



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**EFFECTO DEL PROTOCOLO DE RESUCITACIÓN HORMONAL COMBINADO
(TRIYODOTIRONINA y METILPREDNISOLONA) SOBRE PARÁMETROS DE
ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO HEPÁTICO EN UN MODELO DE HÍGADO
PERFUNDIDO AISLADO**

LUIS ÁLVARO GÓMEZ GARCÉS

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y MÉDICAS.
MENCIÓN FARMACOLOGÍA.**

Director de Tesis: Dra. Pamela Romanque Ulloa.

**SANTIAGO, CHILE
2014**

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

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Medicina que la
Tesis de Magister presentada por el candidato:

Luis Álvaro Gómez Garcés

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito
para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas y Médicas con
mención en Farmacología, en el examen de Defensa Privada de Tesis
rendido el día

Director de Tesis:

Dra. Pamela Romanque Ulloa

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Ramón Rodrigo

.....

Dr. Víctor Parra

.....

Dra. María Eugenia Letelier

.....

Dr(a). Emilia Sanhueza

.....

Esta tesis fue realizada en la Unidad de Patología Hepática Experimental en asociación con el Laboratorio de Estrés Oxidativo Hepático, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Ésta fue financiada por los proyectos FONDECYT de iniciación 11090240 y FONDECYT Regular 1130274.

“Si yo desaparezco, queda mi obra y queda la verdad sobre mi gigantesco esfuerzo donde dejé mi vida”.

Ramón Carrillo

DEDICATORIA

- Dedicado a María y Luis, mis padres, de quienes obtuve el coraje para emprender este titánico viaje.-

- En homenaje a mis hermanos, Diego y Belén, los cuales me demostraron el valor del esfuerzo en cada momento de la vida.-

- En memoria a un gran amor, que me apoyó durante mi jornada... pero con quien no pude llegar al final de este camino.-

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Pamela Romanque por otorgarme la oportunidad de participar en su proyecto, por sus conocimientos y su paciencia.

Al Dr. Luis Videla por su orientación y su valiosa disposición para ayudarme a llegar a buen término. También a la Dra. Virginia Fernández, por animarme y compartir sus experiencias durante este trabajo.

A las Dras. Gladys Tapia y Patricia Varela, por compartir sus tiempos para enseñarme técnicas que ayudaron al desarrollo de ésta tesis.

A Romina Vargas y Manuel Suárez, por su increíble compañía y su valiosa colaboración en el desarrollo de los experimentos.

A mis queridos amigos Stephanie Chalmers, Amanda D' Espessailles, Camila Dossi, Daniel González, Pedro Leiva y Giomar Intriago, por hacerme reír y recordar que la vida es más que sólo trabajo.

A mis estimados colegas Javier Martínez y Felipe Muñoz, los que animaron mis días y con quienes compartí locuras de una vida universitaria extendida.

Te agradezco Karen Jahnke por darme tranquilidad e iluminarme en tiempos oscuros.

Y a Nelson Lobos y Marcelo Mardones... porque a veces es necesario escuchar historias de éxito para seguir adelante.

INDICE GENERAL

| Sección | Página |
|--|-----------|
| Índice General | i |
| Índice de Tablas | iv |
| Índice de Figuras | v |
| Lista de Abreviaturas | vi |
| Resumen | viii |
| Abstract | x |
| | |
| I INTRODUCCION | 1 |
| 1.1. Generalidades de la donación de órganos y Muerte cerebral. | 1 |
| 1.2. Principios de la Resucitación Hormonal. | 3 |
| 1.3. Resucitación hormonal e hígado. | 5 |
| 1.4. Células de Küpffer y el sistema de hígado perfundido aislado. | 8 |
| 1.5. Terapia hormonal: vías de señalización. | 11 |
| | |
| II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 Hipótesis. | 15 |
| 2.2 Objetivo General. | 15 |
| 2.3 Objetivos Específicos. | 15 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| III | MATERIALES Y METODOLOGÍA | 17 |
| 3.1. | Animales de experimentación. | 17 |
| 3.2. | Drogas y tratamientos. | 17 |
| 3.3. | Protocolo quirúrgico. | 19 |
| 3.4. | Actividad de células de Kúpffer. | |
| 3.4.1. | Consumo de oxígeno. | 20 |
| 3.4.2. | Captación de carbono coloidal. | 20 |
| 3.5. | Determinación de parámetros de estrés oxidativo. | |
| 3.5.1. | Contenido de proteínas oxidadas. | 21 |
| 3.5.2. | Glutación total hepático. | 21 |
| 3.5.3. | Inmunohistoquímica de 8-OHdG. | 22 |
| 3.6. | Determinación de parámetros inflamatorios. | 22 |
| 3.7. | Determinación de parámetros de daño hepático. | |
| 3.7.1. | Lactato deshidrogenasa en perfusado. | 24 |
| 3.7.2. | Histología hepática. | 25 |
| 3.8. | Cálculo del tamaño muestral. | 26 |
| 3.9. | Análisis estadístico. | 27 |

| | | |
|------------|---|----|
| IV | RESULTADOS | |
| 4.1. | Determinación de la actividad de células de K pffer. | 28 |
| 4.2. | Determinación de parámetros de estrés oxidativo. | 32 |
| 4.3. | Determinación de parámetros inflamatorios: niveles de expresión de citoquinas TNF- α e IL-6. | 37 |
| 4.4. | Determinación de parámetros de daño hepático. | 38 |
| V | DISCUSIÓN | 42 |
| VI | CONCLUSIONES | 57 |
| VII | BIBLIOGRAFÍA | 59 |

INDICE DE TABLAS

| N° | Título | |
|---------|---|----|
| Página | | |
| Tabla 1 | Puntaje para daño histológico según área de compromiso estructural | 25 |

INDICE DE FIGURAS

| N° | Título | Página |
|-----|--|--------|
| 1. | Diseño experimental | 18 |
| 2. | Efecto del pretratamiento hormonal en la velocidad de consumo de oxígeno basal e inducido por carbono coloidal en hígado de rata perfundido aislado. | 29 |
| 3. | Efecto del pretratamiento hormonal sobre la velocidad de captación de CC en función del tiempo de infusión de carbono. | 31 |
| 4. | Efecto del pretratamiento hormonal sobre niveles de proteínas oxidadas. | 33 |
| 5. | Efecto del pretratamiento hormonal sobre niveles de glutatión total. | 34 |
| 6. | Índice de proteínas oxidadas/GSH total hepático. | 35 |
| 7. | Efecto del pretratamiento hormonal sobre daño a nivel de DNA por inmunohistoquímica. | 36 |
| 8. | Efecto del pretratamiento hormonal sobre niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias. | 37 |
| 9. | Efecto del pretratamiento hormonal sobre el eflujo sinusoidal de LDH tras infusión de carbono. | 39 |
| 10. | Efecto del pretratamiento hormonal sobre daño hepático evaluado por histología. | 40 |
| 11. | Efecto del pretratamiento hormonal sobre daño hepático evaluado por histología según puntaje de daño. | 41 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| 8-OHdG | 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| AUC | Área bajo la curva |
| BD | <i>Brain death</i> |
| CC | Carbono Coloidal |
| cDNA | DNA complementario |
| CK | Células de Küpffer |
| DAB | 3,3' tetrahidrocloruro de diaminobencidina |
| DNPH | 2,4-dinitrofenilhidrazina |
| dNTP | desoxirribonucleótidos trifosfato |
| DTNB | Acido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| GRE | Elementos de respuesta a glucocorticoides |
| HDAC2 | Deacetilasa-2 de histonas |
| HPA | Hígado perfundido aislado |
| HRP | <i>Hormonal resuscitation protocol</i> |
| ICAM-1 | Molécula de adhesión intercelular -1 |
| IL-1 | Interleuquina 1 |
| IL-6 | Interleuquina 6 |
| IR | Isquemia-Reperfusión |

| | |
|-----------------|--|
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| MAP | Proteína activada por mitógenos |
| MC | Muerte cerebral |
| MP | Metilprednisolona |
| NF-kB | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas |
| Nrf2 | Factor-2 relacionado al factor nuclear eritroide-2 |
| NS | No significativo |
| PIC | Presión intracraneal |
| PMSF | Fenilmetanesulfonil-fluorido |
| PRH | Protocolo de resucitación hormonal |
| QO ₂ | Consumo de Oxígeno |
| ROS | Especies reactivas del oxígeno |
| RR | Respuesta respiratoria |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa |
| STAT3 | Transductor de señal y activador de la transcripción 3 |
| T ₃ | Triyodotironina |
| T ₄ | Tiroxina |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| UCP | Proteína desacoplante mitocondrial |
| VCAM-1 | Molécula de adhesión vascular -1 |
| vMP | Vehículo de Metilprednisolona |

RESUMEN

El protocolo de resucitación hormonal combinado (PRH); que puede incluir el uso de corticoides, hormona tiroidea, insulina y vasopresina, se utiliza para prevenir las complicaciones asociadas a la muerte cerebral (MC). La mayoría de los donantes de órganos están en MC, condición que se asocia a cambios hemodinámicos, inflamatorios y hormonales que pueden comprometer la viabilidad de los injertos. El PRH se desarrolló hace tres décadas, con el objetivo de optimizar la función miocárdica y ha sido exitoso en términos de recuperación de donantes e injertos; sin embargo, su efecto en otros órganos ha sido poco estudiado y existe evidencia experimental de que su uso podría resultar deletéreo en el hígado graso sometido a isquemia-reperfusión, aunque no hay evidencia acerca de la respuesta del hígado normal.

El trasplante de órganos es un procedimiento complejo que se asocia a daño de los injertos a través de diversos mecanismos, entre los cuales se

incluye isquemia tibia, preservación e isquemia fría, y reperfusión en el paciente receptor. El daño que ocurre en la reperfusión se asocia estrechamente al funcionamiento de la célula de Küpffer (CK), capaz de modular la respuesta inflamatoria y oxidativa del órgano a una noxa. El objetivo de ésta tesis fue evaluar el funcionamiento de la CK, así como el daño y el estrés oxidativo en el hígado de animales que recibieron PRH previo a la perfusión en el sistema de hígado aislado.

Ratas *Sprague Dawley* recibieron 0,34 mg/Kg de metilprednisolona (MP) y/o 0,05 mg/Kg triyodotironina (T₃). Los hígados obtenidos fueron perfundidos por 45 min en el sistema de hígado perfundido aislado. Se conformaron los siguientes grupos experimentales: a) MP+T₃, b) vMP+NaOH, c) MP, d) vMP, e) T₃, f) NaOH. Se estudió la respuesta respiratoria de las CK inducida por carbono coloidal, su capacidad fagocítica, parámetros de daño hepático, estrés oxidativo e inflamación. Los resultados muestran que el PRH combinado disminuye los parámetros de daño hepático demostrados por histología y niveles de LDH, mantiene la respuesta respiratoria normal de CK, pero no disminuye estrés oxidativo ni inflamación. Se concluye que el PRH disminuye el daño tisular sin alterar la actividad de CK, y que en las dosis y marco temporal utilizados, se observaron cambios modestos en los marcadores de estrés oxidativo ni inflamación.

ABSTRACT

The combined hormonal resuscitation protocol (HRP), which may include the use of steroids, thyroid hormone, insulin and vasopressin, is used to prevent complications associated with brain death (BD). The vast majority of organ donors are in BD, a physiopathological condition associated with hemodynamic, inflammatory and hormonal changes, which can jeopardize grafts viability. The HRP was developed three decades ago, with the main aim of optimizing myocardial function. The HRP has been successful in terms of graft and donor recovery, but its effect over other organs, such as kidney and liver, has not been studied. There is experimental evidence suggesting their use may be deleterious in fatty liver subjected to ischemia-reperfusion, although no evidence on the response of normal liver has been published so far.

Organ transplantation is a complex procedure, which is associated with graft injury through different mechanisms including warm ischemia, preservation

and cold ischemia and reperfusion in the recipient patient. Reperfusion damage is closely dependent on Küpffer cell (CK) function, the liver resident macrophage, capable of modulating the inflammatory and oxidative stress response to the organ to a certain challenge. The aim of this thesis was to evaluate the performance of CK and damage and oxidative stress in the liver of animals receiving HRP prior to perfusion in the isolated liver system.

Sprague Dawley rats were given 0.34 mg/Kg of methylprednisolone (MP) and/or 0.05 mg/Kg triiodothyronine (T_3). Livers were perfused for 45 min. in the isolated liver system. The experimental groups comprise: a) MP+ T_3 , b) vMP+NaOH, c) MP, d) vMP, e) T_3 , f) NaOH. CK respiratory burst colloidal carbon-induced and phagocytic capacity was studied. Liver injury, oxidative stress and inflammatory parameters were assessed. Results show combined PRH diminished liver damage, demonstrated by histology and LDH levels, maintains normal CK respiratory burst, but does not reduce oxidative stress or inflammation. In conclusion, PRH maintain CK normal functioning, but have a modest effect over oxidative stress and inflammation parameters.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de la donación de órganos y Muerte cerebral.

El trasplante de órganos consiste en el reemplazo de un tejido u órgano enfermo o dañado por otro (Daga Ruiz *et al.*, 2008). Según datos de la Corporación Chilena del Trasplante, hasta el primer trimestre del 2013 existían 1.370 pacientes en lista de espera, mientras que hasta esa fecha sólo se habían realizado 149 trasplantes. Esta brecha entre necesidad y disponibilidad de órganos para el trasplante se agrava por la pérdida de los potenciales donantes debido a la negativa familiar, contraindicaciones médicas, problemas administrativos o de mantención de injertos.

La mayoría de los órganos donados proviene de pacientes en estado de MC. La MC es la pérdida irreversible de la función cerebral caracterizada por la alteración en la mantención de la conciencia y de las funciones del tronco encefálico incluyendo la respiración (Group, 1999). Diversas patologías pueden causar MC, siendo las más importantes el trauma craneal y el desarrollo de hemorragia subaracnoídea por ruptura de aneurisma (Wijdicks *et al.*, 2008).

La MC es reconocida como una condición fisiopatológica dinámica que cursa con alteraciones hemodinámicas, favoreciendo la hipoperfusión de los órganos. Inicialmente se produce la liberación brusca de catecolaminas lo que aumenta la resistencia vascular y favorece la extensión de la isquemia. Esta alteración es seguida a la herniación del tejido cerebral por la progresiva elevación de la presión intracraneana y la consecuente hipotensión, disminución de la resistencia vascular y disfunción cardíaca (Zhang *et al.*, 2011). La extensión de la isquemia cerebral puede afectar el eje hipotálamo-hipófisis lo que lleva a alteraciones en la liberación de hormonas tiroideas, cortisol, insulina y vasopresina (Bugge, 2009).

La MC facilita también el inicio y progreso de un estado inflamatorio local y sistémico que será deletéreo al momento del trasplante (Lenzlinger *et al.*, 2001). Se ha observado en ratas Wistar sometidas a MC un aumento en la expresión de moléculas de adhesión vascular e intercelular (VCAM-1 e ICAM-1, respectivamente) en las que además se evidenció infiltración de polimorfonucleares de forma progresiva (van Der Hoeven *et al.*, 2000), cambios que se asocian a la disfunción orgánica comprometiendo la viabilidad del órgano trasplantado (Dominguez-Roldan *et al.*, 2009).

1.2. Principios de la Resucitación Hormonal.

En 1984 Novitzky y colaboradores comprobaron en un modelo experimental de MC en babuinos los cambios hormonales y hemodinámicos descritos previamente. En este estudio se observó la denominada “tormenta adrenérgica” consistente en el aumento explosivo de catecolaminas en los primeros 5 min para luego descender progresivamente. Los niveles plasmáticos de T₃ disminuyeron al 50%, en tanto que cortisol aumentó a los 5 min para después caer bajo los niveles basales (Novitzky *et al.*, 2006). La administración combinada de T₃, cortisol e insulina en cerdos con inducción de MC por isquemia cerebral demostró mejorar el gasto cardiaco (Novitzky *et al.*, 1987b). El uso de T₃ en otros estudios experimentales ha provocado la reversión del metabolismo anaeróbico establecido en MC, mejorando la utilización de glucosa y disminuyendo los niveles plasmáticos de lactato (Novitzky *et al.*, 1988). Estos primeros resultados impulsaron el uso de los protocolos hormonales combinados en pacientes, con el objetivo de recuperar el equilibrio hormonal alterado post MC.

En 1987 se procede a establecer la efectividad de la terapia hormonal combinada en un ensayo clínico. Veintiún donantes en MC recibieron T₃, cortisol e insulina frente a 26 donantes que sólo recibieron medidas de soporte hemodinámico. Los pacientes sometidos a tratamiento combinado requirieron menores dosis de drogas inotrópicas y todos los órganos recuperados fueron adecuados para el trasplante, en comparación con aquellos que no recibieron la terapia hormonal, de los cuales un 20% se descartó como donante (Novitzky *et al.*, 1987a).

Posteriormente, la terapia combinada comienza a ser utilizada por otros equipos de trasplante (Novitzky *et al.*, 2008). Un estudio retrospectivo en el hospital *Papworth* del Reino Unido demostró que, 44 de 52 donantes cardíacos que no cumplían requisitos mínimos de acuerdo a parámetros hemodinámicos fueron recuperados para donación (Wheeldon *et al.*, 1995). A partir del 2001 se incorpora el protocolo hormonal al manejo convencional para donantes cardíacos tras el consenso de especialistas trasplantólogos en *Crystal Lake*, el que ha sido incorporado en algunos centros (Zaroff *et al.*, 2002), y pasa a denominarse PRH.

El objetivo inicial del desarrollo del PRH fue la optimización de la función miocárdica, por lo que sus efectos en otros órganos han sido poco estudiados. La evaluación de 4.500 receptores cardiacos de donantes sometidos o no al protocolo PRH demostró mejores tasas de supervivencia a un mes en aquellos injertos provenientes de donantes que recibieron PRH. El estudio reflejó además un 48% menos de disfunción del órgano trasplantado (Rosendale *et al.*, 2003). La terapia hormonal combinada, entonces, permite recuperar a donantes considerados anteriormente de alto riesgo y aumentar el número de órganos recuperados (Salim *et al.*, 2005). Se concluye que al mejorar la función miocárdica y por ende la perfusión del resto de los órganos, se conserva y optimiza la función de éstos.

1.3. Resucitación hormonal e hígado.

El trasplante hepático es la única terapia posible para enfermedades hepáticas terminales como cirrosis hepática, falla hepática fulminante y hepatocarcinoma (Hepp *et al.*, 2008). Dentro del proceso del trasplante el órgano se ve sometido a diversos estímulos potencialmente dañinos: el proceso fisiopatológico de la MC, la preservación e isquemia fría durante el procuramiento y la reperfusión tibia una vez trasplantado el órgano a su receptor, además del estrés quirúrgico.

La isquemia se produce cuando el flujo sanguíneo a un órgano se interrumpe y la reperfusión corresponde al restablecimiento de dicho flujo. La lesión por IR es un fenómeno en donde el daño tisular isquémico aumenta cuando ocurre la reperfusión. Los mecanismos de lesión hepática por IR incluyen: (i) la pérdida de la homeostasis del calcio, (ii) generación de ROS y del nitrógeno, (iii) cambios en la microcirculación, (iv) activación del complemento y (v) de las CK (Romanque *et al.*, 2005). El daño en la reperfusión temprana está mediado por agentes proinflamatorios liberados por la CK, mientras que en la fase tardía de la lesión, éstos mismos mediadores atraen neutrófilos amplificando el daño (Jaeschke, 2011).

Por el aumento de la brecha entre la necesidad de órganos y su disponibilidad, se ha recurrido en algunos casos al uso de donantes marginales, los que presentan un elevado riesgo de disfunción en el receptor (Attia *et al.*, 2008). La esteatosis hepática es la acumulación grasa en el interior de los hepatocitos y es la principal alteración encontrada en donantes marginales (Scorletti *et al.*, 2011).

Los resultados de la aplicación clínica del PRH sobre donantes de injertos hepáticos sugieren que estos tendrían una mayor tasa de disfunción y falla primaria, siendo hasta la fecha desconocidos los potenciales efectos sobre órganos marginales. Un estudio experimental en hígado graso demostró que la

administración de 500 µg/Kg de T₄ y 34 mg/Kg de MP 48h previo a IR hepática, resultó en disminución en la sobrevida de hasta un 40% acompañado de necrosis y daño hepático. La razón sería el aumento en la expresión de la proteína desacoplante mitocondrial UCP-2 junto a la disminución en la producción de ATP. Tales cambios harían más susceptible al hígado graso al daño por IR (Ellett *et al.*, 2008). Hasta la fecha es escasa la evidencia acerca del efecto del PRH en hígado graso o normal sobre otros mecanismos de daño que ocurren dentro del proceso de trasplante.

En nuestro país el tratamiento de los donantes no incluye de forma rutinaria el PRH, en parte debido a los costos asociados, pero también porque no existe información suficiente sobre el efecto en órganos distintos del corazón y los mecanismos de protección que la terapia hormonal gatillaría en los distintos tejidos. La mayoría de los centros aplica vasopresina si ocurre diabetes insípida e insulina de acuerdo a la glicemia del paciente; MP y T₃ se han empleado recientemente en donantes seleccionados de corazón y pulmón (Comunicación en Reunión Nacional de Coordinadores de Trasplante, Hotel San Francisco, Mayo 2013).

1.4. Células de Küpffer y el sistema de hígado perfundido aislado.

Las CK son células pertenecientes a la línea sinusoidal hepática no parenquimatosas. Se reconocen como macrófagos hepáticos, y conforman cerca del 80% de las células macrofágicas del sistema retículo endotelial. Alrededor del 40% se ubica principalmente en la zona periportal del lobulillo hepático, pero también están presentes en zona media y central (Osawa *et al.*, 2010). Estas células cumplen diversas funciones entre las que se cuentan: (i) fagocitosis de partículas foráneas y/o potencialmente peligrosas (virus, bacterias, protozoos), (ii) secreción de diversos mediadores (TNF- α , IL-1 α , IL-6), (iii) secreción de prostaglandinas y (iv) producción de ROS (Smedsrod *et al.*, 1994).

Las CK constituyen la primera línea defensiva hepática. Se activan frente a diversos estímulos, entre ellos la endotoxina. Una vez activadas se liberan ROS (siendo los más conocidos el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno), citoquinas, quimioquinas y productos derivados del ácido araquidónico. Esta activación da inicio a la respuesta homeostática del órgano, dirigiendo tanto respuestas inflamatorias como reparadoras (Urtasun *et al.*, 2007).

La generación de ROS por CK forma parte del sistema de defensa inmune innato. Las ROS pueden producirse en organelos celulares como mitocondrias o peroxisomas. En el caso de las CK, la principal fuente generadora de ROS es la enzima NADPH oxidasa (Baffy, 2009). Esta enzima polimérica constituida por la unión de proteínas de membrana con componentes citosólicos activados. El componente catalítico de la enzima es la gp91^{phox}, que junto a p22^{phox} conforman el flavocitocromo b₅₅₈. Esta proteína transfiere electrones desde la molécula NADPH intracelular hacia el oxígeno generando anión superóxido (Nauseef, 2008).

Durante los últimos años se ha evidenciado el importante rol que estas células cumplen en la cirugía hepática (resección o trasplantes) lo que ha alcanzado gran relevancia. En modelos de IR se ha determinado que las CK juegan un rol clave en el daño hepático. La isquemia activa a las CK, siendo la posterior reperfusión la que produciría un daño por estrés oxidativo vascular al activar a la NADPH oxidasa. Este mecanismo final impulsaría la expresión de genes mediados por NF-kB o AP-1, quimioquinas y moléculas de adhesión (Bilzer *et al.*, 2006).

El modelo de HPA es una técnica aplicada por décadas para el estudio de la fisiología hepática. Este modelo fue desarrollado por Claude Bernard en 1855 y desde entonces ha entregado valiosa información para el estudio del hígado (Bessems *et al.*, 2006). En el estudio del trasplante, el HPA ha servido para el análisis de los efectos del daño por isquemia y por preservación fría en diversos parámetros como el QO_2 , liberación de enzimas tisulares y producción de urea (Minor *et al.*, 2007).

En nuestro laboratorio, el modelo de HPA se ha implementado con el objetivo de estudiar la función de las CK en un órgano intacto. La activación de estas células en condiciones de estímulo por agentes como el CC ha permitido la estimación de la RR de las CK tras la fagocitosis de las partículas de CC a través del QO_2 . También ha sido posible la valoración de la velocidad de captación continua de CC y de parámetros de viabilidad como la medición de LDH liberada en el perfusado. A su vez, estos parámetros han sido complementados con el estudio de elementos moleculares como la capacidad de unión de NF-kB al DNA (Romanque *et al.*, 2003).

Este sistema consta de un oxigenador, conectado a un reservorio sometido a temperatura constante en donde permanece la solución de perfusión. Un motor permite la circulación a flujo constante a través del hígado extraído previamente y canulado a través de sus venas porta y cava inferior. El perfusado efluente es sensado por un electrodo de oxígeno para la determinación del consumo el cual es graficado en hoja milimetrada.

1.5. Terapia hormonal: vías de señalización.

El receptor de hormona tiroidea funciona como factor de transcripción en presencia de su ligando. Su activación impulsa su unión al DNA en elementos de respuesta tiroideos y la heterodimerización con el receptor X retinoide (RXR) (Malik *et al.*, 2002).

La administración de T₃ 10 µg/100 g de peso corporal (Venditti *et al.*, 2008) aumenta la tasa metabólica basal (Moreno *et al.*, 2002) y el QO₂ principalmente por modificaciones a nivel mitocondrial, tales como el aumento en la expresión de UCP (Silva, 2006). Tras esto se produce un aumento en la formación de ROS (Lanni *et al.*, 2003) y en el consumo de moléculas antioxidantes como vitamina E y GSH. No obstante, la aplicación de 0,1 mg/Kg de T₃ induce un estado de estrés oxidativo moderado y transitorio que resulta hepatoprotector contra el daño por IR. Este efecto se ve reflejado en la

disminución de la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6, y la activación de factores de transcripción nucleares como el factor NF- κ B o AP-1. Estos factores gatillan la expresión de proteínas citoprotectoras antioxidantes (superóxido dismutasa, óxido nítrico sintetasa) o antiapoptóticas Bcl (*B-cell lymphoma*)-2 (Videla *et al.*, 2012). Este proceso finalmente resulta en la disminución de parámetros de estrés oxidativo, tales como niveles de oxidación de proteínas y glutatión (Fernandez *et al.*, 2008).

Los corticoides presentan funciones reguladoras del metabolismo y antiinflamatorias. Éstos también atraviesan la membrana celular para interactuar con receptores intracelulares de esteroides los que se unen a GRE en el DNA (Schoneveld *et al.*, 2004). Los corticoides suprimen a genes proinflamatorios regulados por factores de transcripción tales como NF- κ B y AP-1. Por otro lado, pueden actuar con su receptor en forma directa para la transcripción de genes antiinflamatorios como la fosfatasa-1, la cual inhibe a la proteína quinasa MAPK (Barnes, 2011). El tratamiento con metilprednisolona previo a resección hepática redujo los niveles de transaminasas séricas, bilirrubina total, antitrombina III, el tiempo de protrombina, IL-6 y TNF- α . Esto último sugiere que el tratamiento previo con corticoides es potencialmente protector frente a la lesión por IR y puede contribuir a la homeostasis coagulación/anticoagulación, además de tener efectos antiapoptóticos y antinecróticos (Pulitano *et al.*, 2007).

En la Unidad de Patología Hepática Experimental de la Universidad de Chile, lugar donde se desarrolló ésta tesis, se implementó el protocolo hormonal con T₃ y MP en ratas tanto en forma separada como conjunta. Su administración se hizo 48h antes de inducir isquemia tibia basándose en el marco temporal de precondicionamiento (Fernandez *et al.*, 2007). La evaluación posterior se llevó a cabo a las 3 y 20h de reperusión. Los resultados obtenidos (datos no publicados) demostraron que, en el grupo de 3h de reperusión, la combinación de estas hormonas no disminuyó los niveles de transaminasas como marcadores de daño. Sin embargo, a las 20h se observó un incremento significativo de los niveles de transaminasas en el grupo que sólo recibió el pretratamiento combinado, respecto del grupo de laparotomía simulada.

Se concluyó que el modelo hormonal combinado administrado 48h antes de isquemia, no resultaría hepatoprotector. Se planteó disminuir el tiempo de pretratamiento a 2h previo al inicio de IR fundamentalmente porque en la práctica clínica los protocolos en trasplantes humanos se cumplen dentro de las primeras 8h tras declarada la muerte cerebral. No obstante, en análisis posteriores se observó que el pretratamiento de T₃ 2h y con MP 3h antes, por separado, disminuía los niveles de transaminasas respecto de sus controles (datos no publicados).

De acuerdo a los antecedentes expuestos, en ésta tesis se evaluaron los efectos de un protocolo de resucitación hormonal combinado de MP + T₃ sobre la función de las CK y parámetros de estrés oxidativo, estado proinflamatorio y daño hepático.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis.

La administración del protocolo hormonal MP+T₃, previo al periodo de perfusión en el sistema de hígado perfundido aislado, preserva la estructura del órgano asociándose a la disminución de los niveles de parámetros relacionados con el estrés oxidativo.

2.2 Objetivo General.

Evaluar el efecto del protocolo hormonal MP + T₃ en hígados normales, en el modelo de hígado perfundido aislado de rata, en relación a la función de la célula de Küpffer y parámetros de estrés oxidativo, estado proinflamatorio y daño hepático.

2.3 Objetivos Específicos.

- Determinar la actividad de células de Küpffer evaluando la respuesta respiratoria y el consumo de carbono coloidal.

- Evaluar parámetros de estrés oxidativo tisular, a través de la determinación de niveles de proteínas oxidadas, GSH y tinción inmunohistoquímica para 8-OHdG.
- Estudiar cambios en parámetros inflamatorios a través de la medición de niveles de citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 en tejido hepático a través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).
- Valorar el grado de daño hepático a través de la liberación de LDH en el perfusado e histología hepática mediante la tinción con hematoxilina-eosina.

III. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas machos de la cepa *Sprague Dawley* (Bioterio Central, ICBM Facultad de Medicina, Universidad de Chile) con un peso corporal entre 150-170 g. Fueron alimentadas con una dieta sólida estándar (Alimentos Champion S.A Santiago) y agua *ad libitum*, y se mantuvieron con temperatura ambiental controlada y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. El protocolo de tratamiento de los animales cumplió con las normas del “Comité de Bioética sobre investigación en animales” de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile aprobado por dicho comité (Número CBA N° 0310 FMUCH).

3.2. Drogas y tratamientos.

Los animales fueron sometidos a los siguientes tratamientos: triyodotironina y/o metilprednisolona. Los animales recibieron una inyección intraperitoneal de T₃ (Sigma, St. Louis, MO) 0,05 mg/Kg de peso corporal 2h antes del procedimiento quirúrgico y/o una inyección intraperitoneal de metilprednisolona (Solu-Medrol, Pfizer, Suiza) 34 mg/Kg de peso corporal, 3h antes del procedimiento quirúrgico de acuerdo al diseño experimental. Los animales control recibieron un volumen equivalente del o los vehículo(s)

correspondiente(s). Los animales fueron divididos en 3 grupos experimentales (n=3-5) y sus respectivos controles conformándose 6 grupos: (i) MP+T₃, (ii) vMP+NaOH, (iii) MP, (iv) vMP, (v) T₃ y (vi) NaOH (Fig. 1).

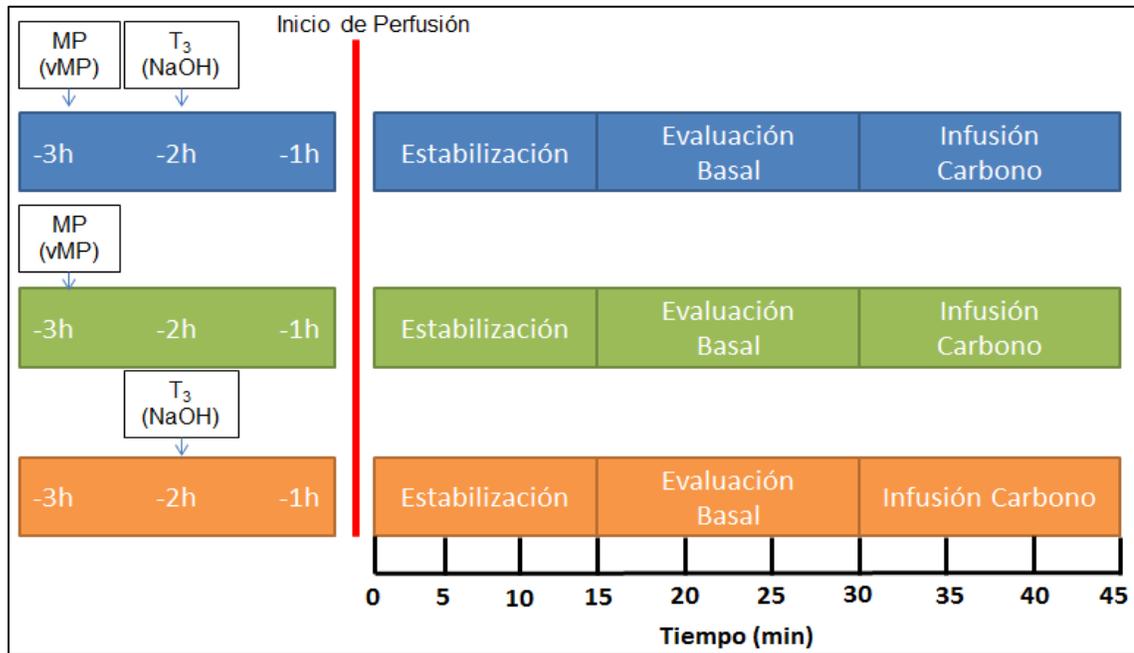


Figura 1: Diseño experimental. Se conformaron 3 grupos experimentales de animales pretratados con MP+T₃, MP o T₃ y sus respectivos controles (vMP+NaOH, vMP o NaOH). Se inyectaron dosis únicas de MP (o vMP) y/o T₃ (o NaOH) 3h y 2h antes del procedimiento quirúrgico.

3.3. Protocolo quirúrgico.

Los procedimientos se realizaron con técnica aséptica en animales anestesiados con 1 mL/Kg de Zoletil 50 (Zolazepam clorhidrato 50 mg/Kg y Tiletamina clorhidrato 50 mg/Kg; Virbac S/A, Carros, France) intraperitoneal. Se procedió al ayuno previo de 4 a 6h para facilitar la visualización de la triada portal. Se accedió a la cavidad abdominal y se inyectó 250 unidades de heparina sódica subcapsular en el bazo. Se expuso el hígado junto a su pedículo portal y se canuló la vena porta. A través de ésta, se procedió al lavado y perfusión con la solución Krebs-Henseleit (pH 7,4 a 37 °C) saturada con una mezcla de O₂/CO₂ al 95/5%. Posteriormente se canuló la vena cava superior. La solución administrada por vía porta y su salida por vena cava se mantuvo fuera del sistema hasta que el eflujo estuvo libre de sangre. Se extrajo el hígado con ambas cánulas insertas y se posicionó en un sistema no recirculante a un flujo constante (4 mL/g hígado/min) vía porta. Finalizada la perfusión se procedió a la obtención de muestras histológicas y el hígado se congeló con nitrógeno líquido a -80°C para su utilización en otros protocolos. La perfusión hepática se realizó según el método adaptado por nuestro laboratorio y descrito previamente (Tapia *et al.*, 1997).

3.4. **Actividad de células de Küpffer.**

3.4.1 **Consumo de oxígeno:** el perfusado liberado desde el hígado a través de la cánula en vena cava, fue analizado en forma continua con un electrodo de oxígeno tipo Clark antes (15 a 30 min de perfusión; QO_2 basal) y durante la infusión de CC (30 a 45 min de perfusión). La captación de O_2 se calculó a intervalos de 5 min a partir de las diferencias entre el influjo y eflujo tras los 15 min de calibración de la perfusión. El QO_2 inducido por CC fue calculado por la integración total del área bajo las respectivas curvas entre los 30-35, 30-40 y 30-45 min de perfusión.

3.4.2 **Captación de carbono coloidal:** la captación se evaluó durante la infusión continua de 0,5 mg de carbono/mL desde los 30 hasta los 45 min. Se tomaron muestras del eflujo a intervalos de 5 min para la determinación de la captación. La tasa de captación (mg/g de hígado/min) fue calculada a partir de la diferencia entre el influjo y eflujo de la concentración de carbono, medida por espectrofotometría a 623 nm.

3.5. Determinación de parámetros de estrés oxidativo.

3.5.1 **Contenido de proteínas oxidadas:** muestras de tejido previamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C fueron tratadas con 2,4-dinitrofenilhidrazina para formar una base de Schiff y su correspondiente hidrazona. Esto fue medido espectrofotométricamente entre 350 y 390 nm para determinar concentración de carbonilos y a 280 nm la concentración total de proteínas. Los valores fueron expresados como nmol/mg de proteínas hepáticas (Reznick *et al.*, 1994).

3.5.2 **Glutación total hepático:** el contenido de GSH se midió utilizando el *Glutathione Assay Kit*® (Catalog No703002, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). El grupo sulfhidrilo de GSH reacciona con DTNB (reactivo de Ellman's) generando un disulfuro GSTNB (GSH más TNB [ácido 5-tio-2-nitrobenzoico]). Éste es reducido por la glutación reductasa para reciclar GSH y producir más TNB. El TNB producido es directamente proporcional a la concentración de glutación en la muestra. La densidad óptica se detectó a 420 nm. Las mediciones se realizaron por duplicado y los resultados corresponden a promedios expresados en μ moles de glutación/g hígado.

3.5.3 Inmunohistoquímica de 8-OHdG: la tinción inmunohistoquímica para 8-OHdG 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 EDTA 1X (10mM de Citrato de Sodio 0,05% Tween-20) por 45 min a 95°C. Previo a la tinción, se bloqueó la biotina y peroxidasas endógenas con *Biotin Blocking System* y H₂O₂ 3%, respectivamente. (Dako, California, USA). La incubación con el anticuerpo primario (*Anti-8 Hydroxyguanosine antibody* [15A3], Abcam) se realizó a 4°C toda la noche. Luego de lavar, el revelado se realizó con la técnica de streptavidina-biotina-diamino benzidina (LSAB, DAKO, USA), contrastado con hematoxilina de Mayer. Las muestras se analizaron con microscopio óptico Olympus CX 31.

3.6. Determinación de parámetros inflamatorios.

Niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias: se extrajo mRNA con un kit comercial (E.Z.N.A.® *Tissue* RNA Kit, Omega Bio-tek, Georgia, USA) utilizando las instrucciones del proveedor. El RNA total extraído se cuantificó espectrofotométricamente (260 y 280nm) y se calculó la relación 260:280nm (RNA:Proteínas) para determinar el grado de pureza. Se determinó la

concentración de RNA total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) utilizando el valor de absorbancia a 260nm, el factor de dilución y la referencia de que una solución de RNA con densidad óptica de 1,0 corresponde a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ según la siguiente ecuación: $\text{RNA } (\mu\text{g}/\text{mL}) = \text{Abs } 260 \times 500 \text{ Factor dilución} \times 40 \mu\text{g}/\text{mL}$. 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.

Para la síntesis de cDNA a partir del mRNA se usó el sistema Super Script II $\text{\textcircled{R}}$ (*Invitrogen Life Technologies Inc., CA, USA*). Se utilizaron hexanucleótidos al azar como partidores (*Random Primers*), dNTP (10mM), DTT 0,1 M; RNasa H (40U/ 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 recurriendo al sistema GoTaq $\text{\textcircled{R}}$ (Promega, Madison, USA) y partidores específicos para los genes 18s (sentido 5'-GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA-3' y antisentido 5'-TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG-3'), TNF- α (sentido 5'-AAA TGG GCT CCC TCT ATC AGT TC-3' y antisentido 5'-TCT GCT TGG TGG TTT GCT ACG AC-3') e IL-6 (sentido 5'-TCC TAC CCC AAC TTC CAA TGC TC-3' y antisentido 5'-TTG GAT GGT CTT GGT CCT TAG CC-3'). Se utilizó un termociclador (TPersonal Biometra $\text{\textcircled{R}}$, 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,

visualizándose las muestras por tinción con bromuro de etidio. Como control se utilizó 18s de 350pb. Las bandas se analizaron por densitometría gracias al programa *Scion Image*. La cuantificación se realizó de acuerdo a la relación TNF- α /18s o IL-6/18s, según corresponda, expresándose los valores como unidades densitométricas.

3.7. Determinación de parámetros de daño hepático.

3.7.1 **Lactato deshidrogenasa en perfusado:** las muestras fueron obtenidas a partir del minuto 15, a intervalos de 5 min. Éstas fueron filtradas y congeladas a -20°C para su procesamiento posterior. Al descongelar, se agregó buffer fosfato salino 0,05 M a pH 7,5 (K_2HPO_4 3,8 g + KH_2PO_4 0,5 g + piruvato de sodio 0,0345 g) + 3 gotas de cloroformo. El blanco fue realizado con 3 mL de buffer + 0,1 mL de muestra + 0,03 mL de agua bidestilada. Luego de preparadas las muestras se agregó una solución de NADH (0,014 g + 0,015 g de NaHCO_3 en 1,5 mL agua) y se procedió a su lectura por absorbancia a 340 nm por espectrofotometría. La actividad de LDH se expresó en mU/g hígado/min.

3.7.2 **Histología hepática:** se utilizó microscopía óptica para analizar cortes de hígado fijados en formalina tamponada (10%), incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina eosina. Se evaluaron 10 campos de aumento mayor aleatorios y el análisis se expresó de acuerdo al puntaje de daño histológico modificado de Korourian (Korourian *et al.*, 1999). Esto otorga puntaje de 1 a 4 a las zonas con daño según la siguiente pauta (Tabla 1):

Tabla 1. Puntaje para daño histológico (Korourian *et al.*, 1999).

| PUNTAJE | AREA DE DAÑO | DESCRIPCIÓN |
|---------|--------------|--|
| 1 | 0-4% | Daño ocasional |
| 2 | 5-10% | Daño frecuente |
| 3 | 11-24% | Focos pequeños de daño/necrosis |
| 4 | ≥25% | Aglomerados de 10 o más hepatocitos necróticos |

3.8. Cálculo del tamaño muestral.

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó el programa estadístico *G*Power* versión 3.1.5 desarrollado por la Universidad de Düsseldorf, Alemania. Se decidió utilizar como variable crítica un factor correspondiente a daño por estrés oxidativo en el cambio en los niveles de proteínas oxidadas en un estudio en ratas *Wistar* intoxicadas con Paraquat y tratadas con corticoides (Dinis-Oliveira *et al.*, 2006). Para este fin se recurrió a la ecuación para determinar el tamaño de medias independientes:

$$n = \frac{2s^2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{d^2}$$

La desviación estándar (s) obtenida fue de 0,202; correspondiente a la desviación en los niveles de proteínas oxidadas en ratas sometidas a *paraquat* y corticoides. Por la naturaleza del experimento se utilizó un error tipo alfa de 10% y tipo beta de 30%, con una potencia del 70%. La razón de ésta decisión es que al utilizar los parámetros estándares, el tamaño muestral resultaría con un número aproximado de 88 animales por grupo, lo cual sería excesivo para el experimento debido a la complejidad de su preparación. La diferencia mínima detectable (d) se estableció en 0,3. Los valores para $Z_{\alpha/2}$ y Z_{β} fueron 1,645 y 0,524, respectivamente; en donde Z corresponde a la distancia, expresada en

desviaciones estándar, en que se aleja la variable de la media. Con estas variables, el cálculo final de tamaño muestral fue de 4,27 animales por grupo experimental. Por motivos de procedimiento, se utilizaron entre 3 a 5 animales por grupo.

3.9. **Análisis estadístico.**

Los resultados obtenidos se expresaron como el promedio de 3 a 5 determinaciones, más o menos el error estándar de la media. Con los datos obtenidos en los parámetros de estrés oxidativo, inflamatorios y en el puntaje de daño hepático, se realizó la normalización de éstos a través de la división de los datos de cada grupo pretratado y control frente al promedio obtenido para el grupo control correspondiente.

Para determinar si las diferencias entre los grupos experimentales fueron significativas se aplicó la prueba t de Student unilateral con un nivel de significación de 5% y un intervalo de confianza del 95%. Adicionalmente, se aplicó el test ANOVA para evaluar diferencias en el tiempo en relación a la velocidad de consumo de oxígeno (GraphPad Prisma versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

IV. RESULTADOS

4.1 Determinación de la actividad de células de Küpffer.

Estimación de respuesta respiratoria: se evaluó el QO_2 inducido por CC según lo detallado en metodología (punto 3.4). Tras la infusión de CC se produjo un aumento en el QO_2 en todos los grupos, correspondiente a una RR de $3,7 \pm 1,7$; $5,8 \pm 0,6$ y $3,2 \pm 0,8$ $\mu\text{moles de } O_2/\text{g hígado}$ para MP+T₃, MP y T₃, respectivamente (Fig. 2). El análisis estadístico en los diferentes periodos de tiempo no demostró diferencias significativas entre los grupos en el QO_2 basal ni en el inducido en el periodo de infusión con CC. Al estimar la RR neta por la integración del AUC de QO_2 durante el tiempo de infusión de CC, ésta tampoco presentó cambios significativos en los diferentes grupos frente a sus controles. Para determinar diferencias durante el tiempo de perfusión del QO_2 , se aplicó el test de ANOVA. Las diferencias entre los grupos en tratamiento frente a sus controles no fueron significativas.

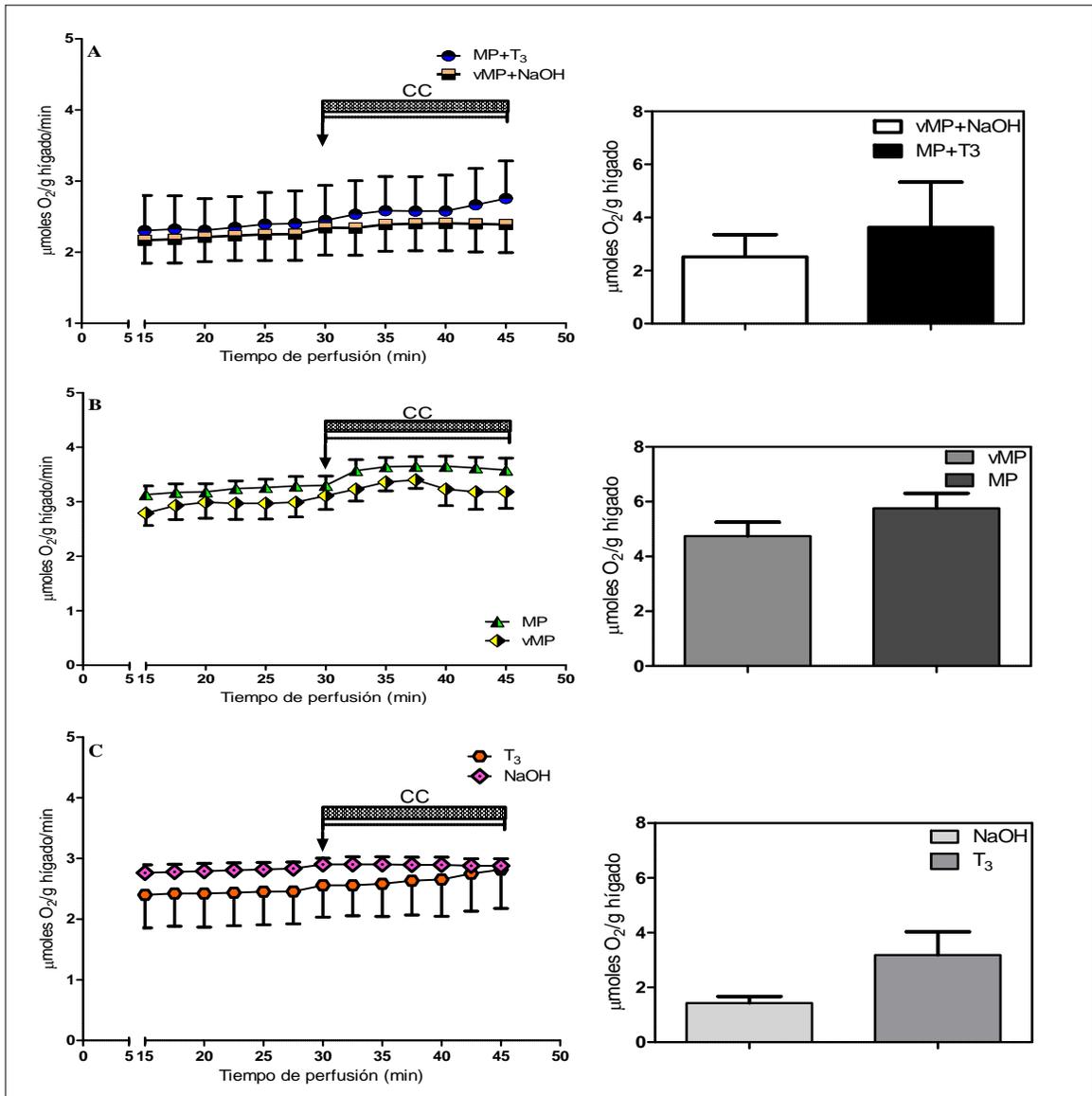


Figura 2. Efecto del pretratamiento hormonal sobre la velocidad de consumo de oxígeno basal e inducido por CC en hígado de rata perfundido aislado. Tasa de QO_2 expresada en $\mu\text{moles de } O_2/\text{g de hígado}/\text{min}$ para los grupos (A) MP+T₃ (n=4) vs vMP+NaOH (n=5); (B) MP (n=3) vs vMP (n=4) y (C) T₃ (n=4) vs NaOH (n=5). Los datos corresponden al promedio \pm ESM para 3-5 animales por grupo. Al evaluar la RR neta (ΔQO_2 ; $\mu\text{moles de } O_2/\text{g de hígado}$) no se registraron diferencias significativas con prueba t de Student unilateral (NS). Flecha indica inicio de infusión de CC y barra su duración.

Evaluación de la respuesta fagocítica: la velocidad de captación de CC también fue evaluada en función del tiempo de infusión, representando la capacidad fagocítica de las CK. La velocidad de captación fue graficada en mg de CC/g hígado/min. Tras la infusión de CC se apreció una estabilización en la captación de éste con el transcurrir de la perfusión. El análisis demostró que la velocidad de captación se mantuvo constante para todos los grupos y no se encontraron diferencias significativas en cada intervalo de tiempo (NS) (Fig. 3).

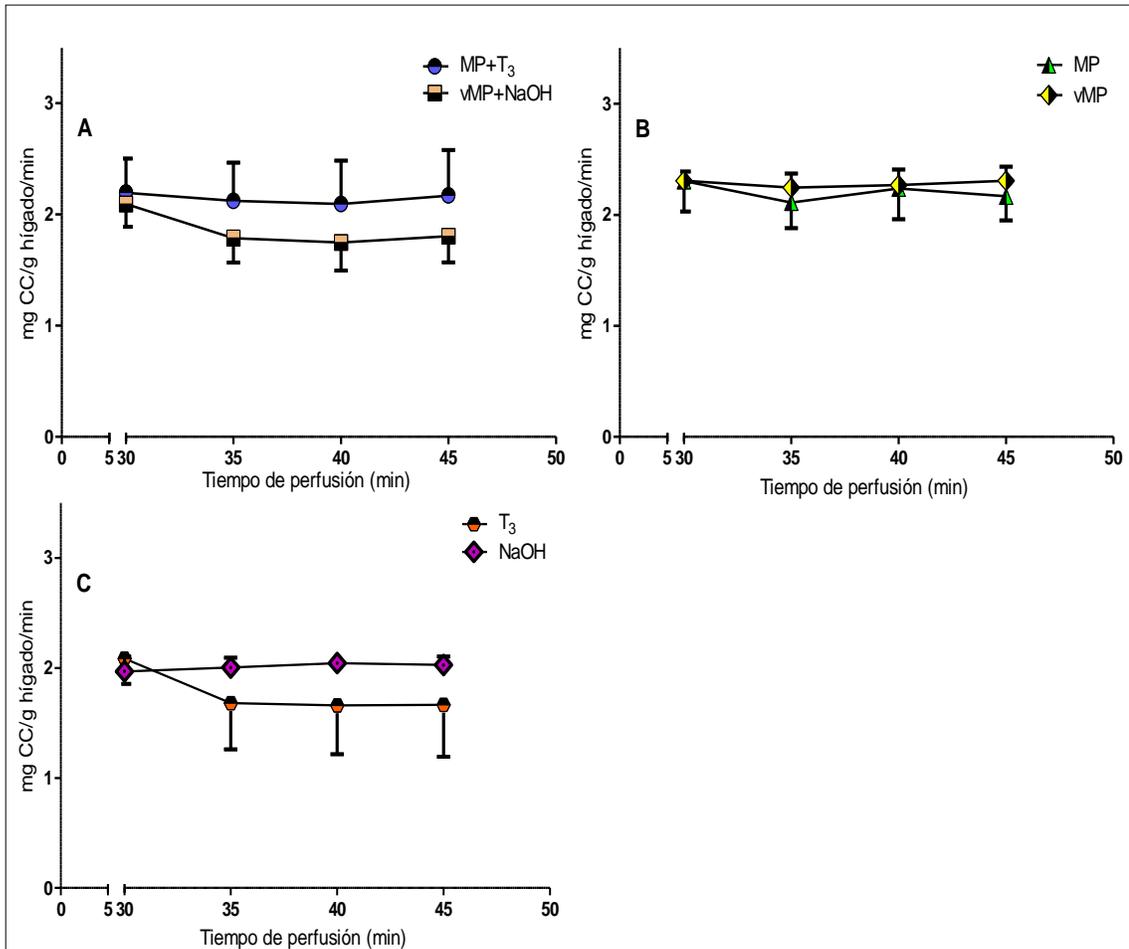


Figura 3: Efecto del pretratamiento hormonal sobre la velocidad de captación de CC en función del tiempo de infusión en hígado perfundido de rata. Tasa de captación expresada en mg de CC/g de hígado/min para los grupos (A) MP+T₃ (n=4) vs vehículo (n=5); (B) MP (n=3) vs vehículo (n=4) y (C) T₃ (n=4) vs NaOH (n=5). Los datos corresponden al promedio ± ESM para 3-5 animales por tratamiento. No se registraron diferencias significativas en cada punto de tiempo con prueba t Student (NS).

4.2 Determinación de parámetros de estrés oxidativo.

Medición de proteínas oxidadas: los niveles de proteínas oxidadas en tejido hepático fueron expresados en nmol por mg de proteínas. Se observó la presencia de oxidación proteica en todos los grupos. Los valores obtenidos en el grupo combinado MP+T₃ no tuvieron diferencias significativas frente a su control al presentar $3,63 \pm 0,42$ versus $4,28 \pm 0,43$ nmol/mg de proteínas respectivamente (NS). Lo mismo se observó en el grupo de T₃ en comparación con su vehículo, con valores de $3,34 \pm 0,45$ versus $3,68 \pm 0,50$ nmol/mg de proteínas. En tanto el grupo pretratado con MP presentó menores niveles de proteínas oxidadas frente a su control con valores de $3,20 \pm 0,46$ versus $4,48 \pm 0,35$ nmol/mg de proteínas, respectivamente ($p < 0,05$). Se presentan los datos normalizados según metodología (punto 3.9) (Fig. 4).

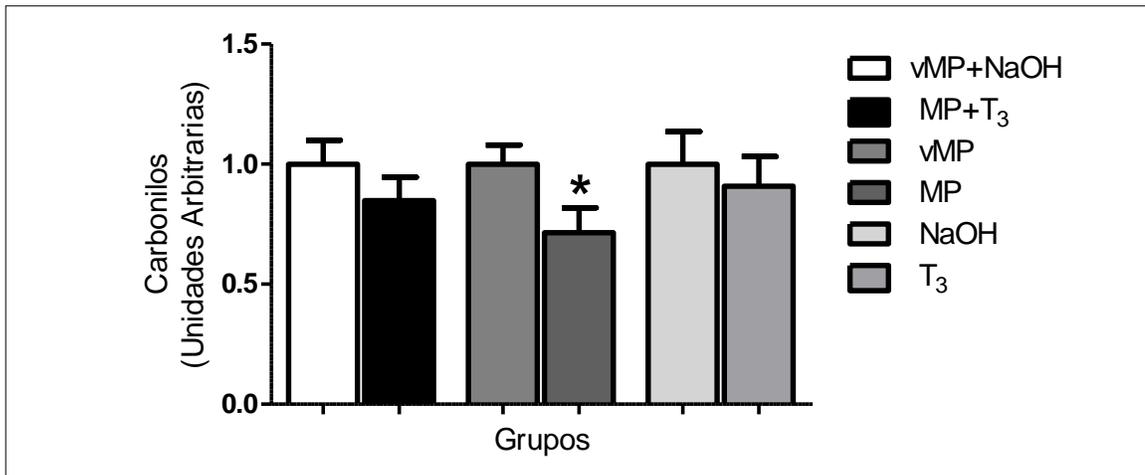


Figura 4: Efecto del pretratamiento hormonal sobre niveles de proteínas oxidadas. Niveles promedio expresados en nmol por mg de proteínas por grupos experimentales como medida de estrés oxidativo para grupos vMP + NaOH (n=5) vs MP+T₃ (n=4); vMP (n=4) vs MP (n=3) y NaOH (n=5) vs T₃ (n=4). Los datos corresponden al promedio \pm ESM para 3-5 animales por grupo. Se registraron diferencias significativas con prueba t de Student unilateral en donde * = $p < 0,05$ frente a vMP. Valores normalizados.

Medición de Glutación hepático: se evaluó el contenido tisular de GSH como parámetro representativo de la capacidad antioxidante hepática. Los niveles de GSH observados en los diferentes grupos pretratados no presentaron diferencias significativas frente a sus respectivos controles en el curso temporal del estudio. Los valores obtenidos se expresaron en μ moles/g hígado y correspondieron a: MP+T₃= $4,1 \pm 0,07$; vMP+NaOH= $4,09 \pm 0,12$; MP= $4,15 \pm 0,05$; vMP= $4,26 \pm 0,29$; T₃= $4,2 \pm 0,07$ y NaOH= $4,27 \pm 0,07$ (Fig. 5). Se presentan los datos normalizados.

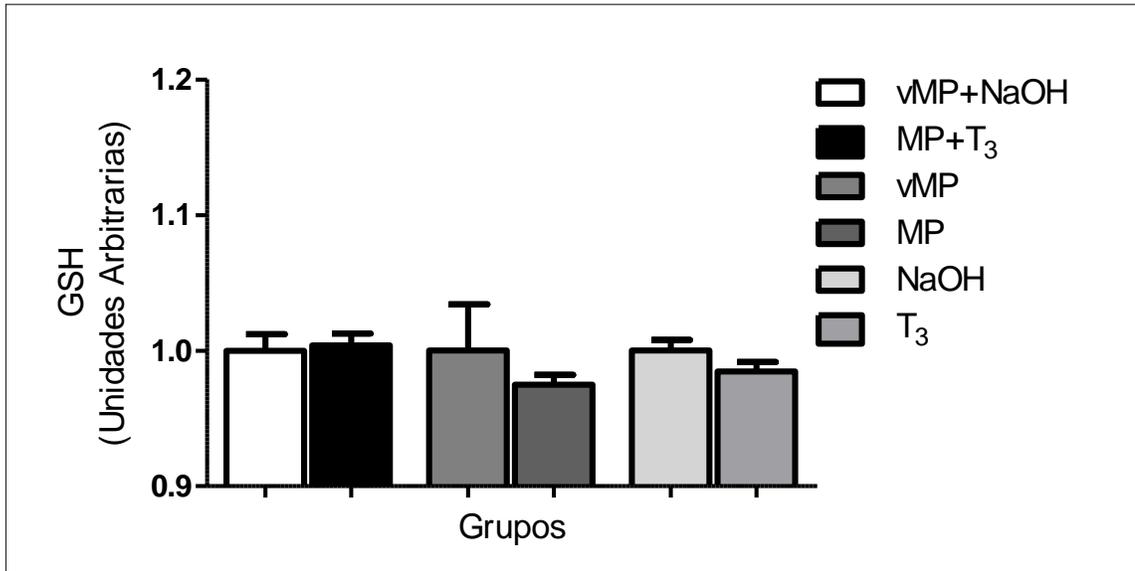


Figura 5: Efecto del pretratamiento hormonal sobre contenido hepático de GSH total por grupos experimentales en hígado perfundido aislado de rata. Niveles promedio expresados en μ moles de GSH/ g de hígado para grupos vMP + NaOH (n=5) vs MP+T₃ (n=4); vMP (n=4) vs MP (n=3) y NaOH (n=5) vs T₃ (n=4). Los datos corresponden al promedio \pm ESM para 3-5 animales por grupo (t Student unilateral; NS). Valores normalizados.

Para una mejor comprensión del efecto del pretratamiento hormonal sobre los parámetros de estrés oxidativo se analizó la relación entre las proteínas oxidadas y el GSH total obteniéndose un índice del estrés oxidativo en el órgano. No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con el protocolo hormonal frente a sus controles (Fig. 6).

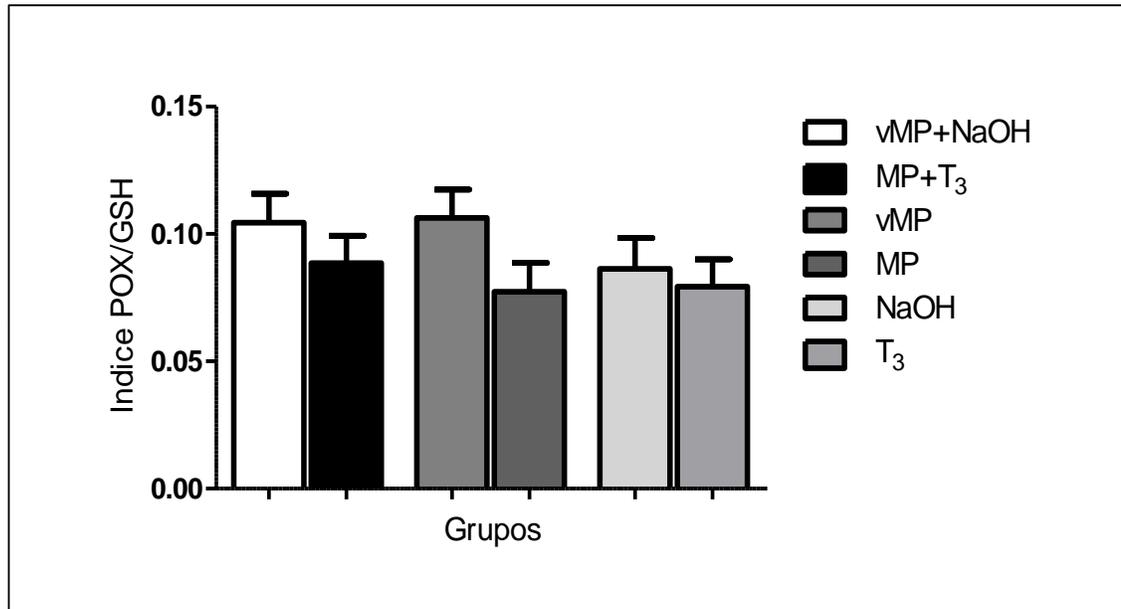


Figura 6: Índice de proteínas oxidadas/GSH total hepático por grupos experimentales en hígado perfundido aislado de rata. Grupos vMP + NaOH (n=5) vs MP+T₃ (n=4); vMP (n=4) vs MP (n=3) y NaOH (n=5) vs T₃ (n=4). Los datos corresponden al promedio ± ESM para 3-5 animales por grupo (t Student unilateral; NS).

Evaluación de daño en DNA por inmunohistoquímica: la presencia de alteraciones oxidativas a nivel de DNA se determinó por la presencia de 8-OHdG a través de inmunohistoquímica. El control positivo utilizado fue útero infartado de rata, el cual demuestra la presencia de inmunotinción positiva principalmente a nivel nuclear. Para todos los grupos pretratados y sus controles se apreció tinción positiva de ubicación citosólica. No se observó tinción nuclear (Fig. 7)

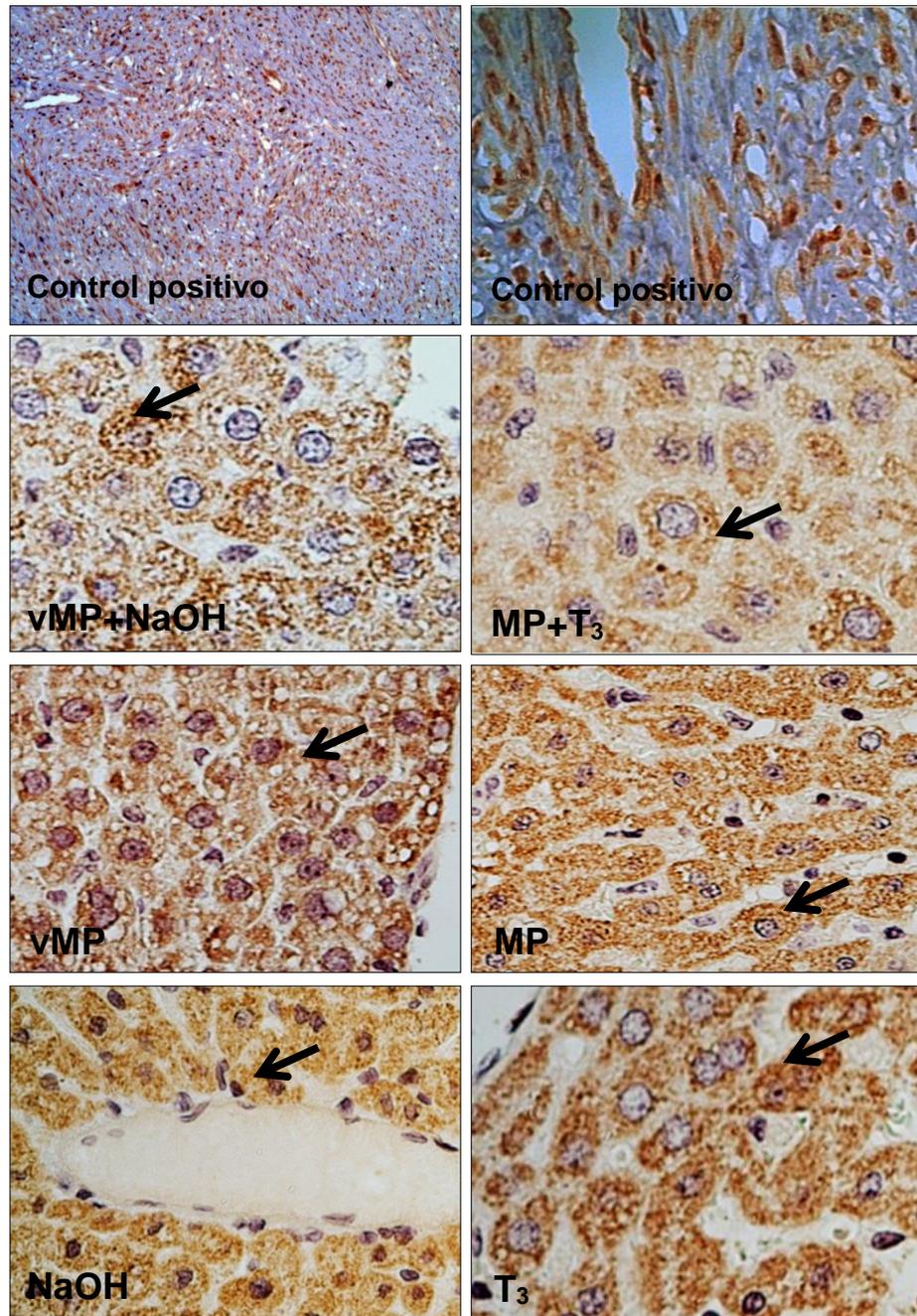


Figura 7: Efecto del pretratamiento hormonal sobre daño a nivel de DNA por inmunohistoquímica. Microfotografías representativas de cortes histológicos de hígado teñidos con inmunohistoquímica para 8-OHdG de control positivo (20x y 40x) y los distintos grupos experimentales (400x). Flechas: tinción citosólica de 8-OHdG.

4.3 Determinación de parámetros inflamatorios: niveles de expresión de citoquinas TNF- α e IL-6.

No se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos en los grupos experimentales y sus controles en la determinación de los niveles de mRNA hepático de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6. (Fig.8).

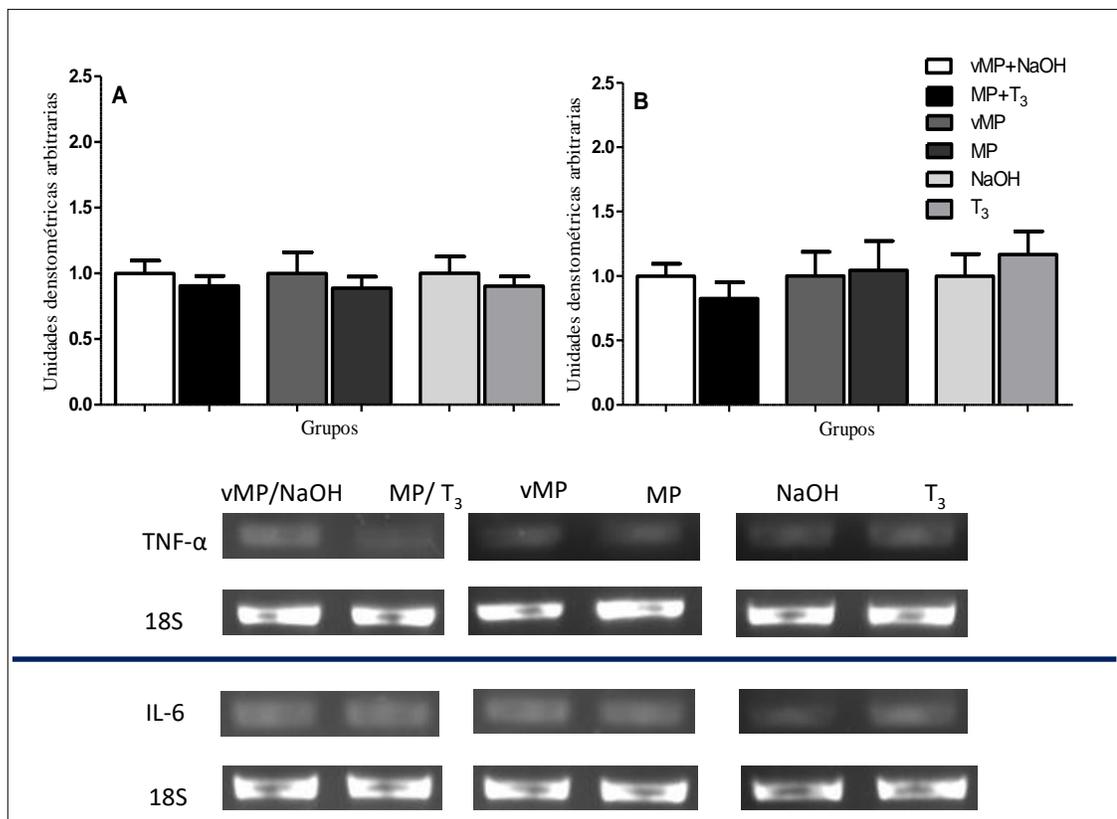


Figura 8: Efecto del pretratamiento hormonal sobre niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias. Valores obtenidos por cuantificación densitométrica a partir de PCR para (A) TNF- α y (B) IL-6 para grupos vMP + NaOH (n=5) vs MP+T₃ (n=4); vMP (n=4) vs MP (n=3) y NaOH (n=5) vs T₃ (n=4). Los valores corresponden a los promedios \pm E.S.M para 3-5 animales por grupo (t Student unilateral, NS). Valores normalizados.

4.4 Determinación de parámetros de daño hepático.

Medición de niveles de LDH en perfusado: se procedió a determinar la velocidad del eflujo sinusoidal de LDH (mU/g de hígado/min) como marcador de daño celular tras su liberación al perfusado en función del tiempo de infusión con CC. La actividad total de LDH fue calculada por la integración de los valores de AUC tanto en el periodo basal como postinfusión de CC. Durante el periodo basal los valores de eflujo sinusoidal de LDH obtenidos en los grupos pretratados hormonalmente mostraron diferencias no significativas frente a los valores obtenidos en sus respectivos controles (datos no graficados). Tras la infusión de CC y hasta el término de éste, la actividad de LDH obtenida en perfusado fue en promedio de $3.163 \pm 350,5$ mU/g de hígado/min para MP+T₃ y $4.609 \pm 513,7$ mU/g de hígado/min para vMP+NaOH, diferencia que fue estrictamente significativa ($p < 0,05$). Para MP y vMP los valores fueron de $4.342 \pm 77,67$ mU/g de hígado/min y 6.033 ± 1.049 mU/g de hígado/min respectivamente ($p < 0,05$), en tanto para T₃ y NaOH los valores obtenidos fueron $3.783 \pm 243,2$ mU/g de hígado/min y $4.082 \pm 188,7$ mU/g hígado/min respectivamente (NS). Se muestran los datos normalizados. (Fig. 9).

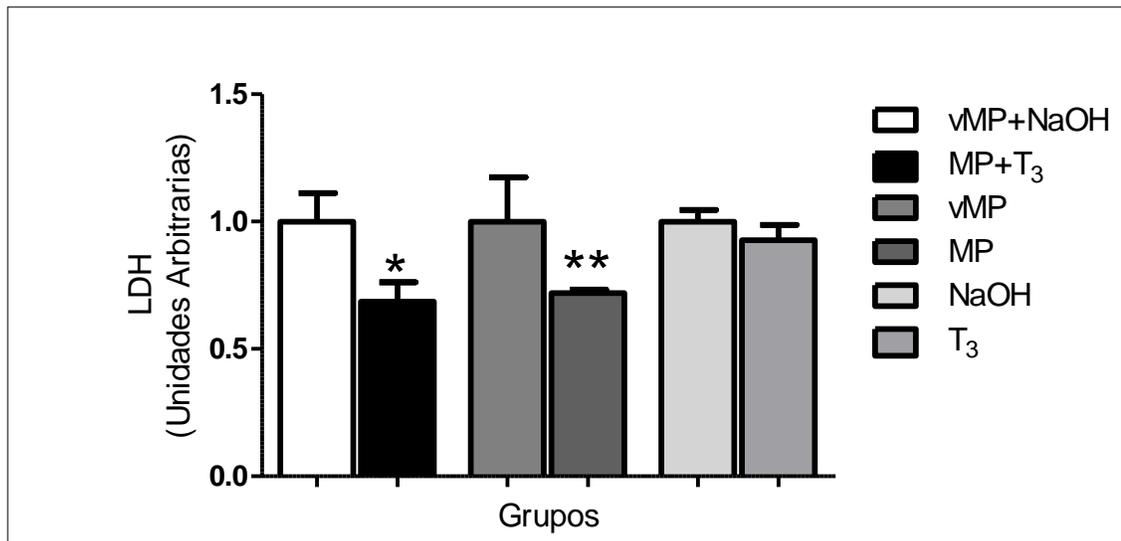


Figura 9: Efecto del pretratamiento hormonal sobre el eflujo sinusoidal de LDH tras infusión de CC. Actividad total de LDH en hígado perfundido aislado de rata para grupos vMP + NaOH (n=5) vs MP+T₃ (n=4); vMP (n=4) vs MP (n=3) y NaOH (n=5) vs T₃ (n=4). Los datos corresponden al promedio ± ESM para 3-5 animales por grupo. Diferencia significativa con prueba t Student unilateral en donde * = p<0,05 frente a vMP+NaOH y ** = p<0,05 frente a vMP. Valores obtenidos en mU/g hígado/min, pero agrupados y normalizados.

Evaluación histológica de daño hepático: se evaluaron 3 a 4 cortes histológicos por grupo experimental en los cuales se analizó arquitectura hepática y se aplicó una puntuación de daño tisular como se mencionó en metodología (punto 3.7.2). Las principales alteraciones estructurales identificadas correspondieron a degeneración citoplasmática vacuolar en hepatocitos y acúmulos de hepatocitos con núcleos picnóticos e hipercromáticos, y focos de necrosis. Las alteraciones estructurales en grupos pretratados y vehículos se localizaron principalmente en zonas pericentrales de los lobulillos hepáticos. Cualitativamente se apreció una mejor preservación de

la estructura hepática en los cortes de animales pretratados hormonalmente, destacando el tratamiento con MP+T₃ menores alteraciones tisulares frente a su vehículo vMP+NaOH (Fig.10).

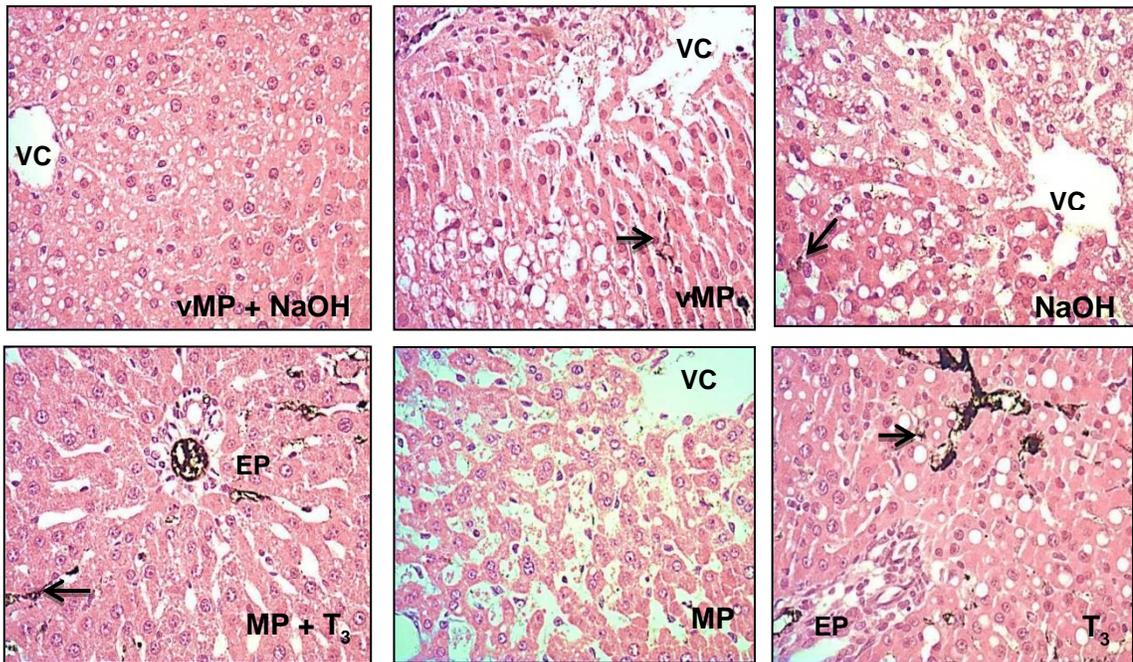


Figura 10: Efecto del pretratamiento hormonal sobre daño hepático evaluado por histología.

Imágenes representativas de cortes histológicos hepáticos de los grupos experimentales y controles sometidos a tinción con Hematoxilina-Eosina (400x). VC: vena central, EP: espacio porta; las flechas indican agregados de CC.

Para corroborar lo observado en histología se aplicó una puntuación de daño estructural de 1 a 4 según lo descrito en metodología (Tabla 1). Los resultados se muestran en la figura 11. Los puntajes obtenidos fueron: $1,475 \pm 0,10$ para el grupo MP+T₃ y $2,30 \pm 0,17$ para vMP+NaOH ($p < 0,01$). Para MP el puntaje obtenido fue $1,20 \pm 0,12$ y para vMP $2,30 \pm 0,22$ ($p < 0,01$). Para el grupo T₃ el puntaje fue $1,94 \pm 0,14$ en comparación a $2,95 \pm 0,14$ valor obtenido para el grupo NaOH ($p < 0,01$).

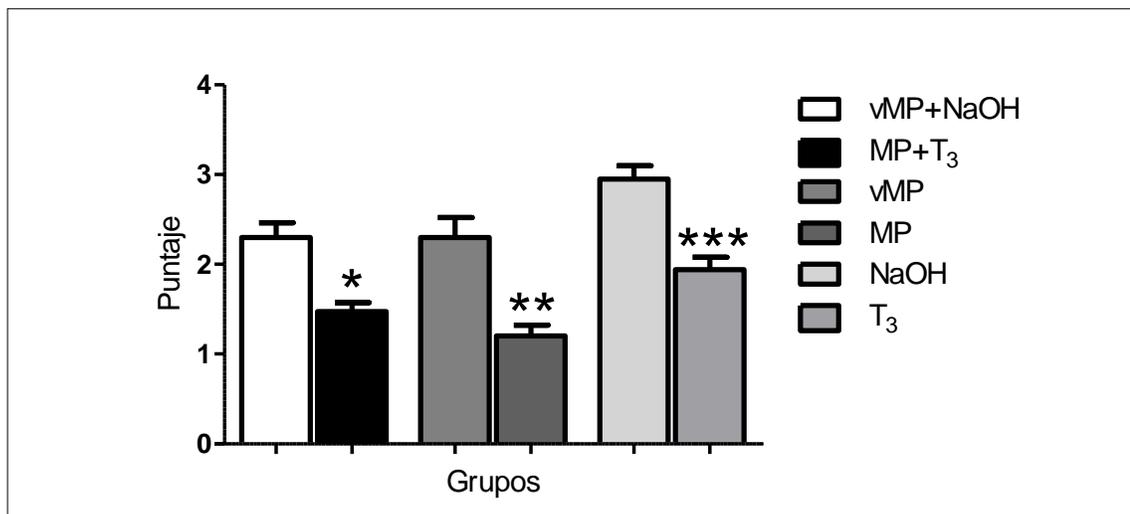


Figura 11: Efecto del pretratamiento hormonal sobre daño hepático evaluado por histología según puntaje de daño. Cuantificación de daño en histología hepática. Los análisis efectuados se realizaron según el score modificado de Korourian y cols para grupos vMP + NaOH (n=5) vs MP+T₃ (n=4); vMP (n=4) vs MP (n=3) y NaOH (n=5) vs T₃ (n=4). Los datos corresponden al promedio ± ESM para 3-5 animales por tratamiento. Se registraron diferencias significativas con prueba t de Student unilateral en donde *: $p < 0,01$ frente a vMP+NaOH, **: $p < 0,01$ frente a vMP y ***: $p < 0,01$ frente a NaOH.

V. DISCUSIÓN

El estudio tanto de la fisiología como fisiopatología hepática comprende variadas técnicas desarrolladas *in vivo* como *in vitro*. Dentro de estas técnicas, la perfusión aislada ha sido ampliamente aceptada y sigue vigente desde que fue descrita por primera vez (Mischinger *et al.*, 1992). En el modelo de HPA la función de la CK se estudia a través de la evaluación de la RR, que se induce con la infusión de CC, el que estimula la actividad fagocítica. Se ha determinado que el CC es captado por el 90% del hígado, lo cual estimula el QO₂ a los 2 min desde la infusión. La captación de CC puede prolongarse hasta por 3h (Cowper *et al.*, 1990). Este comportamiento se confirmó en nuestro modelo al observar un aumento progresivo del QO₂ desde el nivel basal en todos los grupos sometidos a la infusión con CC (Figura 2), manteniéndose también una captación constante de CC en el tiempo (Figura 3). La ausencia de diferencias significativas entre los diversos grupos pretratados se debe a que ninguno de los tratamientos afecta la respuesta de las CK frente a la captación de CC. Respecto a MP, se ha descrito que los glucocorticoides pueden presentar efectos inmunopermisivos en macrófagos induciendo la producción de ROS (Shi *et al.*, 2011). Este efecto no fue observado en nuestros resultados tal vez debido a la baja concentración que MP alcanza a nivel del órgano al ser administrado por vía intraperitoneal o intravenosa, esto debido al gran volumen de distribución de MP en el cuerpo del animal (2290 mL/Kg) además de poseer

un elevado *clearance* (125 mL/min/Kg) (Zhang *et al.*, 2001). Se ha descrito que MP tendría una biodisponibilidad incompleta al administrarse en forma oral (10%) o intravenosa (50%) como prodroga (Kong *et al.*, 1991). En lo referente a la hormona T₃, su aplicación en el modelo de HPA ha demostrado que incrementa el QO₂ hepático, asociado a la inducción de termogénesis. No obstante, tales observaciones se describen tras la administración en días consecutivos y en una dosis que dobla a la utilizada en este estudio (Fernandez *et al.*, 1993).

La actividad de las CK se manifiesta por una RR iniciada por la captación de CC, la cual se incrementa en forma progresiva en todos los grupos. La RR en las CK es consecuencia de la activación de la enzima NADPH oxidasa, cuya actividad está ligada a la producción de ROS (Decker, 1990). Estudios de IR en el sistema de hígado perfundido aislado han relacionado el aumento de la actividad de las CK con la patogénesis del daño celular por alteración de la membrana plasmática. Esta alteración sería secundaria al incremento en la producción de ROS debido principalmente a la activación de la enzima NADPH oxidasa. A esto se le sumaría la liberación de enzimas proteolíticas y citoquinas, que pueden gatillar la generación de ROS desde los hepatocitos (Ryma *et al.*, 1991).

La evaluación del estado de estrés oxidativo se realizó con la medición de niveles de proteínas carboniladas, glutatión hepático total y presencia de 8-OHdG por inmunohistoquímica. La oxidación proteica es una modificación irreversible a nivel de proteínas, resultante del daño oxidativo en las cadenas laterales de ciertos aminoácidos. La medición de los niveles de proteínas carboniladas es un marcador de oxidación proteica ampliamente utilizado (Dalle-Donne *et al.*, 2009). La evidencia disponible ha descrito que en ratas sometidas a HPA la administración de T₃ aumenta los niveles de proteínas carboniladas a partir de las 6h desde la administración, obteniéndose valores significativamente elevados a las 12h de evaluación en comparación con los valores de animales controles (Fernandez *et al.*, 2007); mientras que en el caso de MP, al analizar muestras en un modelo experimental de daño en médula espinal, la administración de MP 30 mg/Kg previo al daño disminuye los niveles de proteínas oxidadas además de otros marcadores de estrés oxidativo 24h después del daño (Kalayci *et al.*, 2005). En nuestro modelo, los niveles de proteínas oxidadas en el grupo pretratado con MP disminuyeron en comparación a su control, lo que estaría acorde a lo observado en el modelo de daño medular. Sin embargo, el grupo T₃ no presentó una disminución significativa en los niveles de oxidación proteica en comparación a su grupo control.

Según lo anteriormente descrito, el hecho de no evidenciarse una disminución de este parámetro en nuestro modelo, podría deberse a que éste sería un efecto que se presentaría de forma tardía (Figura 4). Asimismo, el grupo combinado MP+T₃ tampoco presentó una disminución significativa frente a su control. Estos resultados sugieren que la administración conjunta de ambas hormonas podría enmascarar el efecto de MP.

GSH es un tripéptido constituido de glutamina, glicina y cisteína que además posee un grupo Tiol (SH). Éste es considerado uno de los antioxidantes más importantes a nivel hepático (Hudson, 2001). Normalmente en las células la relación entre GSH y su forma oxidada GSSG es mayor a 100, razón que disminuye en estados de estrés oxidativo (Cisneros *et al.*, 2011). Estudios previos del laboratorio han demostrado que T₃ puede reducir hasta en 56% el GSH hepático. Éste efecto es paralelo a la elevación del QO₂ observándose además un aumento del eflujo de GSH sinusoidal y de LDH. Tal hallazgo sugiere que esas pérdidas se deben a la permeabilización de la membrana celular en el contexto de la inducción del sistema enzimático NADPH oxidasa ligado a la producción de ROS en las CK. No obstante, los cambios anteriores sólo resultan apreciables desde el tercer día de tratamiento (Fernandez *et al.*, 1991). En relación a los corticoides, en ratas sometidas a ligadura del conducto biliar se observó que la administración de dexametasona durante 6 días aumentaba los niveles de GSH en tejido hepático (Olteanu *et al.*,

2012). Pero también se ha descrito que el pretratamiento con corticoides en un modelo de hepatotoxicidad por paracetamol en ratones reducía los niveles de GSH 24h después de la administración de paracetamol (Madhu *et al.*, 1992). Nuestra investigación no reveló cambios en los niveles de GSH en grupos tratados ni controles (Figura 5), lo cual puede deberse a que los cambios en este parámetro serían observables dentro de un rango de tiempo que puede variar entre 3 (Fernandez *et al.*, 1991) hasta 24h (Carrion *et al.*, 1993). También es probable que la relación intracelular GSSG/GSH se haya modificado, debido a la oxidación de GSH frente a la exposición de ROS durante un estrés oxidativo. Los ROS tienen una predilección por la oxidación del grupo Tiol de la cisteína, lo que genera una modificación reversible que se traduce en una respuesta celular temprana a un estrés oxidativo leve (Butterfield *et al.*, 2014). No obstante, es poco factible la pérdida de GSH al conjugarse con elementos electrofílicos (por ejemplo 4-hidroxinonenal) o xenobióticos, ya que estos se eliminarían como derivados el ácido mercaptúrico (Masella, 2009).

El desarrollo de estrés oxidativo provoca daño en el DNA y uno de los marcadores utilizados para evaluar este daño es 8-OHdG. La generación de ROS, en especial del radical hidroxilo, favorece el daño al DNA provocando quiebre de las cadenas y posterior oxidación de bases, lo que genera el 8-OHdG (Pilger *et al.*, 2006). El efecto hormonal en este marcador de daño también ha sido evaluado en una serie de estudios. En un estudio con ratas

pretratadas por 30 días con T₃ se ha observado que ésta hormona aumenta los niveles de 8-OHdG cuantificado por cromatografía (Lee *et al.*, 2007). Por su parte, un estudio con corticoides en un modelo de lavado broncoalveolar en ratas con inducción de estado asmático demostró que la administración de dexametasona 1h previo a la inducción del estado inflamatorio pulmonar disminuyó los niveles de 8-OHdG 24h después del desarrollo del estado asmático (Ho *et al.*, 2012). No obstante, estudios de médula ósea con administración de MP en ratas demostraron que ésta hormona aumenta el daño oxidativo a nivel de DNA nuclear en osteocitos, cambios detectables a partir del 5° día (Ichiseki *et al.*, 2005). La evaluación por tinción inmunohistoquímica de nuestras muestras fue negativa para 8-OHdG en el núcleo, observándose una tinción citoplasmática que interpretamos como inespecífica. Evaluamos la alternativa de tinción del DNA mitocondrial como reflejo de daño, lo que sería plausible en una célula rica en mitocondrias como el hepatocito, siendo además el patrón mitocondrial coincidente con lo observado en nuestras muestras (Nomoto *et al.*, 2008) (Figura 7). Sin embargo, consideramos que este resultado debería ser corroborado con co-tinción de una proteína de ubicación exclusivamente mitocondrial, con una técnica como inmunofluorescencia. Otra alternativa que puede explicar este resultado es que el daño al DNA ocurra a tiempos más tardíos de acuerdo a lo descrito por Jaeschke (Jaeschke, 2011). Según sus investigaciones, tras el desencadenamiento de un estado oxidativo celular por parte de macrófagos y/o neutrófilos, los ROS generados difundirían

a través de membranas celulares causando disfunción mitocondrial con la consecuente generación de ROS a este nivel.

El desarrollo de un estado inflamatorio fue evaluado a través de los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6, las que son liberadas desde las CK (Jaeschke, 2011). Se ha visto que la administración de T₃ aumenta los niveles de estas citoquinas, pero esto es un fenómeno progresivo que se hace evidente a las 12h (Fernandez *et al.*, 2006). Esto podría ser la causal de que no se pueda evidenciar cambios en los niveles de citoquinas en nuestros grupos bajo tratamiento hormonal (Figura 8). El grupo de Chimalakonda ha demostrado que MP logra inhibir la liberación de TNF- α en perfusado y en bilis, pero a partir de las 8h posteriores de su administración (Chimalakonda *et al.*, 2003).

La liberación de LDH al perfusado es un marcador utilizado como daño tisular (Ballas, 2013). Un estudio en animales demostró que la administración de T₃ produce un aumento de la fagocitosis de CC y de la RR, cuyo incremento se relaciona con el aumento del eflujo sinusoidal de LDH (Tapia *et al.*, 1997). Esto fue consistente con nuestros resultados en los grupos controles observándose además que los niveles de LDH en el perfusado no disminuyeron de forma significativa con T₃ (Figura 9). Por su parte, un estudio en hepatocitos aislados de ratas sometidos a toxicidad por cadmio demostró que corticoides

administrados 48h antes logran disminuir los niveles de LDH al igual que los parámetros de peroxidación lipídica. A la vez, la administración de corticoides mantiene elevados los niveles de glutatión y la razón GSH/GSSG (Ferrigno *et al.*, 2010).

En los protocolos de HPA, los hígados sometidos a 10 o 15 min de perfusión adquieren un color oscuro debido a la distribución uniforme del CC. En la literatura se describen alteraciones ultra estructurales en el modelo de HPA destacando cambios progresivos que llevan a la muerte celular principalmente en los hepatocitos de las zonas centrolobulillares luego de 2 a 4h de perfusión (al-Ali *et al.*, 1987). El presente estudio demostró la existencia de focos de daño histológico en todos los grupos, ubicados principalmente en las zonas pericentrales de los lobulillos hepáticos (Figura 10). Cualitativamente el grupo con pretratamiento combinado MP+T₃ es el que tuvo una mejor preservación de la estructura hepática. Cuantitativamente en todos los grupos pretratados se observó una disminución de la extensión del daño histológico frente a sus grupos controles, lo que fue menor en el grupo tratado con T₃ (Figuras 11). Una posible explicación de estos resultados radicaría en el efecto estabilizador de membranas biológicas e inmunomodulador que tendría MP (en contraparte a lo descrito anteriormente). T₃ podría provocar un estado de estrés oxidativo preacondicionante lo que sería hepatoprotector frente al daño posterior mediado por la liberación de ROS tras la activación de CK (Videla *et*

al., 2012). En el caso del pretratamiento combinado es posible que los efectos de MP predominen frente a los de T₃.

Es necesario mencionar que, si bien la RR de las CK es un proceso que implica la formación de ROS aumentando el estado pro-oxidativo a nivel celular, ésta también puede inducir respuestas adaptativas para la supervivencia hepatocelular, condicionada por la cantidad de ROS generada y el tiempo de exposición (Droge, 2002). La activación de las CK gatilla diversas cascadas de señalización en la que están implicados factores transcripcionales como NF-κB, AP-1 y STAT3. Estos activarían genes que regulan la respuesta del hígado frente a un estrés oxidativo moderado (Videla, 2010).

Los posibles mecanismos de acción de estas hormonas también han sido tema de estudio en diversos modelos experimentales. En lo referente a T₃, la evidencia actual señala que la administración de ésta hormona 72h antes de IR en ratas, presenta un efecto precondicionante. Este se traduce en una disminución de los niveles de proteínas oxidadas, mantención de los niveles de GSH hepático y menor porcentaje de necrosis a la histología. Estos hallazgos estarían relacionados con la inducción de un estado de estrés oxidativo moderado y transitorio que no provoca daño hepático. A su vez, T₃ permite la recuperación de la actividad de unión nuclear de los factores de transcripción NF-κB y STAT3 lo cual facilita la respuesta de fase aguda con la transcripción

génica de proteínas como haptoglobina y fibrinógeno, entre otras (Fernandez *et al.*, 2007).

En contraste con lo anterior, los efectos de T₃ a tiempos más tempranos (entre 2 a 6h) desencadenarían mecanismos citoprotectores a través de la activación del factor nuclear Nrf2, el cual es sensible a bajos niveles de ROS (Romanque *et al.*, 2011). La activación de Nrf2 provoca su translocación nuclear y su unión a elementos de respuesta antioxidante que inducen la transcripción de enzimas como la Tiorredoxina. Según estudios en ratas, la activación de Nrf2 es evidenciable dentro de la primera hora tras la administración de T₃, efecto que sería paralelo al desarrollo de un ambiente de estrés oxidativo, fenómeno evaluado por el aumento en los niveles de 8-isoprostanos, tanto séricos como hepáticos. Además, la expresión proteica de Tiorredoxina se desarrolla a las 2h desde la administración de la hormona (Romanque *et al.*, 2011).

La activación de Nrf2 también se ha visto en el modelo de HPA en rata sin la administración de la hormona; en este caso la disminución de los niveles citosólicos y el aumento a nivel nuclear son fenómenos progresivos, es decir, se producen a medida que transcurre el tiempo de infusión de CC (Nunez *et al.*, 2012). Este sería un posible mecanismo de citoprotección involucrado en nuestro modelo dado por T₃ que puede estudiarse a futuro.

La administración de MP también ha sido evaluada en múltiples modelos incluido el modelo de HPA. En dosis elevadas, los corticoides pueden activar genes para proteínas antiinflamatorias como la anexina 1, la cual inhibe la vía de la lipooxigenasa, y el Inhibidor del factor NF- κ B. También se ha descrito que los corticoides en dosis bajas actuarían como represores de genes proinflamatorios activados por NF- κ B y AP-1 tras un estímulo (citoquinas IL-1 o TNF- α) debido a que inhiben los mecanismos de transcripción y aumentan su represión al reclutar a la HDAC2 (Barnes, 2010). Estos mecanismos de acción genómicos pueden tardar desde 30 minutos hasta horas desde su administración; no obstante, este intervalo de tiempo no se considera suficiente para los efectos inmediatos observados con el uso de corticoides (Shi *et al.*, 2011).

Por otro lado, se han propuestos vías de acción no genómicas observadas en dosis altas de corticoides (> 30 mg/día). Estas vías se caracterizan por la disminución en la fluidez de las membranas celulares (Lamche *et al.*, 1990) debido al intercalado del esteroide en ellas, alterando a su vez la disposición de proteínas y la función de las mismas. Otro efecto no genómico sería la disociación de proteínas ligadas al receptor de corticoides citosólico provocando la inhibición de la liberación del ácido araquidónico, un mediador central en las reacciones inflamatorias (Stahn *et al.*, 2008). Estos cambios afectarían la permeabilidad de la membrana y la lipoperoxidación de

éstas frente al estrés oxidativo. Esto queda demostrado en modelos de daño en médula espinal en ratas donde la administración de MP fue capaz de mantener los niveles de malondialdehído en límites cercanos al basal (Topsakal *et al.*, 2002). Además, estas alteraciones intervendrían en el ciclo de intercambio del sodio, calcio y en la formación de ATP (Stahn *et al.*, 2008).

La participación de otras células hepáticas distintas de CK en los efectos observados tampoco debe descartarse. Las células de Ito o células estrelladas hepáticas son células ubicadas en estrecho contacto con las células endoteliales sinusoidales del hígado a quienes rodean para formar un complejo célula-célula inseparable (Senoo *et al.*, 2010). Dentro de sus funciones en un hígado normal se encuentran: el almacenamiento de vitamina A, la dirección de las comunicaciones intercelulares y la remodelación de la matriz extracelular. Por su disposición perisinusoidal, éstas pueden modificar el diámetro sinusoidal al ser estimulados por endotelina y angiotensina II entre otras (Sarem *et al.*, 2006). Tras un daño hepático las células estrelladas se activan cambiando a un fenotipo contráctil lo que contribuye al incremento en la resistencia vascular (Puche *et al.*, 2013). Se ha observado que los corticoides inhiben la activación de las células estrelladas y su posterior diferenciación (Marek *et al.*, 2009). En contraste con lo anterior, se ha descrito en modelos de cultivos celulares que la administración de hormona tiroidea activaría a las células estrelladas a través de la vía guanosina trifosfatasa Rho, efecto que se ha descrito dentro de los 15

minutos de tratamiento (Zvibel *et al.*, 2010). El fenómeno de activación de las células estrelladas podría explicar los resultados en los parámetros de daño hepático, los cuales fueron menores en el grupo tratado con MP que en el grupo de T₃. Por otro lado, en el modelo de IR, se ha observado que tras la reperfusión se produce la activación de la calpaína mu, proteasa dependiente de calcio, cuya acción se asocia a modificaciones del citoesqueleto con la consecuente alteración de la membrana plasmática y la posterior muerte celular con los correspondientes cambios morfológicos. La administración de prednisolona suprime la activación de calpaína mu posiblemente al evitar el aumento del calcio intracelular por mecanismos que aún no se comprenden en su totalidad (Wang *et al.*, 2001). En la actualidad, el efecto de las hormonas tiroideas en relación a la actividad de la calpaína mu no ha sido descrito.

El PRH fue desarrollado con el fin de aumentar la disponibilidad de donantes cardiacos en pacientes con muerte cerebral descartados por su alta inestabilidad hemodinámica. En algunos países, especialmente los que se adhieren a la normativa de la ESOT (*European Society of Organ Transplantation*), se ha establecido su aplicación en este tipo de donantes. Esto ha resultado en un aumento en el número de órganos obtenidos. Hasta el momento, no existen estudios que evalúen los mecanismos involucrados en la interacción de ambas hormonas que expliquen el efecto positivo que se ha demostrado en el trasplante de órganos torácicos.

Resumiendo, el PRH mantendría la función de las CK, lo que se evidencia a través de la conservación de la RR y la capacidad fagocítica estimulada por la infusión de CC. Esto es importante, ya que la actividad de las CK es un factor fundamental para producir el efecto precondicionante, como fue evaluado tras la administración de la hormona tiroidea frente al daño por IR (Tapia *et al.*, 2010). Adicionalmente, es un elemento central que participa de otros procesos de respuesta del órgano al daño, tal como la regeneración post hepatectomía parcial (Abshagen *et al.*, 2007). Si bien no se evidenciaron efectos protectores a nivel de parámetros de estrés oxidativo ni inflamatorios tras el uso del PRH, sí se observó una disminución en los parámetros de daño hepático. Se requerirán estudios adicionales para determinar si los cambios observados se relacionan con el efecto del PRH, para lo cual una alternativa sería evaluar el efecto en periodos de perfusión más prolongados, el estudio de factores de transcripción comprometidos y la posible acción de otras células hepáticas tales como las células estrelladas en los procesos descritos.

La ventaja que presentó este estudio fue la evaluación en tiempo real del comportamiento de las CK. Estas últimas surgen como un factor importante en la respuesta frente al daño por IR, fenómeno presente en toda cirugía hepática, y para el desarrollo de la resistencia tisular o precondicionamiento. El diseño de este trabajo nos permitió determinar el efecto del PRH combinado en condiciones controladas y estandarizadas. No podemos desconocer que

nuestro trabajo presenta algunas debilidades, una de ellas sería el tiempo de análisis de las variables estudiadas; dado que en la práctica el tiempo de diagnóstico de MC es variable, estableciéndose dentro de las 24h o incluso hasta tres días después del ingreso del paciente, éste lapso de tiempo podría modificar los parámetros analizados y nuestro modelo puede no evidenciar el amplio rango de alteraciones que podrían ocurrir en éste periodo (Wijdicks *et al.*, 2008). Otra limitación que surge de este trabajo es el tamaño muestral, el cual afecta al poder del estudio siendo este menor al de otros. Esto se traduciría en que podrían existir diferencias significativas que nuestro estudio no ha sido capaz de pesquisar, por lo que se plantea el aumento del número de animales en un trabajo futuro.

VI. CONCLUSIONES

- La fagocitosis de CC provoca una RR por las CK que se evidencia por el aumento del QO_2 .
- El pretratamiento hormonal simple o combinado no altera la RR evocada por la fagocitosis de CC en las CK.
- La administración de una dosis de 0,05 mg/Kg de T_3 aplicada dos horas previas al modelo de HPA presenta efectos protectores que se evidencian a nivel histológico; sin embargo, no modificó significativamente los parámetros de estrés oxidativo ni inflamatorios.
- La administración de una dosis de 34 mg/Kg de MP intraperitoneal aplicada tres horas previo al HPA presenta efectos protectores, que se evidencian en menor daño histológico, menor liberación de LDH y reducción de los niveles de proteínas oxidadas. La administración de MP no altera la RR ni disminuye parámetros inflamatorios.
- El pretratamiento combinado de $MP+T_3$ presentó disminución de daño celular. El PRH combinado no afecta la actividad de CK evaluada por la RR, ni modifica significativamente los parámetros de estrés oxidativo ni inflamatorios.

- El diseño experimental utilizado permite afirmar que el PRH administrado con una droga única o combinado no afecta la viabilidad ni la función de la célula de Küpffer.
- Las proyecciones de este estudio son el evaluar el efecto del protocolo hormonal combinado con tiempos de perfusión más prolongados, su acción en el modelo de isquemia fría para simular condiciones de trasplante hepático, el estudio de otras células no parenquimatosas como las células de Ito y su relación con el fenómeno de perfusión hepática, y la participación de los factores de transcripción nuclear Nrf2 y NF-kB tras el uso del PRH.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abshagen K, Eipel C, Kalff JC, Menger MD, Vollmar B (2007). Loss of NF-kappaB activation in Kupffer cell-depleted mice impairs liver regeneration after partial hepatectomy. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **292**(6): G1570-1577.

al-Ali SY, Hassan IM, al-Zuhair AG (1987). Morphological changes in the isolated rat liver perfused in a non-recirculating system: scanning and transmission electron microscopy. *Histology and histopathology* **2**(3): 243-250.

Attia M, Silva MA, Mirza DF (2008). The marginal liver donor--an update. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* **21**(8): 713-724.

Baffy G (2009). Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *Journal of hepatology* **51**(1): 212-223.

Ballas SK (2013). Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. *Blood* **121**(1): 243-244.

Barnes PJ (2011). Glucocorticosteroids: current and future directions. *British journal of pharmacology* **163**(1): 29-43.

Barnes PJ (2010). Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **120**(2-3): 76-85.

Bessems M, t Hart NA, Tolba R, Doorschodt BM, Leuvenink HG, Ploeg RJ, *et al.* (2006). The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Laboratory animals* **40**(3): 236-246.

Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL (2006). Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **26**(10): 1175-1186.

Bugge JF (2009). Brain death and its implications for management of the potential organ donor. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* **53**(10): 1239-1250.

Butterfield DA, Dalle-Donne I (2014). Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and disease. *Mass spectrometry reviews* **33**(1): 1-6.

Carrion Y, Fernandez V, Videla LA (1993). Influence of thyroid hormone administration on hepatic glutathione content and basolateral gamma-glutamyltransferase ectoactivity in the isolated perfused rat liver. *Biochemical pharmacology* **45**(12): 2527-2535.

Cisneros R, Oré R, Arnao I, Suárez S (2011). Relación de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en ratas diabéticas tratadas con maca (*Lepidium meyenii* walp). *An Fac med* **72**(2): 107-111.

Cowper KB, Currin RT, Dawson TL, Lindert KA, Lemasters JJ, Thurman RG (1990). A new method to monitor Kupffer-cell function continuously in the perfused rat liver. Dissociation of glycogenolysis from particle phagocytosis. *The Biochemical journal* **266**(1): 141-147.

Chimalakonda AP, Mehvar R (2003). Dextran-methylprednisolone succinate as a prodrug of methylprednisolone: local immunosuppressive effects in liver after systemic administration to rats. *Pharmaceutical research* **20**(2): 198-204.

Daga Ruiz D, Fernandez Aguirre C, Segura Gonzalez F, Carballo Ruiz M (2008). Indications and long-term outcomes for solid organ transplant. Quality of life in solid organ transplant recipients. *Medicina intensiva / Sociedad Espanola de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias* **32**(6): 296-303.

Dalle-Donne I, Carini M, Orioli M, Vistoli G, Regazzoni L, Colombo G, *et al.* (2009). Protein carbonylation: 2,4-dinitrophenylhydrazine reacts with both aldehydes/ketones and sulfenic acids. *Free radical biology & medicine* **46**(10): 1411-1419.

Decker K (1990). Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *European journal of biochemistry / FEBS* **192**(2): 245-261.

Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Remiao F, Sanchez-Navarro A, Bastos ML, Carvalho F (2006). Single high dose dexamethasone treatment decreases the pathological score and increases the survival rate of paraquat-intoxicated rats. *Toxicology* **227**(1-2): 73-85.

Dominguez-Roldan JM, Garcia-Alfaro C, Jimenez-Gonzalez PI, Hernandez-Hazanas F, Gascon Castillo ML, Egea Guerrero JJ (2009). [Brain death: repercussion on the organs and tissues]. *Medicina intensiva / Sociedad Espanola de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias* **33**(9): 434-441.

Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* **82**(1): 47-95.

Ellett JD, Evans ZP, Fiorini JH, Fiorini RN, Haines JK, Schmidt MG, *et al.* (2008). The use of the Papworth cocktail is detrimental to steatotic livers after ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* **86**(2): 286-292.

Fernandez V, Castillo I, Tapia G, Romanque P, Uribe-Echevarria S, Uribe M, *et al.* (2007). Thyroid hormone preconditioning: protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat. *Hepatology* **45**(1): 170-177.

Fernandez V, Simizu K, Barros SB, Azzalis LA, Pimentel R, Junqueira VB, *et al.* (1991). Effects of hyperthyroidism on rat liver glutathione metabolism: related enzymes' activities, efflux, and turnover. *Endocrinology* **129**(1): 85-91.

Fernandez V, Tapia G, Varela P, Gaete L, Vera G, Mora C, *et al.* (2008). Causal role of oxidative stress in liver preconditioning by thyroid hormone in rats. *Free radical biology & medicine* **44**(9): 1724-1731.

Fernandez V, Tapia G, Varela P, Romanque P, Cartier-Ugarte D, Videla LA (2006). Thyroid hormone-induced oxidative stress in rodents and humans: a comparative view and relation to redox regulation of gene expression. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* **142**(3-4): 231-239.

Fernandez V, Videla LA (1993). 3,3',5-triiodothyronine-induced hepatic respiration: effects of desferrioxamine and allopurinol in the isolated perfused rat liver. *Toxicology letters* **69**(2): 205-210.

Ferrigno A, Gregotti C, Richelmi P, Vairetti M (2010). Dexamethasone protects cultured rat hepatocytes against cadmium toxicity: involvement of cellular thiols. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* **46**(5): 445-449.

Group CNC (1999). Guidelines for the diagnosis of brain death. Canadian Neurocritical Care Group. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* **26**(1): 64-66.

Hepp J, Zapata R, Buckel E, Martinez J, Uribe M, Diaz JC, *et al.* (2008). [General considerations, indications and contraindications for liver transplantation in Chile: a multicenter consensus development document]. *Revista medica de Chile* **136**(6): 793-804.

Ho WE, Cheng C, Peh HY, Xu F, Tannenbaum SR, Ong CN, *et al.* (2012). Anti-malarial drug artesunate ameliorates oxidative lung damage in experimental allergic asthma. *Free radical biology & medicine* **53**(3): 498-507.

Hudson VM (2001). Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. *Free radical biology & medicine* **30**(12): 1440-1461.

Ichiseki T, Kaneuji A, Katsuda S, Ueda Y, Sugimori T, Matsumoto T (2005). DNA oxidation injury in bone early after steroid administration is involved in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis. *Rheumatology (Oxford)* **44**(4): 456-460.

Jaeschke H (2011). Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *Journal of gastroenterology and hepatology* **26 Suppl 1**: 173-179.

Kalayci M, Coskun O, Cagavi F, Kanter M, Armutcu F, Gul S, *et al.* (2005). Neuroprotective effects of ebselen on experimental spinal cord injury in rats. *Neurochemical research* **30**(3): 403-410.

Kong AN, Jusko WJ (1991). Disposition of methylprednisolone and its sodium succinate prodrug in vivo and in perfused liver of rats: nonlinear and sequential first-pass elimination. *Journal of pharmaceutical sciences* **80**(5): 409-415.

Korourian S, Hakkak R, Ronis MJ, Shelnutt SR, Waldron J, Ingelman-Sundberg M, *et al.* (1999). Diet and risk of ethanol-induced hepatotoxicity: carbohydrate-fat relationships in rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **47**(1): 110-117.

Lamche HR, Silberstein PT, Knabe AC, Thomas DD, Jacob HS, Hammerschmidt DE (1990). Steroids decrease granulocyte membrane fluidity, while phorbol ester increases membrane fluidity. Studies using electron paramagnetic resonance. *Inflammation* **14**(1): 61-70.

Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F (2003). Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS letters* **543**(1-3): 5-10.

Lee E, Ahn MY, Kim HJ, Kim IY, Han SY, Kang TS, *et al.* (2007). Effect of di(n-butyl) phthalate on testicular oxidative damage and antioxidant enzymes in hyperthyroid rats. *Environmental toxicology* **22**(3): 245-255.

Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK (2001). The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Molecular neurobiology* **24**(1-3): 169-181.

Madhu C, Maziasz T, Klaassen CD (1992). Effect of pregnenolone-16 alpha-carbonitrile and dexamethasone on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicology and applied pharmacology* **115**(2): 191-198.

Malik R, Hodgson H (2002). The relationship between the thyroid gland and the liver. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* **95**(9): 559-569.

Marek CJ, Wallace K, Durward E, Koruth M, Leel V, Leiper LJ, *et al.* (2009). Low affinity glucocorticoid binding site ligands as potential anti-fibrogenics. *Comparative hepatology* **8**: 1.

Masella R (2009). Glutathione and sulfur amino acids in human health and disease., Masella R, Mazza G (eds), p 216. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.

Minor T, Manekeller S (2007). Assessment of hepatic integrity after ischemic preservation by isolated perfusion in vitro: the role of albumin. *Cryobiology* **54**(2): 188-195.

Mischinger HJ, Walsh TR, Liu T, Rao PN, Rubin R, Nakamura K, *et al.* (1992). An improved technique for isolated perfusion of rat livers and an evaluation of perfusates. *The Journal of surgical research* **53**(2): 158-165.

Moreno M, Lombardi A, Beneduce L, Silvestri E, Pinna G, Goglia F, *et al.* (2002). Are the effects of T3 on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T3 itself? *Endocrinology* **143**(2): 504-510.

Nauseef WM (2008). Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *The Journal of biological chemistry* **283**(25): 16961-16965.

Nomoto K, Tsuneyama K, Takahashi H, Murai Y, Takano Y (2008). Cytoplasmic fine granular expression of 8-hydroxydeoxyguanosine reflects early mitochondrial oxidative DNA damage in nonalcoholic fatty liver disease. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* **16**(1): 71-75.

Novitzky D, Cooper DK, Morrell D, Isaacs S (1988). Change from aerobic to anaerobic metabolism after brain death, and reversal following triiodothyronine therapy. *Transplantation* **45**(1): 32-36.

Novitzky D, Cooper DK, Reichart B (1987a). Hemodynamic and metabolic responses to hormonal therapy in brain-dead potential organ donors. *Transplantation* **43**(6): 852-854.

Novitzky D, Cooper DK, Rosendale JD, Kauffman HM (2006). Hormonal therapy of the brain-dead organ donor: experimental and clinical studies. *Transplantation* **82**(11): 1396-1401.

Novitzky D, Cooper DK, Wicomb W (2008). Hormonal therapy to the brain-dead potential organ donor: the misnomer of the "Papworth cocktail". *Transplantation* **86**(10): 1479; author reply 1479-1480.

Novitzky D, Wicomb WN, Cooper DK, Tjaalgaard MA (1987b). Improved cardiac function following hormonal therapy in brain dead pigs: relevance to organ donation. *Cryobiology* **24**(1): 1-10.

Nunez B, Vargas R, Castillo I, Videla LA (2012). Colloidal carbon stimulation of Kupffer cells triggers Nrf2 activation in the isolated perfused rat liver. *Journal of molecular histology* **43**(3): 343-349.

Olteanu D, Filip A, Muresan A, Nagy A, Tabaran F, Moldovan R, *et al.* (2012). The effects of chitosan and low dose dexamethasone on extrahepatic cholestasis after bile duct ligation in Wistar rats. *Acta physiologica Hungarica* **99**(1): 61-73.

Osawa Y, Seki E, Adachi M, Suetsugu A, Ito H, Moriwaki H, *et al.* (2010). Role of acid sphingomyelinase of Kupffer cells in cholestatic liver injury in mice. *Hepatology* **51**(1): 237-245.

Pilger A, Rudiger HW (2006). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *International archives of occupational and environmental health* **80**(1): 1-15.

Puche JE, Saiman Y, Friedman SL (2013). Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Comprehensive Physiology* **3**(4): 1473-1492.

Pulitano C, Aldrighetti L, Arru M, Finazzi R, Soldini L, Catena M, *et al.* (2007). Prospective randomized study of the benefits of preoperative corticosteroid administration on hepatic ischemia-reperfusion injury and cytokine response in patients undergoing hepatic resection. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* **9**(3): 183-189.

Reznick AZ, Packer L (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in enzymology* **233**: 357-363.

Romanque P, Cornejo P, Valdes S, Videla LA (2011). Thyroid hormone administration induces rat liver Nrf2 activation: suppression by N-acetylcysteine pretreatment. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* **21**(6): 655-662.

Romanque P, Tapia G, Videla LA (2003). Kupffer cell stimulation in the isolated perfused rat liver triggers nuclear factor-kappaB DNA binding activity. *Redox report : communications in free radical research* **8**(6): 341-346.

Romanque UP, Uribe MM, Videla LA (2005). [Molecular mechanisms in liver ischemic-reperfusion injury and ischemic preconditioning]. *Revista medica de Chile* **133**(4): 469-476.

Rosendale JD, Kauffman HM, McBride MA, Chabalewski FL, Zaroff JG, Garrity ER, *et al.* (2003). Hormonal resuscitation yields more transplanted hearts, with improved early function. *Transplantation* **75**(8): 1336-1341.

Ryma B, Wang JF, de Groot H (1991). O₂⁻ release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *The American journal of physiology* **261**(4 Pt 1): G602-607.

Salim A, Velmahos GC, Brown C, Belzberg H, Demetriades D (2005). Aggressive organ donor management significantly increases the number of organs available for transplantation. *The Journal of trauma* **58**(5): 991-994.

Sarem M, Znaidak R, Macias M, Rey R (2006). [Hepatic stellate cells: it's role in normal and pathological conditions]. *Gastroenterologia y hepatologia* **29**(2): 93-101.

Scorletti E, Calder PC, Byrne CD (2011). Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: metabolic aspects and novel treatments. *Endocrine* **40**(3): 332-343.

Schoneveld OJ, Gaemers IC, Lamers WH (2004). Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochimica et biophysica acta* **1680**(2): 114-128.

Senoo H, Yoshikawa K, Morii M, Miura M, Imai K, Mezaki Y (2010). Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative--past, present and future. *Cell biology international* **34**(12): 1247-1272.

Shi WL, Ma Q, Zhang LD, Huang JL, Zhou J, Liu L, *et al.* (2011). Corticosterone rapidly promotes respiratory burst of mouse peritoneal macrophages via non-genomic mechanism. *Chinese medical journal* **124**(19): 3127-3132.

Silva JE (2006). Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiological reviews* **86**(2): 435-464.

Smedsrod B, De Bleser PJ, Braet F, Lovisetti P, Vanderkerken K, Wisse E, *et al.* (1994). Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* **35**(11): 1509-1516.

Stahn C, Buttgereit F (2008). Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nature clinical practice. Rheumatology* **4**(10): 525-533.

Tapia G, Pepper I, Smok G, Videla LA (1997). Kupffer cell function in thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat. *Free radical research* **26**(3): 267-279.

Tapia G, Santibanez C, Farias J, Fuenzalida G, Varela P, Videla LA, *et al.* (2010). Kupffer-cell activity is essential for thyroid hormone rat liver preconditioning. *Molecular and cellular endocrinology* **323**(2): 292-297.

Topsakal C, Erol FS, Ozveren MF, Yilmaz N, Ilhan N (2002). Effects of methylprednisolone and dextromethorphan on lipid peroxidation in an experimental model of spinal cord injury. *Neurosurgical review* **25**(4): 258-266.

Urtasun R, Nieto N (2007). [Hepatic stellate cells and oxidative stress]. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva* **99**(4): 223-230.

van Der Hoeven JA, Ter Horst GJ, Molema G, de Vos P, Girbes AR, Postema F, *et al.* (2000). Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor liver in the rat. *Annals of surgery* **232**(6): 804-813.

Venditti P, Bari A, Di Stefano L, Di Meo S (2008). Tri-iodothyronine treatment differently affects liver metabolic response and oxidative stress in sedentary and trained rats. *The Journal of endocrinology* **197**(1): 65-74.

Videla LA (2010). Hormetic responses of thyroid hormone calorogenesis in the liver: Association with oxidative stress. *IUBMB life* **62**(6): 460-466.

Videla LA, Fernandez V, Cornejo P, Vargas R (2012). Metabolic basis for thyroid hormone liver preconditioning: upregulation of AMP-activated protein kinase signaling. *TheScientificWorldJournal* **2012**: 475675.

Wang M, Sakon M, Umeshita K, Okuyama M, Shiozaki K, Nagano H, *et al.* (2001). Prednisolone suppresses ischemia-reperfusion injury of the rat liver by reducing cytokine production and calpain mu activation. *Journal of hepatology* **34**(2): 278-283.

Wheeldon DR, Potter CD, Oduro A, Wallwork J, Large SR (1995). Transforming the "unacceptable" donor: outcomes from the adoption of a standardized donor management technique. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* **14**(4): 734-742.

Wijdicks EF, Rabinstein AA, Manno EM, Atkinson JD (2008). Pronouncing brain death: Contemporary practice and safety of the apnea test. *Neurology* **71**(16): 1240-1244.

Zaroff JG, Rosengard BR, Armstrong WF, Babcock WD, D'Alessandro A, Dec GW, *et al.* (2002). Consensus conference report: maximizing use of organs recovered from the cadaver donor: cardiac recommendations, March 28-29, 2001, Crystal City, Va. *Circulation* **106**(7): 836-841.

Zhang SJ, Wang T (2011). The influence of brain death on donor liver and the potential mechanisms of protective intervention. *Frontiers of medicine* **5**(1): 8-14.

Zhang X, Mehvar R (2001). Dextran-methylprednisolone succinate as a prodrug of methylprednisolone: plasma and tissue disposition. *Journal of pharmaceutical sciences* **90**(12): 2078-2087.

Zvibel I, Atias D, Phillips A, Halpern Z, Oren R (2010). Thyroid hormones induce activation of rat hepatic stellate cells through increased expression of p75 neurotrophin receptor and direct activation of Rho. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **90**(5): 674-684.