



**EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ACEITE DE ROSA
RUBIGINOSA (ROSA MOSQUETA) SOBRE LA
PROLIFERACIÓN HEPÁTICA Y ESTEATOSIS
TRANSITORIA POST HEPATECTOMÍA PARCIAL EN UN
MODELO ANIMAL**

DANNETTE VANIA GUÍÑEZ FRANÇOIS

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN EN FISIOPATOLOGÍA**

Directores de Tesis:

Dra. Pamela Romanque Ulloa

Dra. Gladys Tapia Opazo

2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina,
que la Tesis de Magister presentada por la candidata

DANNETTE VANIA GUIÑEZ FRANCOIS

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar
al Grado de Magister en Ciencias Biomédicas con mención en Fisiopatología en
el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 24 de Marzo de 2016.

Dra Pamela Romanque Ulloa

Directora de Tesis

Dra. Gladys Tapia Opazo

Directora de Tesis

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Dra Pilar Barja

Presidente Comisión

Dra Emilia Sanhueza

Dr Victor Parra

Dr Sebastián Uribe-Echeverría

DEDICATORIA

A mi maestro, el Sr. Paolo Cevo Salinas, que al entregarme su conocimiento despertó en mi la pasión por la ciencia.

A mi familia y mi novio, Felipe Meyer Aránguiz, por el apoyo incondicional, cariño y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis directoras de tesis, Dra. Pamela Romanque y Dra. Gladys Tapia, por el apoyo, sabiduría y cariño entregado desde el primer día que nuestras vidas se cruzaron.

Quiero agradecer a los miembros del laboratorio, en especial a Srta. Ignacia Zapata, Srta. Romina Vargas y Sra. Rosa Salinas por compartir sus conocimientos y el apoyo incondicional que me dieron.

A los integrantes de mi Comisión de Magister por los comentarios y aportes al desarrollo de esta tesis.

A mis amigos, compañeros de beca y maestros que me han acompañado durante el proceso de desarrollo de esta tesis.

Esta tesis se enmarca dentro del proyecto **FONDECYT 1130274 -114054**

INDICE

ABREVIATURAS	1
LISTA DE TABLAS	3
LISTA DE FIGURAS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
CONCEPTOS GENERALES DE HEPATECTOMÍA	7
PROLIFERACIÓN EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA POST HEPATECTOMÍA PARCIAL	8
ESTEATOSIS TRANSITORIA EN EL PROCESO DE REGENERACIÓN HEPÁTICA POST HEPATECTOMÍA PARCIAL	9
ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADIS DE CADENA LARGA, EFECTOS SOBRE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA POST HEPATECTOMÍA PARCIAL	10
ACEITE DE ROSA MOSQUETA, FUENTE DE ÁCIDO ALFA LINOLÉNICO	11
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	14
GENERALES	14
ESPECÍFICOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
CARACTERIZACIÓN DE GRUPOS EXPERIMENTALES	15
PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	16
RECUPERACIÓN DE MASA HEPÁTICA	17
TINCIÓN HEMATOXILINA EOSINA	17
ÍNDICE MITÓTICO	17
TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA PARA KI67	17
NIVELES DE EXPRESIÓN DE CICLINA D ₁ (CYD1 Q-PCR)	18
MEDICIÓN CUALITATIVA DE ESTEATOSIS HEPÁTICA	19
ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS HEPÁTICOS	19

CALCULO DE TAMAÑO MUESTRAL	20
ANÁLISIS ESTADISTICO	20
RESULTADOS	21
1. EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN HEPÁTICA	
RECUPERACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LA MASA HEPÁTICA Y MASA CORPORAL EN LOS DISTINTOS TIEMPOS POST HEPATECTOMÍA PARCIAL	21
ÍNDICE MITÓTICO EN LOS DISTINTOS TIEMPOS POST HEPATECTOMÍA PARCIAL	22
EXPRESIÓN DE Ki67 A LAS 24 HR POST HEPATECTOMÍA PARCIAL	23
EXPRESIÓN DE MRNA DE CICLINA D1 EN LOS DISTINTOS TIEMPOS POST HEPATECTOMÍA PARCIAL	24
2. EVALUACIÓN DE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA TRANSITORIA	
DESCRIPCIÓN CUALITATIVA DE ESTEATOSIS HEPÁTICA TRANSITORIA POST HEPATECTOMÍA PARCIAL	24
DETERMINACIÓN DE PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS HEPÁTICOS A LAS 24HR DE OBSERVACIÓN	25
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIÓN	33
BIBLIOGRAFÍA	34

ABREVIATURAS

ADN	: Ácido desoxirribonucleico
AG	: Ácidos grasos totales
AGPICL	: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
ALA	: Ácido α -linolénico
AMPK	: Proteína kinasa activada por AMP
AMP	: Adenosín monofosfato
AP	: Aceite de pescado
aRM	: Aceite de Rosa Mosqueta
ATP	: Adenosón trifosfato
ARNm	: Ácido ribonucleico
BrdU	: Bromodesoxiuridina
CyD1	: ciclina D1
DHA	: Ácido docosahexaenoico
EGF	: Factor de crecimiento endotelial
EPA	: Ácido eicosapentaenoico
HGF	: Factor de crecimiento de hepatocitos
HPx	: Hepatectomía parcial
HuR	: Proteína de unión al ARNm
IGF-1	: Factor de crecimiento insulina-1
IL-6	: Interleuquina-6
KO	: Knock Out
L-Fabp	: Proteína de unión a ácidos grasos hepáticos

LKB-1	: Proteína quinasa serina/treonina 1
mTOR	: Blanco de la Rapamicina en mamíferos
MTP-IOK	: Knock Out proteína microsomal transportadora de triglicéridos intestinal
NF- κ B	: Factor nuclear- κ B
PPAR	: Receptor de peroxisoma-proliferador-activado
STAT-3	: Traductor de señal y activador de la transcripción-3
TGF- α y - β	: Factor de crecimiento transformante- α y - β
TLC	: Cromatografía en capa fina
TNF- α	: Factor de necrosis tumoral- α
PCNA	: Antígeno nuclear de células en proliferación
WT	: Wild Tipe/Tipo salvaje

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Secuencias de partidores para cada gen estudiado	19
Tabla 2	Perfil ácidos grasos cirugía Sham	26
Tabla 3	Perfil ácidos grasos Hepatectomía Parcial	26

LISTA DE FIGURAS		Página
Figura 1	Fases de la regeneración hepática post hepatectomía parcial	9
Figura 2	Esquema de los grupos estudiados y línea de tiempo con los períodos de suplementación (21 días); hora 0 procedimiento quirúrgico (HPx/Sham); 3, 6, 24 y 120 hrs períodos de análisis de los distintos grupos	15
Figura 3	Curva de recuperación de masa hepática global en animales post HPx con y sin suplementación con aceite de RM	22
Figura 4	Índice mitótico neto en distintos tiempos post HPx	22
Figura 5	Cortes histológicos de parénquima hepático, tinción Hematoxilina y Eosina a las 24 y 120 hrs post HPx de grupo suplementado y no suplementado (100x y 400x)	23
Figura 6	Tinción IHQ para Ki-67 a las 24 hrs post HPx (100x y 400x)	23
Figura 7	Expresión de mRNA CyD1 3, 6 y 24 hrs post HPx	24
Figura 8	Cortes histológicos de parénquima hepático, tinción Hematoxilina-Eosina 40x. 3, 6, 24 y 120 hrs post HPx.	25

RESUMEN

La regeneración hepática es un proceso complejo y altamente regulado; durante el proceso se evidencia esteatosis transitoria y su significado aún es incierto.

Existe escasa y contradictoria evidencia respecto al efecto de los ácidos grasos poliinsaturados cadena larga (AGPICL) ω -3 en la regeneración hepática.

Se propone que la suplementación con aceite de Rosa Mosqueta (aRM), fuente ácido α -linolénico (ALA) precursor del AGPICL ω -3, previo a una hepatectomía parcial (HPx) genera cambios en el perfil lipídico de la esteatosis transitoria acelerando el crecimiento del hígado.

Ratas Sprague-Dawley recibieron aRM (1 gr/Kg/día ALA) o solución salina por 21 días; luego fueron sometidos a HPx 70% o cirugía simulada (Sham) a las 3, 6, 24 y 120 hrs post HPx. Los animales fueron sacrificados posteriormente, para análisis del tejido hepático (n = 6 HPx y n=4 Sham para cada tiempo post HPx).

La regeneración hepática, fue evaluada a partir de la relación entre la masa hepática y corporal, índice mitótico, expresión de Ki67 y ARNm ciclina D1 (CyD1). La esteatosis transitoria fue observada en cortes histológicos y el análisis de perfil lipídico se realizó mediante cromatografía. Se evidenció que la proliferación hepática post HPx no fue afectada en los animales suplementados con aRM en comparación con el no suplementado a 120hr post HPx, a pesar que a las 24 hrs post HPx el grupo aRM presenta un retraso en la recuperación de la relación del peso del hígado con el peso corporal. En el mismo periodo de observación, el grupo suplementado presenta menor número de núcleos positivos para Ki67 asociado a la ausencia de figuras mitóticas, pero una mayor expresión de ARNm CyD1 en los hepatocitos en comparación al grupo no suplementado y sometido a HPx.

Se observa en ambos grupos esteatosis transitoria a las 24 hrs post HPx. En cuanto al perfil de ácidos grasos; en las ratas Sham suplementadas con aRM en comparación a las no suplementadas presentan niveles de ALA y ácido eicosapentaenoico (EPA) más altos, y de ácido docosahexaenoico (DHA) más bajos, esto último sin diferencia estadística. Similar tendencia se observa al comparar niveles de ALA, EPA y DHA en los grupos sometidos a HPx.

La administración aRM previa a HPx podría estar asociada a cambios basales en el perfil de lípidos del hígado, sin impedir lograr la relación masa hígado respecto a masa corporal óptima. La importancia biológica de estos resultados requiere de estudios adicionales.

ABSTRACT

Liver regeneration is a complex and tightly regulated process in response to liver mass loss. Transient steatosis occurs during the process, and its meaning is not completely understood. There is limited and contradictory evidence about the effect of Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids (LCPUFA) ω -3 on liver regeneration.

We proposed that rosehip supplementation (RO), a rich source of α -linolenic acid (ALA), precursor of LCPUFA ω -3, prior partial hepatectomy (PHx) change the lipid profile on transient steatosis with a positive impact on liver growth.

Sprague-Dawley Rats received RO (1gr/Kg/day ALA) or saline solution for 21 days prior 70% PHx or sham surgery. 3, 6, 24 and 120 hours after surgery, animals were subsequently sacrificed, and liver tissues harvested (n=6 PHx, n=4 Sham, per group and time).

Liver regeneration analysis included liver to body weight ratio, mitotic index and cyclin D1 mRNA expression. Transient steatosis analysis included qualitative estimation of steatosis in histological sections and liver lipid profile by chromatography.

Proliferative response to PHx was not impaired in animals supplemented with RO compared with control group at 120 hours post PHx, although animals supplemented with RO exhibited a modest but significant delay on recovering ratio of liver weight to body weight at 24 hours post PHx ($1,77\pm 0,02\%$ versus $2,18\pm 0,07\%$, $p<0,01$). At this time after PHx no mitotic figures were found on the supplemented group compared with control group ($0,73 \pm 0,26$ versus $0,00 \pm 0,003$ mitosis/ high-power field, $p<0,05$), but exhibited augmented hepatic cyclin D1 expression ($3,02\pm 0,6$ versus $49,76\pm 4,09$ relative mRNA expression, $p<0,05$).

Liver transient steatosis, was present on RO an saline groups at 24 hrs post HPx. Higher levels of ALA and eicosapentaenoic acid (EPA) in the supplemented RO Sham group compared to saline Sham group. Similar trend was observed when comparing levels of ALA, EPA on groups under HPx.

The Rosehip oil supplementation previous a two-thirds PH delays liver proliferation and might be associated with changes on lipid liver profile, without impairment of reaching an optimal ratio of liver to body weight. The biological significance of these results require further studies.

INTRODUCCIÓN

Conceptos generales de hepatectomía

El mito Griego sobre Prometeo ilustra la capacidad regenerativa del hígado al removerse parte de su masa (Farrell, 2004; Taub, 2004). En estricto rigor no hay regeneración, ya que los lóbulos hepáticos resecados no vuelven a crecer; en lugar de ello el remanente hepático sufre hipertrofia e hiperplasia de todas sus células, siendo este un proceso compensatorio determinado por las demandas del organismo y la funcionalidad del órgano (Taub, 2004).

La masa hepática tiene una proporción constante en relación a la masa corporal, concepto denominado “hepatostato” (Rudnick, 2012; Taub, 2004). En clínica la resección hepática se realiza principalmente en presencia de metástasis hepáticas que comprometen el parénquima, trauma con daño hepático y trasplante con donante vivo. El proceso en sí posee vías redundantes y superpuestas para asegurar la recuperación total de la masa hepática. Aún no se comprende el proceso en su totalidad, en relación a las vías moleculares implicadas y cómo se relacionan entre ellas (Fausto, 2005; Michalopoulos, 2007, 2010).

El modelo más utilizado para estudiar la regeneración hepática es la hepatectomía parcial 2/3 (HPx), que consiste en la resección del 70% de la masa hepática en roedores (Higgins, 1931; Michalopoulos, 2010). Posterior a la HPx, las células parenquimáticas que normalmente se encuentran en un estado de quiescencia, G0, dejan el estado de reposo para entrar en el ciclo celular. El tiempo de ingreso al ciclo celular luego de una HPx es variable entre las especies, por ejemplo, el peak de síntesis de ADN es a las 24 hrs en ratas y entre 36 a 40 hrs en ratones (Michalopoulos, 2007).

En hígado los hepatocitos son los primeros en proliferar, proceso que avanza desde las áreas periportales a las pericentrales del lobulillo (Michalopoulos, 2007); le siguen las células de Kupffer, células del epitelio biliar, células estrelladas y finalmente células del endotelio sinusoidal (Taub, 2004). De esta forma, la masa hepática original se recupera en 5 a 7 días post HPx en ratas (Michalopoulos, 2007).

Se ha documentado que luego de la HPx se inician diversas señales celulares e inducción de más de 100 genes que normalmente no son expresados en el hígado, relacionados con la preparación de las células para reingresar al ciclo celular. El rol exacto de algunos genes inducidos en esta etapa aún no es claro (Taub, 2004). En un modelo animal de HPx del 75% se observó aumento en la expresión de genes anti apoptóticos, antioxidantes, y relacionados con el metabolismo intermediario y del óxido nítrico; mientras que en una HPx del 62% los genes expresados se asocian a la progresión del estado G1 en el ciclo celular. En ambos grupos se observa una regulación positiva de genes relacionados con inflamación y proliferación (Mortensen, 2010).

Proliferación en la regeneración hepática post hepatectomía parcial

La regeneración hepática es un proceso altamente conservado en la evolución. Se puede dividir en tres fases: i) iniciación o “priming”, ii) proliferación y iii) terminación (Fausto, 2000). La primera fase ocurre entre las 0 y 5h post HPx, observándose remodelación de la matriz extracelular y preparación para entrar al ciclo celular (G0 a G1), asociado a modificaciones en la expresión génica que permiten que esto ocurra (Michalopoulos, 2007). Los eventos que se producen en esta fase son inducidos por citoquinas como: TNF (factor de necrosis tumoral) - α e IL (interleuquina) -6, asociado a la activación de NF (factor nuclear) - κ B y STAT (traductor de señal y activador de la transcripción) -3, con lo que se sensibiliza a las células a factores de crecimiento, y que resulta necesario durante la siguiente fase (Fausto, 2000).

Luego en la fase de proliferación participan factores de crecimiento como HGF (factor de crecimiento de los hepatocitos), EGF (factor de crecimiento endotelial), IGF (factor de crecimiento insulina)-1, insulina y TGF (factor de crecimiento transformante) - α y - β y se caracteriza por la replicación del ADN, donde la expresión de Ciclina D1 señala el paso de G1 a S (Fausto, 2000; Michalopoulos, 2010; Taub, 2004). Los hepatocitos, al proliferar, forman grupos desprovistos de tejido de soporte, siendo las células estrelladas las encargadas de sintetizar la matriz extracelular alrededor del cuarto día post HPx, restableciendo la arquitectura y las uniones entre hepatocitos y epitelio sinusoidal (Taub, 2004). Una vez alcanzada la masa hepática original, se inicia la fase de terminación, la cual estaría finamente

regulada; sin embargo, las señales que indican que el tamaño apropiado ha sido alcanzado se conocen pobremente. TGF- β , el factor antiproliferativo del hígado más conocido, parece tener un rol importante en esta etapa, bloqueando la mitogénesis (Fig 1) (Taub, 2004).

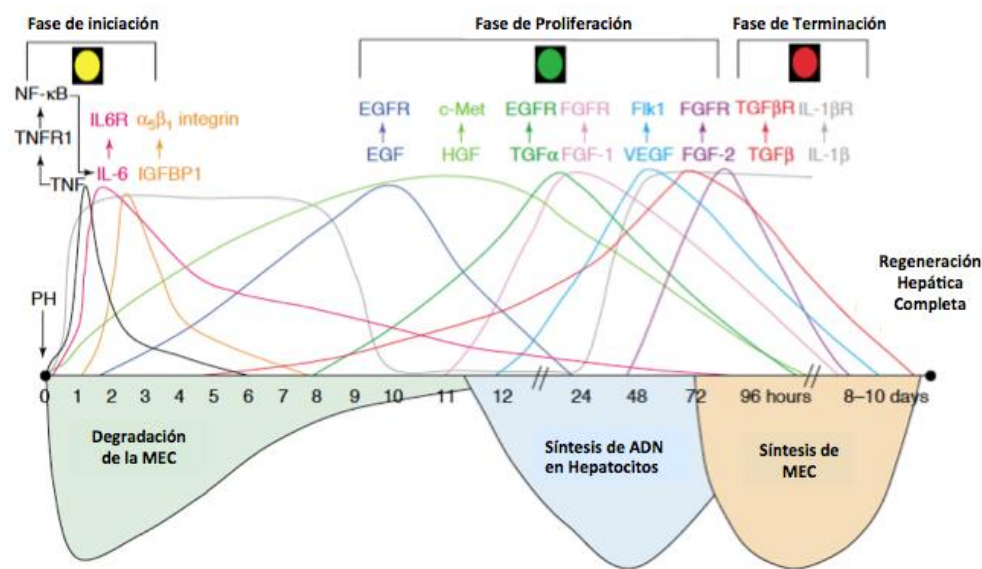


Fig 1: Fases de la regeneración hepática post hepatectomía. Modificación de imagen extraída de: (Mohammed, 2005).

Esteatosis transitoria en el proceso de regeneración hepática post hepatectomía parcial

En el proceso de regeneración hepática se observan cambios en el metabolismo intermediario. Posterior a una hepatectomía parcial, a las horas se observa hipoglicemia, cambio determinante en el proceso que es seguido además por el aumento del catabolismo con reducción del tejido adiposo sistémico y aumento de ácidos grasos libres, previo al esteatosis post HPx (Huang, 2014). La composición de las vesículas grasas en los hepatocitos contiene principalmente triglicéridos y colesterol, proveniente del tejido adiposo sistémico (Rudnick, 2012), aún cuando estudios en cultivos celulares de hepatocitos estimulados con suero de ratas sometidas a HPx presentan acumulación de lípidos en el citoplasma, proporcional a la concentración de suero administrada, lo que objetiva que en el proceso existe un grado de síntesis de ácidos grasos de novo (Michalopoulos, 1982).

En el proceso de regeneración hepática se evidencian cuatro oleadas de proliferación hepática precedidas de esteatosis transitoria (Zuo, 2012). La importancia de la esteatosis transitoria se ha estudiado en distintos modelos experimentales: se ha objetivado que la administración de lípidos previo o durante el proceso de proliferación hepática acelera el proceso, asociado al aumento de betaoxidación lipídica, aun cuando modelos experimentales que intentan relacionar metabolismo lipídico exógeno y endógeno son contradictorios (Rudnick, 2012); sin embargo, a la fecha los mecanismos asociados a este fenómeno no han sido claramente definidos (Newberry, 2008; Rudnick, 2012, Huang, 2014)

Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga efecto sobre la regeneración hepática y su relación con la regeneración hepática post HPx

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) ω -3, EPA [ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3)] y DHA [ácido docosahexaenoico (C22:6n-3)], son componentes estructurales cruciales de las membranas celulares y sustrato para la biosíntesis de mediadores fisiológicos (Videla, 2013). Estas moléculas y sus derivados poseen efectos antiinflamatorios y pro resolución de procesos inflamatorios (Serhan, 2008; Videla, 2013); antioxidantes (Videla, 2013); y regulatorio del metabolismo lipídico (Scorletti, 2013); entre otros efectos.

Pocos estudios han evaluado el efecto de los AGPICL ω -3 en relación a la capacidad proliferativa en la regeneración del parénquima hepático luego de una HPx y sus resultados son contradictorios.

En estudio realizado en ratas Wistar suplementadas con 20% de su dieta con aceite de pescado (AP) por 20 días previo a HPx (Van Noorden, 1995), se evidencia a las 48 hrs post HPx en el parénquima hepático un menor porcentaje de núcleos positivos para BrdU respecto al grupo no suplementado. Concordante con estos resultados, (Melo, 2010) se evidenció en ratas Wistar que la suplementación de ω -3 intraperitoneal 0,1g/kg dos semanas previo a una HPx genera una menor recuperación de masa hepática post hepatectomía respecto a grupo salino y suplementado con ω -6, asociado a una mayor capacidad antioxidante al suplementar con ω -3. A favor del efecto de los AGPICL ω -3 en relación a la capacidad proliferativa en la

regeneración del parénquima hepático post HPx, (Kirimlioglu, 2006) suplementó ratas Wistar con AP 4ml/kg/dosis vía oral 15 días antes de HPx y a las 0, 24 y 48 hrs post HPx; Con lo que evidenció que a las 72 hrs postHPx en el tejido hepático se expresa un mayor número de nucleos positivos para Ki-67 respecto a los grupos suplementados con solución control, aceite de oliva y vitamina E. Otro estudio que avala los efectos beneficios de ω -3 (Yan, 2011) demuestra que al suplementar ratas Sprague-Dawley con AP 1ml/kg o 2ml/kg al día vía intravenosa, 48 hrs previo a HPx y hasta 24 hr previo a completar el periodo de observación. La suplementación con AP se asocia a una recuperación precoz de la relación entre masa hepática y masa corporal total, dosis dependiente de manera creciente respecto a grupo no suplementado y a un aumento de la expresión de la proteína nuclear antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), en el día 2 y 3 post HPx.

Los trabajos que evalúan los efectos de AGPICL ω -3 no son comparables metodológicamente, por lo que con la evidencia actual no es posible determinar el efecto benéfico ni deletéreo de la suplementación con AGPICL ω -3.

Rosa mosqueta, fuente de ácido α -linolénico

Los AGPICL ω -3, EPA y DHA, presentan múltiples efectos benéficos en la salud. Estos macronutrientes pueden ser incorporados a los tejidos por consumo directo de estos macronutrientes preformados, obtenidos del consumo de peces grasos o de forma indirecta mediante la bioconversión de su precursor, ALA [ácido α -linolénico (C18:3n-3)], macronutriente esencial comúnmente encontrado en alimentos de origen vegetal como semillas (Brenner, 2003; Scorletti, 2013).

La búsqueda de fuentes de EPA y DHA de origen vegetal es necesaria, ya que el consumo de los macronutrientes preformados de origen animal en algunos países occidentales se encuentra bajo las recomendaciones (Simopoulos, 2011). En los últimos años, debido al aumento de la demanda de AP, los peces de acuicultura son alimentados con aceites vegetales ricos en ω -6, evidenciándose un menor contenido de EPA y DHA (Valenzuela, 2012). El consumo de AP en cápsulas es posible, pero se asocia a efectos adversos menores en síntomas gastrointestinales como dispepsia, gastritis y diarrea, derivando en un cese del consumo (Wang, 2006).

La *Rosa rubiginosa* (Rosa mosqueta) es un arbusto silvestre que crece en la cercanías de la rivera del río Bio-Bío en Chile y en algunas zonas de Europa central, y constituye una fuente rica en ALA (Franco, 2007). El aceite de Rosa mosqueta (aRM) presenta en su composición entre un 26 a 37% de ALA, además de vitamina C y compuestos fenólicos (Morales, 2012). Los efectos benéficos del uso de aRM han sido atribuidos a su contenido antioxidante (Franco et al., 2007) y se ha demostrado que su uso tópico potencia la regeneración cutánea en patologías dermatológicas (Valladares, 1986).

En el organismo, el 65-85% del ALA de la dieta sufre β -oxidación, mientras que el 16-18% es almacenado en tejido adiposo y una baja proporción se bioconvierte en EPA <8% y DHA <4% (Kyu-Bong, 2014). En humanos los estudios de bioconversión de EPA y DHA a partir de ALA presentan dificultades en su metodología y sólo se conoce el contenido de EPA y DHA plasmático (Morales, 2012).

Un estudio reciente realizado por Valenzuela y colaboradores (2012) evaluó en un modelo animal -utilizando ratas Sprague-Dawley alimentadas con diferentes aceites vegetales- la biotransformación del ALA contenido en el aRM a EPA y DHA en el tejido hepático, proceso biológico de suma importancia, ya que el ALA como macromolécula no posee efectos biológicos y su importancia radica en ser el sustrato para la síntesis de EPA y DHA en el organismo. Se demostró que la suplementación con aRM por 21 días aumenta los niveles hepáticos de ALA, EPA y DHA, demostrando que el ALA es bioconvertido eficientemente a EPA y DHA (Valenzuela, 2012).

De acuerdo a los antecedentes expuestos, se plantea la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

La suplementación con aceite *Rosa rubiginosa* -Rosa mosqueta- previo a una hepatectomía parcial acelera la proliferación en la regeneración hepática y cambia las características de la composición de la esteatosis transitoria asociada.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

Determinar el efecto positivo del pretratamiento con rosa mosqueta sobre la capacidad proliferativa en la regeneración hepática y esteatosis transitoria en distintos tiempos post-hepatectomía parcial en ratas.

Objetivos Específicos

- 1. Determinación del grado de proliferación hepática en los distintos grupos experimentales post hepatectomía parcial (70%) a través de los siguientes parámetros:**
 - a. Caracterizar la curva de recuperación de la masa hepática a las 3, 6, 24 y 120 hrs post hepatectomía parcial en los distintos grupos experimentales.
 - b. Recuento de mitosis en corte histológico de hígado de los distintos grupos teñidos con Hematoxilina-Eosina.
 - c. Realizar tinción inmunohistoquímica para Ki67 y hacer el recuento de núcleos positivos en placas de animales sometidos a HPx a las 24 hrs post HPx.
 - d. Determinar la expresión de ARNm CyD1 en los distintos grupos a través de qPCR.

- 2. Caracterización de la esteatosis transitoria hepática en el proceso de regeneración hepática.**
 - a. Descripción semicuantitativa de estatois hepática a la microscopia óptica.
 - b. Análisis del perfil de ácidos grasos hepáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de grupos experimentales

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ratas macho de la cepa *Sprague-Dawley* (Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) con un peso corporal entre 100-110 gr, manteniendo ciclos de luz/oscuridad de 12 hrs y acceso libre a agua y alimento (dieta sólida Champion, S.A., Chile).

Los animales fueron agrupados en 2 grupos experimentales que se muestran en la Fig. 2, de acuerdo a la suplementación con aceite de RM 1gr/Kg/día o solución salina isovolumétrica por 21 días. Al final del protocolo ambos grupos alcanzaron un peso entre 200-240 gr. Cada grupo se subdivide en 2 grupos según procedimiento quirúrgico, HPx (n= 6) o cirugía Sham (n=4) para cada tiempo de observación.

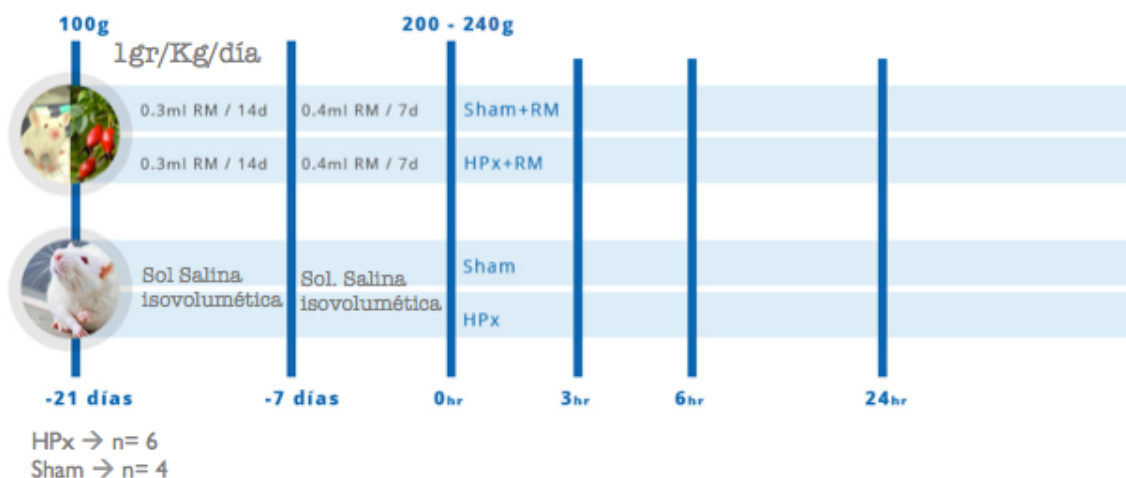


Fig. 2. Esquema de los grupos estudiados y línea de tiempo que muestra el periodo de suplementación (21 días); hora 0 corresponde al momento de realización del procedimiento quirúrgico (HPx/Sham); 3, 6, 24 y 120 hrs corresponden a los tiempos de análisis de los distintos grupos.

Procedimiento quirúrgico

Para el procedimiento quirúrgico los animales recibieron una dosis única de Zoletil 50 ® (Tiletamina 125 mg y Zolazepan 125 mg, Laboratorio Virbac, Francia, S.A.) 40-60 mg/Kg intraperitoneal 15 min antes de la cirugía como inductor anestésico. El procedimiento se realizó bajo anestesia inhalatoria con isoflurano al 1,5-3 % con flujo constante de oxígeno de 2 L/min sobre camilla termorregulada con control continuo de la temperatura rectal. Intraprocedimiento fue administrado Tramal® 0.01 mg/kg (Clorhidrato de Tramadol ampolla de 2ml con 100 mg Laboratorio Sanderson, Chile) intraperitoneal como analgésico.

En condiciones asépticas se realiza incisión media supra e infraumbilical con bisturí número 15 hasta exponer las vísceras, seccionando ligamento falciforme. Se procedió según cirugía:

a) Hepatectomía parcial: La HPx del 70% se realizó de acuerdo al método descrito por (Higgins, 1931). Los lóbulos mediano, central derecho y lateral izquierdo, que constituyen el 70% del hígado, fueron ligados con sutura de seda 2-0 y resecados en forma separada bajo visión con microscopio. Se controló hemostasia con cauterización.

Posteriormente se procede al cierre de la pared abdominal y el animal se traslada para continuar manejos post operatorios.

b) Cirugía Sham: Posterior a la incisión media supra e infra umbilical con bisturí y exposición de vísceras y sección del ligamento falciforme, se procede al cierre de la pared abdominal y el animal va se traslada para continuar manejos post operatorios.

En el manejo post operatorio los animales recibieron 2-3 ml de solución fisiológica 0,9% y se mantuvieron en observación en un ambiente confortable hasta la recuperación de la consciencia.

A los animales se les practicó la eutanasia al cumplir el tiempo de observación 3, 6, 24 o 120 hrs post HPx con Zoletil 50 ® (60-80 mg/Kg) para la obtención de muestras. Las de tejido hepático tomadas fueron fijadas en formalina tamponada al 10% por 24 hrs para posterior inclusión en parafina, o congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C para mediciones posteriores.

Todos los procedimientos animales fueron realizados de acuerdo a las normas nacionales e

institucionales vigentes, y cuentan con la Aprobación del Comité de Bioética N° CBA N° 0665 FMUCH.

Recuperación de masa hepática

La restitución de la masa hepática se determinó como porcentaje de la relación entre la masa hepática y masa corporal total observada a las 3, 6, 14 y 120 hrs post HPx en grupo suplementado con aRM como no suplementado.

Para objetivar la recuperación hepática de los grupos sometidos a HPx, se analizó la masa hepática en relación a la masa corporal total en los grupos sometidos a cirugía Sham.

Tinción de Hematoxilina-eosina

Las muestras de tejido hepático fijadas durante 24 hrs en formalina tamponada al 10% fueron incluidas en parafina y cortadas a 4 μm de espesor. Se realizó tinción con Hematoxilina-eosina (HE) de acuerdo a procedimiento estándar.

Índice mitótico

Para evaluar la replicación de los hepatocitos se observó la presencia de figuras mitóticas en secciones histológicas teñidas con HE, contando el número de células en mitosis en 10 campos de aumento mayor (CAM) adyacentes, bajo microscopio óptico (OLYMPUS CX31, Tokio, Japón). Este parámetro fue expresado como N° de mitosis/CAM.

Tinción Inmunohistoquímica para Ki-67

Se realizó recuperación antigénica mediante la inmersión de cortes de 4 μm montados en portaobjetos silanizados en buffer EDTA (1mM, pH 8.0) durante 45 min a 90°C. La peroxidasa endógena fue inactivada por inmersión en péroxido de hidrógeno al 0,3% en metanol absoluto durante 10 min. Posteriormente, los cortes fueron lavados e incubados con suero normal de caballo al 2,5% en solución de bloqueo (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 20 min, seguido por un lavado e incubación durante 1 hr a temperatura ambiente con anticuerpo anti Ki-67 (MIB-5, DAKO, Kyoto, Japan) en dilución 1:100 (v/v) en PBS. Los controles negativos fueron preparados omitiendo el anticuerpo primario. Los cortes fueron

luego incubados con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (ImmPRESS Universal reagent; Vector Labs, Burlingame, CA) durante 30 min a temperatura ambiente. Tras los lavados, los cortes fueron incubados con DAB Substrate Kit For Peroxidase (Vector Labs, Burlingame, CA) durante 1 min. La tinción de contraste se realizó con hematoxilina de Mayer durante 5 min. Finalmente, los cortes fueron deshidratados, aclarados y montados en Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Se contaron los núcleos de hepatocitos positivos para Ki-67 bajo microscopio de luz (OLYMPUS CX31, Tokio, Japón) en 10 CAM adyacentes. Este parámetro fue expresado como N° de células positivas/campo.

Niveles de expresión de ARNm CyD1 mediante qPCR

ARN total fue extraído de 30 mg de hígado con un RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen Sciences, Maryland, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. ADN complementario (ADNc) se preparó usando la transcriptasa reversa ThermoScript RT-PCR System, (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los partidores fueron diseñados para CyD1 y beta-actina (Tabla 1). Los cebadores se optimizan para producir 95 a 100% de eficiencia de reacción.

El análisis de curva de fusión verifica la formación de un solo producto de PCR en cada reacción de PCR. El nivel de expresión de cada muestra se normalizó contra β -actina como control interno.

El nivel de expresión relativa se calculó utilizando el método comparativo CT ($\Delta\Delta CT$) y los valores se normalizaron a nivel de ciclina D1 de ratas Sham 3 hrs no suplementadas. PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo en un equipo Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, California, EE.UU.), utilizando Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, California, EE.UU.) siguiendo los protocolos del fabricante.

Secuencias de partidores para cada gen estudiado	
ciclina D1	
Sentido	TTG ACT GCC GAG AAG TTG TG
Antisentido	TGA GCT TGT TCA CCA GAA GC
β -actina	
Sentido	AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC
Antisentido	CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA

Tabla 1. Secuencia de los partidores para cada gen estudiado

Evaluación semicuantitativa de la presencia de esteatosis hepática

Se clasificó la presencia de esteatosis hepática mediante la observación de los cortes histológicos, evaluando como ausente, leve, moderada o severa (Brunt, 1999), de acuerdo a la presencia de vesículas lipídicas en los hepatocitos.

Análisis cromatográfico para el perfil de ácidos grasos hepáticos

Extracción y separación de los lípidos hepáticos: La extracción cuantitativa de los lípidos hepáticos (totales y de fosfolípidos) se realizó de acuerdo al método de Bligh y Dyer (Bligh, 1959) en presencia de BHT como antioxidante. El tejido hepático fue homogenizado en frío utilizando cloroformo/metanol en una relación 2:1 v/v en cual contenía 0.01% de BHT en un homogenizador Ultraturrax (Janke & Kunkel, Stufen, Germany). Los lípidos extraídos desde el tejido hepático fueron separados por cromatografía en capa fina (TLC) con láminas de aluminio (20*20 cm silica 60 F-254; Merck, Santiago Chile), usando un sistema de solventes hexano/dietil eter/ácido acético (80:20:1 v/v). Después del desarrollo de las láminas en una lámpara UV CAMAG UV (250nm) diseñada especialmente para su uso en TLC. Las zonas lipídicas individuales fueron removidas de las láminas de silica gel de la TLC y transferidas y diluidas con cloroformo/metanol/agua (10:10:1 v/v).

Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos: Los lípidos saponificables obtenidos del tejido hepático fueron derivatizados a ésteres metílicos mediante hidrólisis alcalina (NaOH saturado en metanol), y posteriormente hidrólisis ácida (BF₃ al 12% en metanol).

Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos: Los ésteres metílicos fueron analizados por cromatografía de gases, utilizando un equipo marca HP modelo 6890, acoplado a una columna capilar marca SGE modelo BPX70 (50m*0.32mm y 0.25 µm de film), utilizando 917 hidrógeno como carrier (flujo constante de 1.5ml/min) e ionización en llama como método de detección. La temperatura fue programada desde 160 a 220°C, con 3°C/min y con un tiempo final de 5 minutos. La temperatura del detector y el inyector fue de 250°C. Los ácidos grasos fueron identificados mediante comparación de sus tiempos de retención con aquellos estándares individuales a través de integración computarizada.

Cálculo de tamaño muestral

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó el sistema OpenEpi versión 3. Suponiendo un límite de α de 0,05 y potencia de 80% ($1-\beta$) y basado en los datos obtenidos en la literatura (Bockhorn, 2007) que objetiva un aumento de 90% de la expresión de Ki67 en hígado remanente de rata pretratada con T3 respecto a controles. Se obtiene un tamaño muestral total de 6 ratas para cada tiempo de observación. Se conforman 4 grupos (3, 6, 24 y 120hr) cada grupo n= entre 4 y 6 ratas.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como promedio \pm error estándar de la media. Las diferencias entre grupo se analizaron con test Mann Whitney (Programa GraphPad Prism 5, Software, IINc. San Diego, USA), $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN HEPÁTICA POST HEPATECTOMÍA PARCIAL

Recuperación de la relación entre la masa hepática y masa corporal en los distintos tiempos post hepatectomía parcial.

La recuperación de la masa hepática post HPx, fue estimada como la relación entre la masa hepática y la masa corporal total y fue medida a las 3, 6, 24 y 120 hrs post HPx.

En los grupos que se efectuó cirugía Sham, tanto en el suplementado como en el no suplementado con aRM, la masa hepática corresponde al 4% de la masa corporal total, ($4,07 \pm 0,63\%$ y $4,05 \pm 0,64\%$ respectivamente, sin diferencias significativas), lo cual se expresa en la Fig. 3 con una línea horizontal en la gráfica.

A las, 3 y 6 hrs post HPx, los grupos suplementados con aRM y no suplementados no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto a la relación entre la masa hepática y masa corporal total.

A las 24 hrs post HPx es evidente una mayor recuperación de la relación entre la masa hepática y masa corporal total en el grupo no suplementado $2,18 \pm 0,07\%$, respecto al grupo suplementado $1,77 \pm 0,02\%$, siendo esta diferencia estadísticamente significativa $p < 0,01$. Pese a esta diferencia, a las 120 hrs ambos grupos se aproximan a recuperar la relación masa hepática y peso corporal, $3,06 \pm 0,11\%$ y $2,96 \pm 0,11\%$ respectivamente, sin diferencias significativas entre grupos.

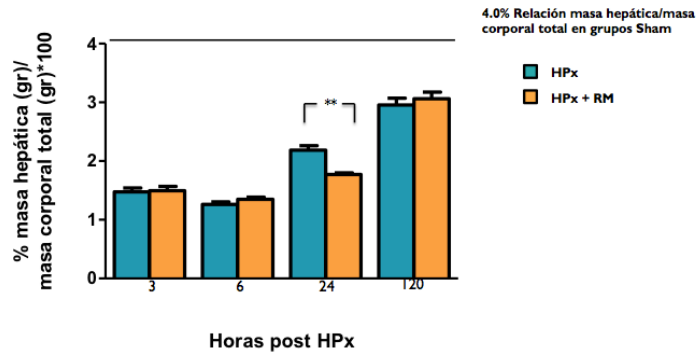


Fig .3. Curva de recuperación de masa hepática global en animales HPx con y sin suplementación con aRM. Cambios en la relación masa hígado/masa corporal total a 3, 6, 24 y 120 hrs post-HPx. La línea horizontal indica la relación masa hígado/masa corporal total normal (4%). Cada barra representa el promedio \pm SEM. ** P< 0,01

Índice mitótico en cortes histológicos de hígado en los distintos tiempos post hepatectomía

Respecto a las figuras mitóticas observadas en los cortes histológicos de parénquima hepático, estas están prácticamente ausentes en los tiempos tempranos -3 y 6 hrs- de todos los grupos analizados. A las 24 hrs post HPx se evidencian figuras mitóticas en los cortes histológicos de hígado de las ratas sometidas a HPx no suplementadas con aRM, lo que no se observa en el grupo suplementado, índice mitótico neto $0,73 \pm 0,26$ y $0,00 \pm 0,003$ mitosis/CAM respectivamente, con diferencia estadísticamente significativa entre grupos $p < 0,05$. (Fig 4 y 5).

A las 120 hrs no se visualizan figuras mitóticas en el grupo sometido a HPx no suplementado con aRM, por el contrario, en el grupo sometido a HPx suplementado con aRM es posible aún visualizar figuras mitóticas sin diferencias estadísticamente significativas.

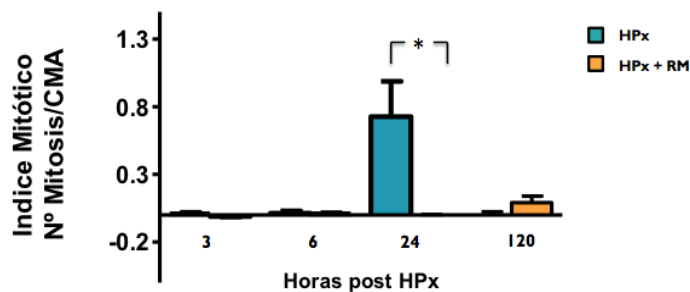


Figura 4. Índice mitótico neto en distintos tiempos post HPx. * $p < 0,05$

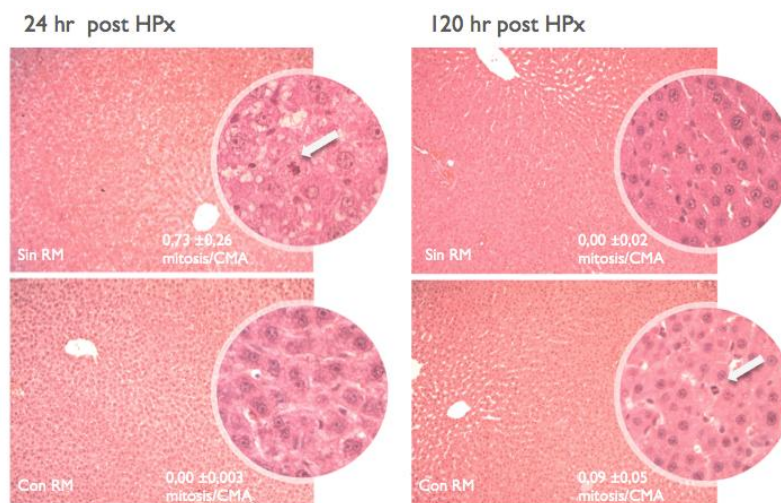


Figura 5. Cortes histológicos de parenquima hepático a las 24 y 120 hrs post HPx de grupo suplementado y no suplementado. Flecha blanca indica figura mitótica en CMA 400x.

Expresión de Ki 67 a nivel nuclear de los hepatocitos en cortes histológicos de hígado a las 24 hrs post HPx

Se evidencia mayor expresión de Ki67 a nivel nuclear en el grupo de ratas sometido a HPx no suplementado, en comparación al grupo suplementado con aRM.

En la Fig. 6 se observan imágenes representativas de la tinción IHQ para Ki-67 para los grupos experimentales HPx con y sin suplementación con aceite de RM a las 24 hrs post HPx. En los cortes histológicos se observa un menor número de células con núcleo positivo para Ki67 en el grupo sometido a HPx suplementado con aRM, a diferencia del grupo no suplementado a las 24 hrs post HPx ($0,03 \pm 0,17$ vs $3,98 \pm 0,74$, $p < 0,05$)

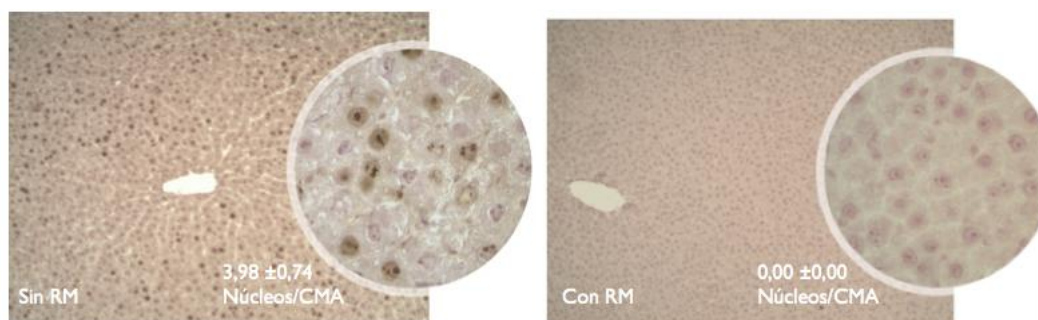


Figura 6 Tinción IHQ para Ki-67 a las 24 hrs post HPx para grupo sin suplementación a la izquierda y con suplementación con aceite de RM a la derecha. (100 y 400x)

Expresión de ARNm de CyD1 en los distintos tiempos post hepatectomía.

Se evidencia a las 3 y 6 hrs que la expresión ARNm de CyD1 baja en ambos grupos experimentales. A las 3 hrs la expresión de ARNm de CyD1 es mayor en el grupo de ratas sometidas a HPx no suplementadas respecto al grupo suplementado.

A las 6 hrs se observa una mayor expresión de ARNm de CyD1 en el grupo experimental sometidos a suplementación con aRM en comparación al grupo no suplementado, siendo esta diferencia aún mayor a las 24 hrs. En todos los tiempos se observan diferencias estadísticamente significativas, como se observa en la Fig. 7.

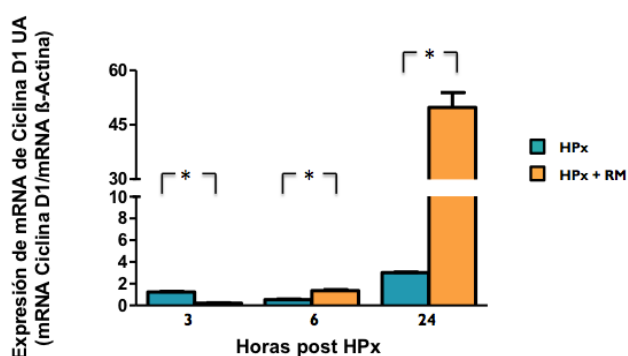


Figura 7 Expresión de mRNA CyD1 expresada en UA en distintos tiempos post HPx. * $p < 0,05$.

2. EVALUACIÓN DE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA TRANSITORIA

Descripción semicuantitativa de estosis hepática transitoria post hepatectomía parcial

En el proceso de regeneración hepática es posible evidenciar que a las 24 hrs ambos grupos, suplementados y no suplementados con aRM, presentan esteatosis hepática transitoria microvesicular severa, como se puede observar en la Fig. 8.

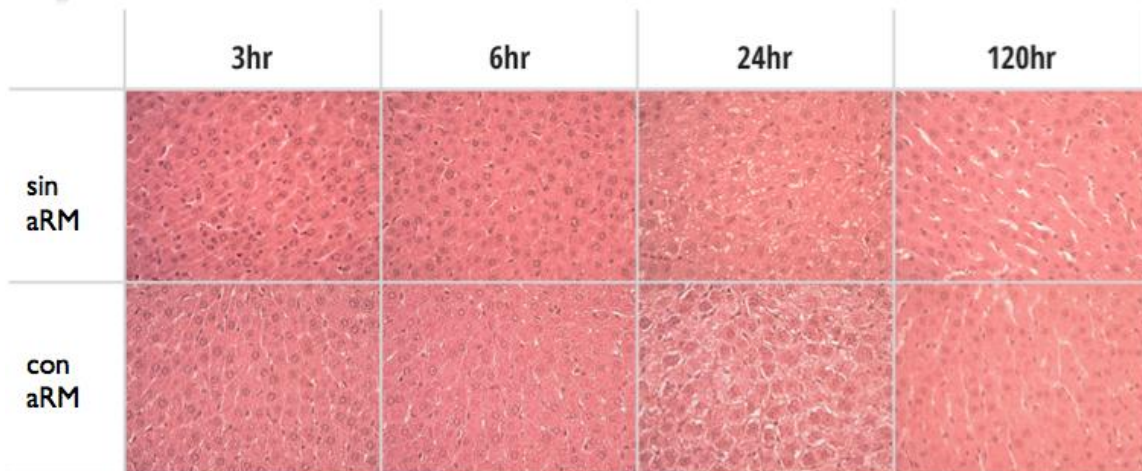


Figura 8 Cortes histológicos de parenquima hepático, tinción Hematoxilina-Eosina 400x a las 3, 6, 24 y 120 hrs. Fila superior: grupo no suplementado sometido a HPx y Fila inferior grupo suplementado aRM sometido a HPx.

Determinación de perfil de ácidos grasos hepáticos a las 24 hrs de observación

En el análisis cromatográfico se observa que en las ratas sometidas a cirugía Sham suplementadas con aRM basalmente presentan una mayor concentración de ALA y EPA en comparación con las no suplementadas. sin tener una diferencia en el contenido total de ácidos grasos (AG) ni evidencia de que exista mayor bioconversión a DHA en el grupo suplementado en comparación al no suplementado, es más se ve una tendencia a presentar menores niveles de DHA (Tabla 2).

En el grupo 24 hrs post HPx (Suplementado y no suplementado) se observa un aumento en el contenido total de AG respecto al grupo Sham (suplementado y no suplementado), diferencia que fue significativa ($p < 0,05$).

No se evidencia diferencias del contenido total de AG a las 24 hrs post HPx en el grupo suplementado en comparación al no suplementado, pero si una composición con predominio de ALA en el grupo suplementado con aRM sin evidenciarse una mayor biocorversion de EPA y DHA en este grupo, como se observa en la tabla 3.

g/100g Hígado	Sham	Sham RM
AG Totales	2,64±0,11	2,74±0,15
ALA	0,005±0,001	0,008±0,001 ^a
EPA	0,02±0,002	0,03±0,003 ^a
DHA	0,24±0,002	0,19±0,02

^a p<0,05

Tabla 2, Tabla con perfil de ácidos grasos hepáticos a las 24 hrs de observación en grupo suplementado (RM) y no suplementado sometidos a cirugía Sham. AG: ácidos grasos totales, ALA: ácido alfa linolénico, EPA: ácido eicosapentaenoico, DHA: ácido docosahexaenoico.

g/100g Hígado	HPx	HPx RM
AG Totales	3,41±0,23	3,69±0,19
ALA	0,023±0,005	0,052±0,005 ^a
EPA	0,02±0,002	0,03±0,003
DHA	0,25±0,002	0,20±0,04

^a p<0,05

Tabla 3, Tabla con perfil de ácidos grasos hepáticos a las 24 hrs de observación en grupo suplementado (RM) y no suplementado sometidos a Hepatectomía parcial. AG: ácidos grasos totales, ALA: ácido alfa linolenico, EPA: ácido eicosapentaenoico, DHA: ácido docosahexaenoico.

DISCUSIÓN

La regeneración hepática post HPx es un proceso complejo y altamente regulado que involucra señales endocrinas, paracrinas y autocrinas, lo cual genera la activación de vías celulares relacionadas con la proliferación celular, acompañada de la expresión de genes tempranos y tardíos relacionados al proceso (Michalopoulos, 1997). Luego de la etapa de iniciación, los hepatocitos ingresan en al menos una oportunidad al ciclo celular, hasta lograr la relación masa hepática/masa corporal total óptima. Tras conseguirla, comienza la etapa de terminación y la regeneración se detiene (Fausto, 2000).

Se ha evidenciado que la manipulación genética en modelos animales knock out (KO) relacionados con el metabolismo intermediario, así como la administración de leptina y glucosa, entre otras sustancias, puede afectar de manera negativa alguna de las vías celulares relacionadas con la proliferación celular, marcando un retraso en el proceso sin determinar su interrupción, lo que indica una redundancia de las vías y señales involucradas, debido a la importancia de la regeneración del órgano en circunstancias de compromiso vital de su función (Michalopoulos, 2007). Es relevante la búsqueda de moléculas que sean capaces de acelerar el proceso, para ser aplicado en la práctica clínica en relación a trasplante hepático donante vivo, la resección de lesiones hepáticas malignas para contar con un remanente suficiente en un menor periodo de tiempo y el tratamiento de algunas patologías debidas a insuficiencia hepática por daño y destrucción del órgano, asociado a regeneración insuficiente del tejido sano.

Previo a cada ciclo celular se observa esteatosis hepática, esto asociado a un cambio en la expresión génica de los hepatocitos con activación de genes adipogénicos y movilización de ácidos grasos periféricos hacia el hígado, lo que sugiere que la esteatosis transitoria es un componente regulado de la respuesta regenerativa, al parecer para asegurar la disponibilidad energética y sustrato para la formación de las membranas celulares (Shteyer, 2004). Los mecanismos que regulan el desarrollo y la resolución de la esteatosis hepática tras una HPx, así como la importancia funcional de estos eventos a la respuesta regenerativa, no se reconoce del todo (Huang, 2014).

El rol del metabolismo lipídico, tanto endógeno como exógeno, en el proceso de esteatosis que se observa en el proceso de regeneración hepática aún es contradictorio (Newberry, 2008).

El aumento de esteatosis producido en modelos animales usando ratones KO Ob/Ob o ratones suplementados con dietas altas en grasa evidencian un retraso en el proceso de proliferación. Por otro lado, la disminución de la esteatosis transitoria también se ha relacionado con retraso en el proceso regenerativo. Ejemplo de ellos son modelos animales KO para el gen que codifica al receptor de glucocorticoides o la administración de leptina en modelos animales in vivo (Shteyer, 2004). En el caso de modelos experimentales con ratones KO para Caveolina 1, han demostrado efectos contradictorios asociados a una menor concentración de triglicéridos en la esteatosis transitoria, que ha resultado en un efecto tanto negativo (Fernandez, 2006) como neutro (Mayoral, 2007) en el proceso regenerativo post HPx.

Un estudio que utilizó distintos modelos murinos con alteraciones en el metabolismo de lípidos, tanto exógeno como endógeno, no encontró correlación entre el grado de esteatosis transitoria y una menor capacidad regenerativa, es más, no hubo interferencia en el proceso de regeneración hepática post HPx, evaluando el porcentaje de células positivas para BrdU a las 48 hrs post HPx (Newberry, 2008). En este estudio, en el modelo KO para el gen que codifica la proteína de unión ácidos grasos hepáticos (L-Fabp), como en el modelo KO para el gen que codifica proteína microsomal transportadora de triglicéridos intestinal (MTP-IOK), esencial para la absorción de triglicéridos a nivel intestinal, se produce una disminución en el contenido de triglicéridos a nivel hepático sin afectar el proceso de regeneración, comparando con ratones Wild Type (WT). Además en el caso del modelo con ratones KO para el gen que codifica el receptor de peroxisoma-proliferador-activado (PPAR) $-\alpha$, relacionado con el catabolismo lipídico, aun cuando en este modelo se aprecia un mayor contenido de ácidos grasos a nivel hepático post HPx, en comparación a ratones control WT el proceso regenerativo no fue afectado.

El vínculo entre los cambios metabólicos con las vías moleculares del proceso regenerativos no es claro en la actualidad. Sí es evidente que el proceso de regeneración hepática post HPx

parcial es un proceso de alta demanda energética (Hardie, 2011). Al producirse un desbalance entre adenosín monofosfato/adenosín trifosfato (AMP/ATP), se activa la enzima, proteína quinasa activada por AMP (AMPK), generando un aumento de ATP al activar vías catabólicas e inactivar directamente las anabólicas. Estudios han demostrado que AMPK actúa como mediador en la activación de NF- κ B vía TNF- α , en la fase de iniciación. En 2009 fue descrita una vía no canónica relacionada a la proliferación del hepatocito HGF/c-Met, que involucra la activación del quinasa supresora de tumor LKB1 (proteína quinasa serina/treonina 1)/AMPK (Vazquez-Chantada, 2009). Tras la activación de AMPK, aumentan los niveles citoplasmáticos de la proteína de unión al ARNm, HuR, incrementando así la vida media de ciertos ARNm que codifican a proteínas relacionadas con la proliferación celular, como ARNm de ciclina A2 y D1, promoviendo la proliferación celular (Martinez-Chantar, 2006, Varela-Rey, 2011).

Por su parte el blanco de la Rapamicina en mamíferos (mTOR), es un elemento central en las vías de señalización relacionadas con ciclo celular, proliferación y síntesis de proteínas, y su inhibición se asocia a un retraso de 24 a 48 hrs en el proceso de regeneración hepática (Nelsen, Rickheim et al. 2003). La escasez de nutrientes y AMPK ejercen una regulación negativa sobre mTOR (Inoki, 2012). La regulación negativa entre AMPK y mTOR es contradictoria ya que de manera independiente se ha demostrado que ambos promueven la proliferación celular (Varela-Rey, 2011, Inoki, 2012), quizás la regulación negativa que ejerce AMPK sobre mTOR en un contexto de proliferación posee un umbral distinto al establecido en condiciones no relacionadas a la proliferación celular o bien actúan en períodos distintos en el proceso, para asegurar la disponibilidad de los sustratos necesarios durante todo el ciclo celular (Hardie 2011, Inoki, 2012) .

Los AGPICL omega-3 de origen animal, EPA y DHA, tienen efectos protectores frente al daño por IR (El-Badry, 2007, Videla, 2013), así como efectos en prevención y reversión del hígado graso no alcohólico (Scorletti, 2013), efectos asociados tanto a la acción antiinflamatoria y antioxidante, como también a los efectos benéficos en la microcirculación y regulación del metabolismo lipídico, incluida su interacción con AMPK (Suchankova, 2005). En relación al efecto de los AGPICL omega-3 de origen animal en la capacidad regenerativa

del parénquima hepático luego de una HPx, existen escasos reportes en la literatura y los resultados son contradictorios (Van Noorden, 1995, Melo, 2010, Kirimlioglu, 2006, Yan, 2011)

La presente tesis tuvo como objetivo evaluar el potencial efecto benéfico del uso de aRM, fuente de ALA precursor de EPA y DHA, en la proliferación hepática y esteatosis transitoria post HPx en ratas Sprague-Dawley, ya que estudios recientes de nuestro grupo de investigación demuestran efectos hepatoprotectores del aRM asociados a la bioconversión de ALA a EPA y DHA (Despessailles, 2015).

Se evidenció que la suplementación con aRM en el proceso de regeneración post HPx no acelera el proceso regenerativo, más aún, se observa un retraso temprano en el proceso de regeneración hepática observado a las 24 hrs post HPx, con una relación entre masa hepática y masa corporal total menor a la alcanzada por el grupo suplementado en comparación al grupo no suplementado, lo cual se ve relacionado con una menor número de núcleos positivos para Ki67, sin impedir el proceso ya que a las 120 hrs post HPx ambos grupos logran una relación masa hepática, masa corporal total similar, pese al retraso evidenciado a las 24 hrs post HPx. Los resultados obtenidos son concordantes con los niveles de expresión en relación a ARNm CyD1 en el mismo periodo de observación -24 hrs post HPx-. En el grupo suplementado la expresión de ARNm CyD1, la cual marca la progresión de G1 a S del ciclo celular, se ve aumentada en el grupo suplementado, concordando con la ausencia de figuras mitóticas en ese período, lo cual se observa en M, del ciclo celular.

Los estudios precedentes a esta tesis muestran hallazgos contradictorios respecto del efecto de la suplementación con AGPICL omega-3. Estos estudios poseen diferencias metodológicas que se deben considerar al momento de comparar resultados y ninguno de estos utiliza AGPICL omega-3 de origen vegetal. El contenido de EPA y DHA derivado del ALA contenido en aRM, fuente de AGPICL omega-3 de origen vegetal, es menor, ya que solo parte del total de ALA se bioconvierte en el organismo (Valenzuela, 2012). Por otro lado, el aRM posee en su composición vitamina C y compuestos fenólicos (Morales, 2012), lo cual podría ser un factor adicional que explique los resultados obtenidos, considerando que los

antioxidantes pueden retrasar el proceso de proliferación hepática por inhibición de estímulos relacionados con el estrés oxidativo y respuesta pro inflamatoria necesarios en el proceso (Taub, 2004).

El estudio de Yan et al., 2011., pese a la utilización de un pretratamiento diferente, AP, AGPICL omega 3 de origen animal intravenoso, 1ml/kg y 2ml/kg por un periodo 48 hrs previo a HPx y hasta 24 hrs post HPx previo a completar el periodo de observación, es el que más se asemeja en términos metodológicos a esta tesis, ya que utilizó sujetos de experimentación similares y objetivó la recuperación de la relación entre la masa hepática y masa corporal total al final del periodo de observación, además de objetivar con marcadores moleculares los hallazgos asociados a la relación masa hepática/masa corporal. En el estudio de Yan se demostró una relación positiva respecto a la suplementación con AP y la capacidad regenerativa, evidenciando una relación masa hepática/masa corporal mayor que el grupo de comparación, asociado a un aumento en los niveles antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) el segundo y tercer días post HPx (Yan, 2011).

La administración de aRM en ratas previo a HPx posee un efecto neutro en cuanto al contenido de esteatosis transitoria respecto al grupo no suplementado sometido a HPx a las 24 hrs post HPx. En cuanto al contenido específico de AGPICL se evidencia mayor contenido de ALA, sin presentar mayor bioconversión de EPA y DHA respecto a las ratas sometidas a HPx no suplementadas. No se cuenta con información de la composición de la esteatosis transitoria respecto a ALA, EPA y DHA en la literatura. Es por esto que se postula sin olvidar el potencial efecto antioxidante del aRM que el cambio del contenido lipídico de la esteatosis transitoria observada en el proceso de regeneración hepática post HPx podría explicar los hallazgos encontrados en la presente tesis sin poder determinar causalidad entre ellos.

Los resultados obtenidos, confirman el hecho que la regeneración hepática es un proceso biológico altamente regulado, en el cual participan vías de señalización múltiples y redundantes que interactúan en el proceso y que conlleva a que, si se afecta de manera negativa una de ellas, se puede generar un retraso en el proceso de regeneración sin determinar una interrupción él.

Dado que el aRM posee antioxidantes, se plantea la necesidad de llevar a cabo una medición del efecto antioxidante que posee el aRM o bien considerar realizar estudios con aRM sin tocoferoles, que son los principales antioxidantes de este aceite y definir si los hallazgos obtenidos son explicados tanto por el contenido a AGPICL o bien por el efecto antioxidante.

Aún no es claro el rol de AGPICL, principalmente EPA y DHA en el proceso de regeneración hepática. Planteo la realización de un estudio que evalúe si dosis crecientes de EPA y DHA se asocian a un periodo de proliferación hepática de menor duración. Para llevar a cabo la suplementación esta sería por vía oral, administrando EPA y DHA preformado iniciado 21 días previo a HPx y posteriormente mantener la suplementación hasta completar el período de observación. Como objetivos plantearía evaluar la actividad de AMPK y mTOR a las 6 hrs post HPx en relación a la suplementación y relacionar los cambios de actividad con el proceso de regeneración hepática, objetivando este proceso con la medición a las 24 y 48 hrs de niveles de ARNm ciclina D1, núcleos positivos para BrDU y relación de masa hepática y masa corporal en los periodos descritos.

Es importante continuar con el estudio de los mecanismos involucrados en el proceso de regeneración hepática con énfasis en la relación del metabolismo intermediario y las vías de proliferación hepática. Para ello es necesario precisar de mejor manera cómo AMPK y mTOR interactúan entre sí, planteando que potencialmente podría ser la clave en la relación del metabolismo intermediario y las vías de proliferación hepática.

CONCLUSIÓN

La suplementación con aRM genera un retraso en el proceso de proliferación hepática post HPx, sin retrasar el proceso global de regeneración.

Se postula que los datos obtenidos tendrían una asociación con el contenido lipídico de la esteatosis transitoria observada en el proceso de regeneración hepática post HPx, sin poder determinar causalidad entre ellos.

BIBLIOGRAFÍA

Bockhorm, M.; Frilling, A.; Benkö, T.; Best, J.; Sheu, S.Y; Trippler, M.; Schlaak, J.F.; Broelsh, C.E. "Tri-iodothyronine as a stimulator of liver regeneration after partial and subtotal hepatectomy." *Eur Surg Res.*39:58-63, 2007.

Brunt, E.M.; Janney, C.G.; Bisceglie, A.M.; Neuschwander-Tetri, B.A.; Bacon, B.R. "Steatosis score nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and stating the histological lesions." *Am J Gastroenterol.*94(9):2467-74, 1999.

Chenchen, W.; Harris, S.W.; Chung, M.; Lichtenstein, H.A.; Balk, M.E.; Kupelnick, B.; Jordan, S.H.; Joseph, L. "N 3 fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary and secondary prevention studies: a systematic review." *Am J Clin Nutr.*84:5-17, 2006.

Deryckere, F.; Gannon, F. "A one-hour minipreparation technique for extraction of DNABinding proteins from animal tissues." *Biotechniques.*16(3):405, 1994.

Despessailles, A.; Dossi, C.G.; Espinosa, A.; Gonzalez-Mañan, D.; Tapia, G.S. "Dietary Rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*) oil prevents high diet-induced hepatic steatosis in mice." *Food Funct.*6:3109-16, 2015

Bligh, E.; Gyer, W. "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can J Biochem Physiol.* 37(8):911-7, 1959.

El-Bardy, A.M.; Graf, R.; Clavien, P.A. "Omega 3- Omega 6: whats is right for the liver?." *J Hepatol.*47:718-725, 2007.

Farrell, G.C. "Probing Prometheus: fat fueling the fire?." *Hepatology.* 40(6):1252-1255, 2004.

Fausto, N. "Liver regeneration." *J Hepatol.* 32(1):19-31, 2000.

Fausto, N.; Riehle, K. J. "Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications." *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 12(3):181-9, 2005.

Fernandez, M.A.; Albor, C.; Ingelmo-Torres, M.; Nixon, S.J.; Ferguson, C.; Kurzchalia, T.; Tebar, F.; Enrich, C.; Parton, R.G.; Pol, A. "Caveolin-1 is essential for liver regeneration." *Science* 313(5793):1628–32, 2006.

Franco, D.; Pinelo, M.; Sineiro, J.; Nunez, M.J. "Processing of *Rosa rubiginosa*: extraction of oil and antioxidant substances." *Bioresour Technol.* 98(18): 3506-12, 2007.

Hardie, D.G. "AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function." *Genes Dev* 25(18):1895-1908, 2011.

Higgins, G.; Anderson, R. "Experimental pathology of liver: restoration of liver of the white rat following partial surgical removal." *Arch Pathol.* 12:186-202, 1931.

Huang, J.; Rudnick, D. "Elucidating the metabolic regulation of liver regeneration." *Am J Pathol.* 184:309-21, 2014.

Inoki, K.; Kim, J.; Guan, K.-L. "AMPK and mTOR in Cellular Energy Homeostasis and Drug Targets." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52:381–400, 2012.

Kirimlioglu, V.; Kirimlioglu, H.; Yilmaz, S.; Ozgor, D.; Coban, S.; Karadag, N.; Yologlu, S. "Effect of fish oil, olive oil, and vitamin E on liver pathology, cell proliferation, and antioxidant defense system in rats subjected to partial hepatectomy." *Transplant Proc.* 38(2): 564-7, 2006.

Kyu-Bong, K.; Yoon, A.N.; Hysung Sik, K.; Wallace, A.H.; Byung-Mu, L. " α -Linolenic acid: Nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation." *Food Chem. Toxicol.* 70: 163-78, 2014.

Mayoral, A.; Fernandez-Martinez, A.; Roy, R.; Bosca, L.; Martin-Sanz, P. "Dispensability and dynamics of caveolin- 1 during liver regeneration and in isolated hepatic cells." *Hepatology*. 46(3):813–22, 2007.

Morales, P.J.; Valenzuela, B.R.; González, M.D.; González, E.M.; Tapia, O.G.; Sanhueza, C.J.; Valenzuela, B.A. "New dietary sources of alpha-linolenic acid: a critical view." *Rev Chil Nutr*. 38(3):79-87, 2012.

Michalopoulos, G.K. "Liver regeneration." *J Cell Physiol*. 213(2): 286-300, 2007.

Michalopoulos, G.K. "Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas." *Am J Pathol*. 176(1): 2-13, 2010.

Michalopoulos, G.K.; Cianciulli, H.D.; Novotny, A.R.; Kligerman, A.D.; Strom, S.C.; Jirtle, R.L. "Liver regeneration studies with rat hepatocytes in primary culture." *Cancer Res*. 42:4673-82, 1982.

Mohammed, F.F.; Khokha, R. "Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division." *Trends in Cell Biology*. 15(10): 555-63, 2005.

Morales, P.J.; Valenzuela, B.R.; González, M.D.; González, E.M.; Tapia, O.G.; Sanhueza, C.J.; Valenzuela, B.A. "Nuevas fuentes dietarias de acido alfa-linolénico: una visión crítica." *Revista chilena de nutrición*. 39: 79-87, 2012.

Moreno Gimenez, J.C.; Bueno, J.; Navas, J.; Camacho, F. "Treatment of skin ulcer using oil of mosqueta rose." *Med Cutan Ibero Lat Am*. 18(1): 63-6, 1990.

Mortensen, K.E.; Conley, L.N.; Nygaard, I.; Sorensen, P.; Mortensen, E.; Bendixen, C.; Revhaug, A. "Increased sinusoidal flow is not the primary stimulus to liver regeneration". *Comp Hepatol*. 9(2): doi: 10.1186/1476-5926-9-2, 2010.

Nelsen, C.J.; Rickheim, D.G.; Turcker, M.M.; Hansen, L.K.; Albrecht, J.H. "Evidence That Cyclin D1 Mediates Both Growth and Proliferation Downstream of TOR in Hepatocytes." *J. Biol. Chem.* 278:3656-63, 2003.

Newberry P.E; Kennedy, M.S.; Xie, Y.; Luo, J.; Stanley, E.S.; Semenkovich, F.C.; Crooke, M.R.; Graham, J.M.; Davidson, O. N. "Altered Hepatic Triglyceride Content After Partial Hepatectomy Without Impaired Liver Regeneration in Multiple Murine Genetic Models." *Hepatology.* 48(4):1097–1105, 2008.

Oshima, R.; Nakano, H.; Katayama, M.; Sakurai, J.; Wu, W.; Koizumi, S.; Otsubo, T. "Modification of the hepatic mitochondrial proteome in response to ischemic preconditioning following ischemia-reperfusion injury of the rat liver." *Eur Surg Res.* 40(3): 247-55, 2008.

Rudnick, D.A.; Davidson, N.O. "Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration." *Int J Hepatol.* 2012: 1-9, 2012.

Scorletti, E.; Byrne, C.D. "Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease." *Annu Rev Nutr.* 33: 231-48, 2013.

Scorletti, E.; Byrne, C.D. "Omega-3 Fatty Acids, Hepatic Lipid Metabolism, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Annu Rev Nutr.* 33:231-148, 2013

Serhan, C.N.; Chiang, N.; Van Dyke, T.E. "Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators." *Nat Rev Immunol.* 8(5): 349-61, 2008.

Simopoulos, A.P. "The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases." *Exp Biol Med.* 233(6): 674-88, 2008.

Simopoulos, A.P. "Evolutionary aspect of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain." *Molecular Neurobiology.* 44(2):203-15, 2011.

Suchankova, G.; Tekle, M.; Saha, A.K.; Ruderman, N.B.; Clarke, S. D.; Gettys, T.W. "Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats." *Biochem Biophys Res Commun.* 326(4): 851-58, 2005.

Taub, R. "Liver regeneration: from myth to mechanism." *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(10): 836-47, 2004.

Valenzuela, B.A.; Sanhueza, C.J.; de la Barra, D.F. "El aceite de pescado: ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional." *Rec Chil Nutr.* 39(2):201-9, 2012.

Valenzuela, B.R.; Gormaz, L.J.; Masson, S.L.; Vizcarra, M.; Cornejo Z.; Valenzuela, B. A.; Tapia, O.G. "Evaluation of the hepatic bioconversion of alpha-linolenic acid (ALA) to eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in rats fed with oils from chia (*Salvia hispanica*) or rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*)." *Grasas y Aceites.* 63(1): 61-9, 2012.

Valladares, J.; Palma, M.; Sandoval, C.; Carvajal, F. "Crema de aceite de semilla de mosqueta (*Rosa Rubiginosa* L.) II parte: Estudio de las propiedades físico-químicas, de estabilidad, eficacia cosmética y aplicación sistemática en clínica." *Anales de la Real Academia de Farmacia.* 51: 597-612, 1986.

Van Noorden, C.J. "Effects of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid-enriched diets on lipid metabolism in periportal and pericentral compartments of female rat liver lobules and the consequences for cell proliferation after partial hepatectomy." *Lipid Res.*36:1708-20, 1995.

Varela-Rey, M.; Beraza, N.; Lu, S.C.; Mato, J.M.; Martinez-Chantar, M.L. "Role of AMP-activated protein kinase in the control of hepatocyte priming and proliferation during liver regeneration." *Experimental Biology and Medicine.* 236(4): 402-8, 2011.

Vazquez-Chantada, M.; Ariz, U.; Varela-Rey, M.; Embade, N.; Martinez-Lopez, N.; Fernandez-Ramos, D.; Gomez-Santos, L.; Lamas, S.; Lu, S.C.; Martinez-Chantar, M.L.; Mato, J.M. "Evidence for LKB1/AMP-activated protein kinase/ endothelial nitric oxide synthase

cascade regulated by hepatocyte growth factor, S-adenosylmethionine, and nitric oxide in hepatocyte proliferation." *Hepatology*.49(2): 608-17, 2009.

Videla, L.A.; Fernández, V.; Tapia, G. "New Insights Into Pharmacological Liver Preconditioning Strategies: L3,3,5Triiodothyronine And N3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids." *Rev. Farmacol. Chile*. 6(3):7, 2013.

Wu, Y.; Zhang, C.; Dong, Y.; Wang, S.; Song, P.; Viollet, B.; Zou, M.H. "Activation of the AMP-activated protein kinase by eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) improves endothelial function in vivo". *PLoS One*. 7(4): e35508. doi: 10.1371/journal.pone.0035508, 2012.

Yan, X.P.; Wang, S.; Yang, Y.; Qiu, Y.D. "Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on rat livers after partial hepatectomy via LKB1-AMPK signaling pathway". *Transplant Proc*. 43(10): 3604-12, 2011.

