado (Diehl y Rai, 1996) que si bien la actividad proliferativa de hepatocitos adultos generalmente es baja, se puede observar replicación de hepatocitos en el hígado adulto sano.

ii) Pre-tratamiento con MP.

Los análogos farmacológicos de los corticoides, hormonas endógenas producidas por la glándula suprarrenal, entre los cuales se cuentan cortisona, prednisona y MP, actúan imitando las acciones del cortisol. Solu-Medrol® es la presentación comercial de la metilprednisolona succinato utilizada en este estudio. MP es utilizado clínicamente por su acción antiinflamatoria e inmunosupresora (Buttgereit y cols., 1999). Como todos los glucocorticoides, MP tiene efectos a nivel genómico, no-genómico específico y no-genómico inespecífico, y se ha demostrado que a bajas dosis MP tendría predominantemente efectos genómicos. Adicionalmente, se ha demostrado que la administración de altas dosis de esta droga (30 mg/Kg) tienen efecto neuroprotector y antiapoptótico, inhibiendo la lipoperoxidación (Hall, 1992) y la actividad de las caspasas (Lin y cols., 2012).

Tsukamoto y Kojo (1989) reportaron que la aplicación de dosis altas de glucocorticoides previo a la HP disminuye la proliferación de los hepatocitos vía

prevención del aumento de la actividad de enzimas participantes de la síntesis de DNA. Años después, Fujioka y cols. (2001) estudiaron los efectos de MP sobre la cinética de las citoquinas y la función hepática en ratas sometidas a HP, encontrando que la aplicación de una dosis baja de 3 mg/Kg de MP previa a la HP produjo una disminución en los niveles séricos de la citoquina IL-6 e inhibición del daño hepático reflejado en un aumento en la concentración de albúmina sérica, sin cambios en la recuperación de la masa hepática respecto a HP sin pretratamiento. La dosis utilizada en este estudio (34 mg/Kg) es la dosis terapéutica y es aproximadamente 10 veces mayor que la utilizada por Fujioka y cols. (2001). La recuperación del peso (fig. 4), el recuento de mitosis (fig. 6) y de células positivas para Ki-67 (fig. 9) y el tamaño de los hepatocitos (fig. 10) coinciden con hígados en regeneración de animales sanos post HP (Taub, 2004). Al igual que lo observado por Fujioka y cols. (2001), se encontraron valores bajos de transaminasas séricas (fig. 14 y 15) después de 24 horas, comprobando el efecto antiinflamatorio de MP. Además, se encontró disminución de la oxidación de proteínas (fig. 16), aludiendo a una acción protectora de este fármaco que coincide con lo encontrado por Hall (Hall, 1992) sobre la inhibición de la lipoperoxidación en tejido neuronal post aplicación de MP. En contraste con lo encontrado por Fujioka y cols. (2001), no se observaron modificaciones en la función hepática al estudiar las concentraciones de albúmina en suero (fig. 19) ni disminución de los niveles de IL-6. El efecto en la función hepática puede ser explicado por la dosis utilizada que, como se mencionó anteriormente, fue 10 veces mayor que la comunicada

en dicho estudio (Fujioka y cols., 2001). En el segundo caso, la disminución de IL-6 fue obtenida de mediciones en suero, por lo que podría mostrar diferencias con lo obtenido por RT-PCR.

iii) Pre-tratamiento con MP+T₃.

No existen estudios del efecto en hígado de la combinación de MP y T₃. Ya se ha discutido que dosis terapéuticas altas de MP afectan la proliferación hepática y que T₃, por otro lado, es un conocido mitógeno hepático directo. Los mecanismos de acción de MP (efectos genómicos) y T₃ (a tiempos tardíos) coinciden con moléculas que son esenciales para la regeneración hepática post HP. Por ejemplo, post HP hay activación de NFκB vía TNF-α; T₃ actúa aumentando la producción de TNF-α desde las CK, y uno de los mecanismos de acción de MP involucra la disminución de citoquinas inflamatorias participando en la vía de señalización de NFκB. Los efectos esperados para el pretratamiento combinado se basan en el balance de los efectos individuales: una alta concentración de citoquinas conduciría a daño mientras que una baja concentración de citoquinas sería insuficiente para continuar con la proliferación post HP. Es importante, entonces, considerar los efectos conjuntos de ambos fármacos.

El grupo pretratado con MP+T₃ presentó una curva de recuperación normal de la masa hepática (fig. 4), a pesar de que no alcanzó el porcentaje de recuperación total (3,8 %). Cabe destacar que a 16 horas post HP (fig. 5A), se

observó un aumento en la masa hepática que, debido a que en ese tiempo no se observan cambios en los parámetros proliferativos, puede ser explicado por edema intercelular. A 24 horas post HP se observó un máximo de mitosis (fig. 7), pero al finalizar la curva de recuperación de masa hepática el recuento de mitosis aún no retornaba a valores basales, lo que podría indicar que el proceso regenerativo continua en tiempos posteriores, coincidiendo con lo observado en la recuperación de la masa hepática (fig. 4) y el recuento de células positivas de Ki-67 (fig. 9). El análisis histológico mostró que el tamaño de los hepatocitos a 120 horas retornó a valores normales, sugiriendo que la hipertrofia observada con el pretratamiento con T_3 fue evitada con la aplicación de MP (fig. 11). La combinación de MP+ T_3 mostró acciones antiinflamatorias y protectoras no diferentes de las observadas con MP como droga única, indicando que MP y T_3 no actuarían sinérgicamente sobre estos parámetros.

Respecto al control de MP+ T_3 , vMP+NaOH presentó mayor tamaño del hígado a 120 horas post HP (fig. 5A), niveles de expresión de CyD1 (fig. 12), HGF (fig. 13) y citoquinas (fig. 20, 21) aumentados a 16 horas respecto a MP+ T_3 y conteo de células positivas para Ki67 (fig. 9) mayor que todos los grupos a 120 horas. Por otro lado, presentó mayor daño observado en los altos niveles de GOT y GPT (fig. 14 y 15) y en el contenido total de proteínas oxidadas (fig. 16), resultados corroborados en las histologías en que las que se observó que los parámetros de inflamación, necrosis y esteatosis (tabla 3) no retornaron a valores normales aún a 120 horas. Junto a la inflamación, las histologías

también mostraron desorganización de las sinusoides. Lo anterior permite suponer que el proceso regenerativo en el grupo vMP+NaOH está retrasado y que el aumento en el tamaño del hígado (sobre 3,8 % del tamaño del animal a ese tiempo) podría ser explicado como efecto del proceso inflamatorio y edema intra o extracelular en el hígado.

El efecto inhibitor de la proliferación de altas dosis de glucocorticoides descrito en la literatura (Tsukamoto y Kojo, 1989) no fue observado en ninguno de los grupos con MP, sugiriendo que la dosis utilizada no es suficiente para intervenir en el proceso regenerativo, pero sí para mediar la acción inflamatoria. El efecto de T_3 como mitógeno hepático ya ha sido discutido, concluyendo que actúa por mecanismos diferentes a la regeneración desencadenada por HP a tiempos tempranos, pero que convergen a tiempos tardíos. En el año 2012, Shibata y cols. (2012) comunicaron que el pretratamiento con dosis bajas de esteroides (dexametasona) reduce la inhibición de la regeneración hepática en hígados sometidos a ablación por radiofrecuencia y luego a HP. Ya que la ablación por radiofrecuencia aumenta la producción de citoquinas a niveles que impiden la proliferación post HP, la aplicación de esteroides normaliza la situación generando un estado inflamatorio suficiente para retomar la regeneración post HP, pero insuficiente para generar daño. De una manera similar, los resultados obtenidos nos indican que el efecto mitogénico de T_3 podría estar disminuido en los grupos co-tratados con MP debido a su participación en las vías de señalización de las citoquinas pro-inflamatorias, pero tal disminución no mostró

significancia en la recuperación del peso del hígado. La inhibición del efecto anti-proliferativo observado en otros estudios para glucocorticoides (Tsukamoto y Kojo, 1989) podría deberse a la baja dosis de MP o a la interacción con T_3 . Sin embargo, los resultados obtenidos para MP+ T_3 coinciden con lo observado por Fujioka y cols. (2001) para MP, sugiriendo que la dosis de MP más que la interacción con los efectos mitogénicos de T_3 son los responsables de que en estos estudios la utilización de glucocorticoides no disminuya la regeneración.

Es claro entonces, que la regeneración hepática requiere de múltiples señales y funciones coordinadas para proceder normalmente. Por otro lado, es importante recordar que el modelo de HP permite estudiar la proliferación de los hepatocitos en un escenario en que no hay daño hepático, pero que la regeneración en sí es un evento que ocurre naturalmente en el hígado al ser sometido a daño o a resección. Si bien este método ha permitido conocer los mecanismos de regeneración, tiene sus limitantes. Gran parte de las resecciones hepáticas que necesitan regeneración ocurren en hígados con un daño tisular basal (carcinomas, cirrosis, hepatitis), por lo que se necesitan modelos fisiopatológicamente más similares a estos procesos para estudiar los mecanismos regenerativos en esas circunstancias. Conocer los mecanismos de proliferación en el hígado, sin embargo, tiene un sin número de implicaciones para enfermedades humanas, desde la recuperación del peso hepático en trasplante de donantes vivos hasta recuperación post resección en caso de daño.

VIII CONCLUSIONES

- La administración de una dosis de 0,05 mg/Kg de T₃ aplicada dos horas previas a la HP, presenta efectos protectores y antioxidantes en el hígado, sin provocar cambios en la recuperación de la masa ni en la función hepática.
- La administración de una dosis de 34 mg/Kg intraperitoneal de Metilprednisolona aplicada tres horas previas a la HP, disminuye parámetros inflamatorios y oxidativos, sin efectos negativos en la regeneración, recuperación y función del tejido hepático.
- El pretratamiento combinado de MP+T₃ presentó disminución de parámetros inflamatorios y oxidativos, manteniendo una citoarquitectura normal sin presentar efectos deletéreos en la proliferación, recuperación y función de la masa hepática.

IX REFERENCIAS

Buttgereit F, Brand MD and Burmester GR. 1999. Equivalent Doses and Relative Drug Potences for Non-genomic Glucocorticoid Effects: A Novel Glucocorticoid Hierarchy. *Biochemical Pharmacology*, Vol 58, pp 363-368.

Columbano A, Shinozuka H. 1996. Liver regeneration versus direct hyperplasia. *Faseb J*;10(10): 1118-28.

Deng L, Lin-Lee YC, Claret FX and Kuo MT 2001. 2-acetylaminofluorene up-regulates rat *mdr1b* expression through generating reactive oxygen species that activate NF-kappa B pathway. *J. Biol. Chem*;276:413.

Diehl AM, Rai R. 1996. Regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. *J Gastroenterol Hepatol*. 1996 May;11(5):466-70.

Fausto N. 2000. Liver Regeneration. *Hepatology*; 32:19-31.

Fausto N. 2001. Liver Regeneration: From Laboratory to Clinic. *Liver Transplantation*. Vol 7, No 10:835-844.

Fausto N., Riehle KJ. 2005. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatoabiliary Pancreat Surg*. 12:181-189.

Fausto N., Campbell J.S., Riehle K.J. 2006 Liver Regeneration. *Hepatology*; 43:S45-53.

Fausto N. 2006. Involvement of the innate immune system in liver regeneration and injury. *J Hepatology*;45:347-9.

Fernández V, Tapia G, Varela P, Gaete L, Vera G, Mora C, Vial MT, Videla LA. 2008. Causal role of oxidative stress in liver preconditioning by thyroid hormone in rats. *Free Radic Biol Med*. 2008 May 1;44(9):1724-31. Epub 2008 Jan 26.

Francavilla A, Carr BI, Azzarone A, Polimeno L, Wang Z, Van Thiel DH, Subbotin V, Prelich JG, Starzl TE. 1994. Hepatocyte proliferation and gene expression induced by triiodothyronine in vivo and in vitro. *Hepatology*; 20:1237-1241.

Fujioka T, Murakami M, Niiya T, Aoki T, Murai N, Enami Y, Kusano M. 2001. Effect of methylprednisolone on the kinetics of cytokines and liver function of regenerating liver in rats. *Hepatology Research*; 19:60-73.

Fujiyoshi M, Ozaki M. 2011. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*; 18:13-22.

Grisham J.W. 1962. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver: autoradiography with thymidine-H. *Cancer Res.* 22, 842-849.

Higgins G, Anderson R. 1931. Restoration of the liver of the White rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*; 12:186-202.

Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg* 76:13-22, 1992.

Holt D.R., Thiel D.V., Edelstein S, Brems JJ. 2000. Hepatic resections. *Arch Surg*; 135:1353-1358.

Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. 2004. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101(13):4477-82.

Ibdah JA, Yang Z, Bennett MJ. 2000 Liver disease in pregnancy and fetal fatty acid oxidation defects. *Mol Genet Metab*; 71:182-189.

Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, Groote JD, et al. 1995. Histologic grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*; 24:289-293.

Kaplowitz N. 2002. Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. *Semin Liver Dis*; 22:137-144.

Kiuchi T, Kasahara M, Uryuhara K, Inamota Y, Uemoto S, Asonuma K et al. 1999. Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from liver donors. *Transplantation*; 67:321-7.

Kowalik MA, Perra A, Pibiri M, Cocco MT, Samarut J, Plateroti M, Ledda-Columbano GM, Columbano A. 2010. TRbeta is the critical thyroid hormone receptor isoform in T3-induced proliferation of hepatocytes and pancreatic acinar cells. *J Hepatol*; 53 (4):686-92.

Ledda-Columbano GM, Perra A, Loi R, Shinozuka H, Columbano A. 2000. Cell proliferation induced by triiodothyronine in rat liver is associated with nodule regression and reduction of hepatocellular carcinomas. *Cancer Res*; 60(3):603-9.

Lin HS, Ji ZS, Zheng LH, Guo GG, Chen B, Wu H and Zhang GW. 2012. Effect of methylprednisolone on the activities of caspase-3, -6, -8 and -9 in rabbits with acute spinal cord injury. *Experimental and therapeutic medicine*; 4: 49-54, 2012.

Malik R, Mellor N, Selden C and Hodgson H. 2003. Triiodothyronine Enhances the Regenerative Capacity of the Liver Following Partial Hepatectomy *HEPATOLOGY*; 37:79-86.

Malik R., Habib M., Tootle R., and Hodgson H. 2005. Exogenous Thyroid Hormone Induces Liver Enlargement, Whilst Maintaining Regenerative Potential –A Study Relevant to Donor Preconditioning. *American Journal of Transplantation*; 5: 1801-1807

Mangall D, Bird NC and Majedd AW. 2003. The Molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. *Liver International*; 23:124-138.

Mardones M, Valenzuela R, Romanque P, Covarrubias N, Anghileri F, Fernández V, Videla LA, Tapia G. 2012. Prevention of liver ischemia reperfusion injury by a combined thyroid hormone and fish oil protocol. *J Nutr Biochem*. :23(9):1113-20.

Marubashi S, Sakon M, Nagano H, Gotoh K, Hashimoto K, Kubota M, et al. 2004. Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portohepatic shunt rat model. *Surgery*; 136:1028-37.

Michalopoulos G.K. 1997 DeFrances M.C. Liver Regeneration. *Science*; 276:60-66.

Michalopoulos G.K. 2007. Liver Regeneration. *J Cell Physiol*; 213(2): 286-300.

Michalopoulos G.K. 2010. Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *Critical Analysis of Mechanistic Dilemmas. The American Journal of Pathology. Vol. 176, No 1.*

Novitzky D, Cooper DK, Rosendale JD, Kauffman HM. 2006. Hormonal therapy of brain-dead organ donor: experimental and clinical studies. *Transplantation*;82:1396-401.

Pahlavan PS, Felmann RE Jr, Zavos C, Kountouras J. 2006. Prometheus's challenge: molecular, cellular and systemic aspect of liver regeneration. *J Sur Res*; 134(2):238-51

Pascher, A, Pascher A, Sauer IM, Walter M, Lopez-Haeninnen E, Theruvath T, Spinelli A, Neuhaus R, Settmacher U, Mueller AR, Steinmueller T, Neuhaus P. 2002. Donor evaluation, donor risk, donor outcome, and donor quality of life in adult-to-adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl*: 8, 829-837.

Pibiri M, Ledda-Columbano GM, Cossu C, Simbula G, Menegazzi M, Shinozuka H, Columbano A. 2001. Cyclin D1 is an early target in hepatocyte proliferation induced by thyroid hormone (t3). *FASEB J*;15:1006-1013.

Repa JJ, Lund EG, Horton JD, et al. 2000. Disruption of the sterol 27-hydroxylase gene in mice results in hepatomegaly and hypertriglyceridemia. Reversal by cholic acid feeding. *J Biol Chem*;275:39685-39692.

Reznick AZ, Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*;233:357-63.

Rhen T, Cidlowski J. 2005. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids—New Mechanisms for Old Drugs. *N Engl J Med*; 353:1711-23.

Rizzo AJ, Heilpern P, Webb TE. 1971. Temporal changes in DNA and RNA synthesis in the regenerating liver of hydrocortisone-treated rats. *Cancer Res*; 31:876-81.

Rudnick DA, Davidson NO. 2012. Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration. *International Journal of Hepatology*. Volume 2012, Article ID 549241, 8 pages.

Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V, Demetris AJ. 1999. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology*; 29:403-411.

Shah V.R. 2008. Aggressive Mangement of Multiorgan Donor. *Transplantation Proceedings*. 40, 1087-1090.

Shibata T, Mizuguchi T, Nakamura Y, Kawamoto M, Meguro M, Ota S, Hirata K, Ooe H, Mitaka T. 2012. Low-dose steroid pretreatment ameliorates the transient impairment of liver regeneration. *World Gastroenterol*; 18(9):905-914.

Sola J, Pardo-Mindan FJ, Zozaya J, Quiroga J, Sangro B, Prieto J. 1991. Liver changes in patients with hyperthyroidism. *Liver*; 11:193-197

Takemura S, Miya K, Takao U, Umemoto T, Saji S. 1999. Influence of corticosteroid preoperative administration for surgical stress of the esophageal cancer patients peri-and post-operative periods. *Jpn J Gastroenterol Surg*;32(5):1113-41.

Taki-Eldin A, Zhou L, Xie HY, Zheng SS. 2012. Liver Regeneration after Liver Transplantation. *Eur Surg Res*;48:139-153.

Tapia G, Fernández V, Varela P, Cornejo P, Guerrero J, Videla LA. 2003. Free Radic Biol Med; 35(3):257-65. Thyroid hormone-induced oxidative stress triggers nuclear factor-kappaB activation and cytokine gene expression in rat liver.

Taub R. 2004. Liver regeneration: from myth to mechanism. Nat Rev Mol Cell Biol;5:836-847.

Tsukamoto I, Kojo S. 1989. Effect of glucocorticoid on liver regeneration after partial hepatectomy in the rat. Gut; 30:387-390.

Van Der Hoeven JA, Ter Horst GJ, Molema G, et al. 2000. Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor liver in the rat. Ann Surg; 232:804-13.

Webber EM, Bruix J, Pierce RH, Fausto N. 1998. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. Hepatology; 28:1226-1234.

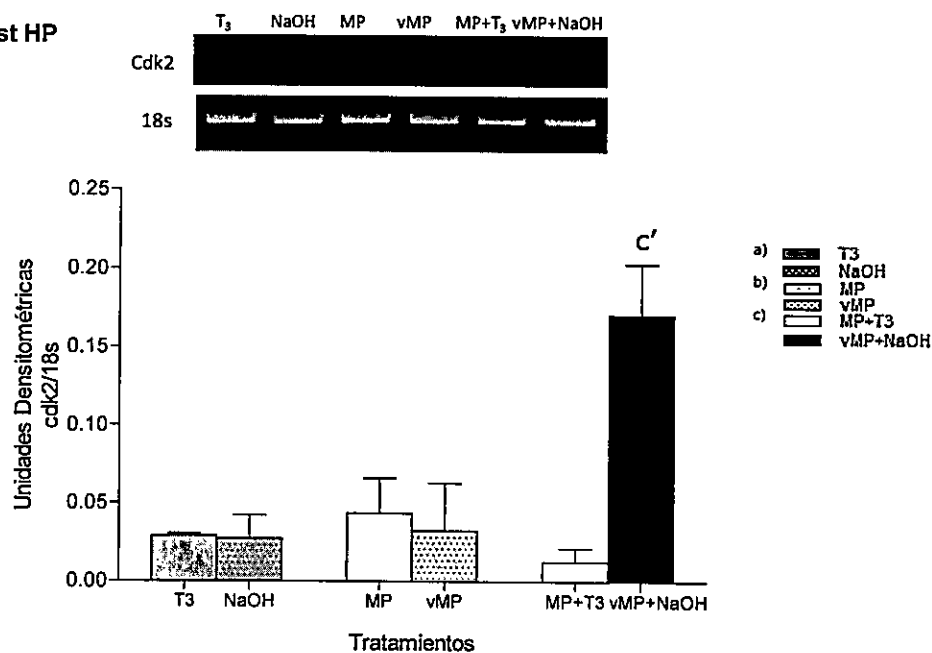
Zimmers TA, McKillop IH, Pierce RH, Yoo JY, Koniaris LG. 2003. Massive liver growth in mice induced by systematic interleukin 6 administration. Hepatology;38(2):326-34.

ANEXO

Expresión del mRNA de *Cdk2*.

En la figura 22 se observan los niveles expresión de *Cdk2* como unidades densitométricas de *Cdk2/18s* para cada grupo a 16 y 24 horas post HP. Se observa (fig. 22A) que a 16 horas post HP el grupo pretratado con MP+T₃ ($0,013 \pm 0,009$ UD) presentó diferencias significativas con su control vMP+NaOH ($0,17 \pm 0,032$ UD) respecto a los niveles de expresión de *Cdk2/18s*, pero no se observaron diferencias entre MP+T₃ y los demás grupos experimentales en ese tiempo. De manera similar, se observa en la figura 22B que a 24 horas post HP, no se observan diferencias entre todos los grupos experimentales.

(A) 16 horas post HP



(B) 24 horas post HP

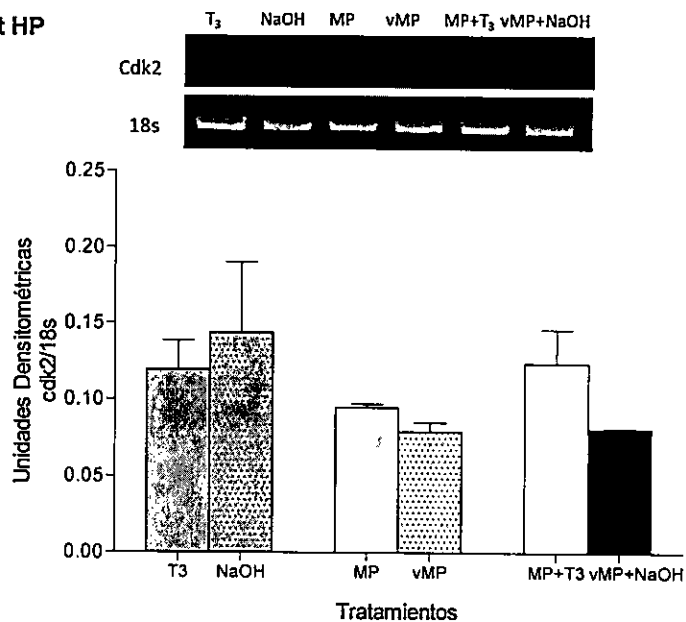


Figura 22. Niveles de expresión de *Cdk2* mediante RT-PCR según tratamiento a 16 y 24 horas post HP. Cada barra representa el promedio \pm SEM (n=4) de unidades densitométricas. (A) 16 horas post HP, (B) 24 horas post HP. Las letras y las letras primas sobre cada barra representan diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA Unifactorial y test de Newman Keuls) entre los grupos y el grupo con su control, respectivamente.