



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO
GRADOS ACADEMICOS

**“Papel del factor de transcripción Nrf2 en el
preacondicionamiento hepático inducido por
hierro y hormona tiroídea, frente a isquemia-
reperfusión en ratas.”**

Juan Cristóbal Pedemonte Trehwela.

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
MÉDICAS MENCIÓN FARMACOLOGÍA**

Director de Tesis: Prof. Dra. Virginia Fernández

Co-Director de Tesis: Prof. Dr. Luis Videla

2014

Financiado por FONDECYT 1110006

**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 el candidato

Juan Cristóbal Pedemonte Trehwela.

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Farmacología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 23 de julio del año 2014.

**Prof. Dra. Virginia Fernández
Director(a) de Tesis
Facultad de Medicina – ICBM**

**Prof. Dr. Luis Videla
Codirector(a) de Tesis
Facultad de Medicina - ICBM**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Gina Sanchez

Prof. Dra. M^a Eugenia Letelier

Prof. Dra. M^a Julieta González

Prof. Dr. M^a Margarita Vega

Prof. Dr. Ramón Rodrigo

*Esta tesis está dedicada a mis hijos
que están por nacer*

Agradecimientos

A mi esposa Erita por su invaluable apoyo. A todos los profesores del laboratorio de “Estrés oxidativo y hepatotoxicidad”, en particular a mis directores de tesis, la Prof. Dra. Virginia Fernández y el Prof. Dr. Luis Videla. Y por su gran apoyo en la enseñanza de las técnicas y enorme paciencia en el laboratorio, mis más profundos agradecimientos a Romina Vargas.

INDICE

- 1. Resumen**
- 2. Abstract**
- 3. Introducción**
- 4. Hipótesis**
- 5. Objetivo General**
- 6. Objetivos Específicos**
- 7. Materiales y Métodos**
- 8. Resultados**
- 9. Discusión**
- 10. Conclusión**
- 12. Bibliografía**

Resumen:

El metabolismo celular aeróbico está asociado a la generación de especies pro-oxidantes que pueden dañar biomoléculas contribuyendo a la generación de enfermedades y al envejecimiento celular. El estrés oxidativo (EOx) es un desequilibrio del balance pro-oxidante/antioxidante en favor de especies pro-oxidantes. La isquemia de un órgano seguido de reperfusión (IR), se asocia a la inducción de EOx drástico, con generación masiva de especies reactivas pro-oxidantes que conllevan a inflamación y muerte. La administración de L-3,3',5- triyodotironina (T_3) como también la de hierro (Fe) gatillan precondicionamiento hepático frente a la IR. Ambas estrategias precondicionantes involucran la estimulación de mecanismos hepatoprotectores a través de la inducción de un EOx moderado. En esta tesis se evaluó el efecto precondicionante, frente a la IR hepática, otorgado por la administración conjunta de dosis reducidas no precondicionantes de Fe y T_3 . Esto gatilla la activación del factor de transcripción redox sensible Nrf2 (relación Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico) y aumento de la expresión de la enzima antioxidante glutamato-cisteína-ligasa C (GCLC) regulada por Nrf2.

Ratas Sprague Dawley macho fueron sometidas a un esquema de precondicionamiento que contempló la administración de 2 dosis de Fe (50mg/kg) o volumen equivalente de solución salina (días 0 y 2), seguido de una dosis única de T_3 (0,05mg/kg) o volumen equivalente de NaOH 0,1N (día 5). La IR (1 hr de isquemia y 20 hrs de reperfusión) o cirugía sham, se realizaron el día 7. Los grupos experimentales fueron: [a] salino-NaOH-sham; [b] salino-NaOH-IR; [c] Fe-NaOH-sham; [d] Fe-NaOH-IR; [e] salino- T_3 -sham; [f] salino- T_3 -IR; [g] Fe- T_3 -sham; [h] Fe- T_3 -IR.

El tratamiento conjunto (Fe/ T_3) otorgó hepatoprotección significativa con normalización de transaminasas AST y ALT séricas e histologías hepáticas. Además se asoció a una reducción significativa del EOx hepático drástico, inducido por la IR. En concomitancia a la hepatoprotección conferida por el protocolo precondicionante Fe/ T_3 , la relación Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico aumentó significativamente, en relación a animales salino/NaOH y controles sham. En relación a la expresión génica (contenido de mRNA) de la GCLC en animales precondicionados con Fe/ T_3 , la IR gatilló un incremento significativo de esta enzima antioxidante, sin cambios significativos frente al tratamiento con Fe o T_3 por separado.

Se concluye que la administración conjunta de Fe y T_3 precondiciona al hígado de la rata frente a la IR. Este efecto estaría asociado a mayor ingreso de Nrf2 al núcleo, seguido de un

aumento en la expresión de la GCLc, enzima antioxidante que otorga hepatoprotección frente a la IR.

Abstract:

Cellular aerobic metabolism is associated with generation of pro-oxidant species that can harm biomolecules contributing to the generation of diseases and cell ageing. Oxidative stress (OS) is an imbalance between pro-oxidant species versus anti-oxidant species in favor of the former. Ischemia reperfusion (IR) injury is associated with massive generation of OS, with considerable production of pro-oxidant species that may produce inflammation and death. L-3, 3',5-triiodothyronine (T_3) or iron (Fe) administration develops hepatic preconditioning against IR. Both preconditioning strategies involve stimulation of hepatoprotective mechanisms inducing moderate OS. Therefore, this thesis evaluated the preconditioning effect of combined and reduced non-preconditioning doses of T_3 and Fe in relation to the activation of transcription factor redox sensitive Nrf2 (nuclear Nrf2/cytosolic Nrf2 ratio) and the increase in expression of antioxidant protein glutamate cysteine ligase-C (GCLc) regulated by Nrf2.

Male Sprague Dawley rats received a preconditioning protocol consisting in the administration of Fe (50 mg/kg, 2 doses) or the equivalent volume of saline solution (day 0 and 2), followed by a unique dose of T_3 (0,05mg/kg) or the equivalent volume of NaOH 0,1N (day 5). IR (1 hour ischemia and 20 hours of reperfusion) or sham surgery was realized on day 7. Experimental groups were: [a] saline-NaOH-sham; [b] saline-NaOH-IR; [c] Fe-NaOH-sham; [d] Fe-NaOH-IR; [e] saline- T_3 -sham; [f] saline- T_3 -IR; [g] Fe- T_3 -sham; [h] Fe- T_3 -IR.

Combined treatment (Fe/ T_3) resulted in significant hepatoprotection, with normalization of transaminases (AST and ALT) and hepatic histology. This was associated with a significant reduction in drastic hepatic OS, which was previously induced by IR. Concomitantly with the hepatoprotection provoked by the preconditioning protocol Fe/ T_3 , nuclear Nrf2/cytosolic Nrf2 ratio significantly increased as compared to saline/NaOH and sham control animals. IR triggered a significant increase in gene expression (mRNA content) of GCLc in Fe/ T_3 preconditioned animals, without significant changes with Fe or T_3 treatment administered independently.

In conclusion, the combined administration of Fe and T_3 in rats produces hepatic preconditioning against IR, an effect that is associated with higher translocation of Nrf2 to the nucleus, with the concomitant increase in GCLc expression.

Introducción

1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EOx) se define como un desequilibrio en el cual el balance pro-oxidante/antioxidante se inclina hacia los pro-oxidantes (1). Este es un fenómeno inherente a la naturaleza aeróbica del metabolismo celular, en el cual la reducción del oxígeno (O_2) es un factor primordial. Debido a su estructura electrónica, las reacciones químicas que conllevan a la reducción del O_2 corresponderían a etapas sucesivas de transferencia de un electrón. Este proceso reductivo conduce a la formación de intermediarios de naturaleza radicalaria y no radicalaria de gran reactividad química, conocidos como especies reactivas derivadas del O_2 (EROS), además de la formación de especies reactivas del nitrógeno (ERNS).

(a) Especies reactivas derivadas del oxígeno La producción de EROS, derivada de la reducción univalente del O_2 (Figura 1), se inicia con la formación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) mediante procesos enzimáticos (enzimas NADPH oxidasa y xantino oxidasa) o no enzimáticos a través de compuestos redox sensibles como la semi-ubiquinona encontrada en la cadena transportadora de electrones mitocondrial (2). La enzima superóxido dismutasa (SOD) convierte al $O_2^{\cdot-}$ en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En tejidos biológicos, el $O_2^{\cdot-}$ puede ser convertido de forma no enzimática, en las especies no radicalarias peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singlete (1O_2). Ante la presencia de metales de transición reducidos (iones ferroso [Fe^{+2}] y cuproso [Cu^+]), el H_2O_2 puede ser convertido al altamente reactivo radical hidroxilo ($\cdot OH$). Alternativamente, el H_2O_2 puede ser transformado en agua (H_2O) mediante las enzimas catalasa o glutatión peroxidasa (2). En esta última reacción, el glutatión (GSH) es oxidado a disulfuro de glutatión (GSSG), el cual puede ser convertido de forma inversa a GSH mediante la enzima glutatión reductasa en un proceso que consume NADPH (2) (Figura 1).

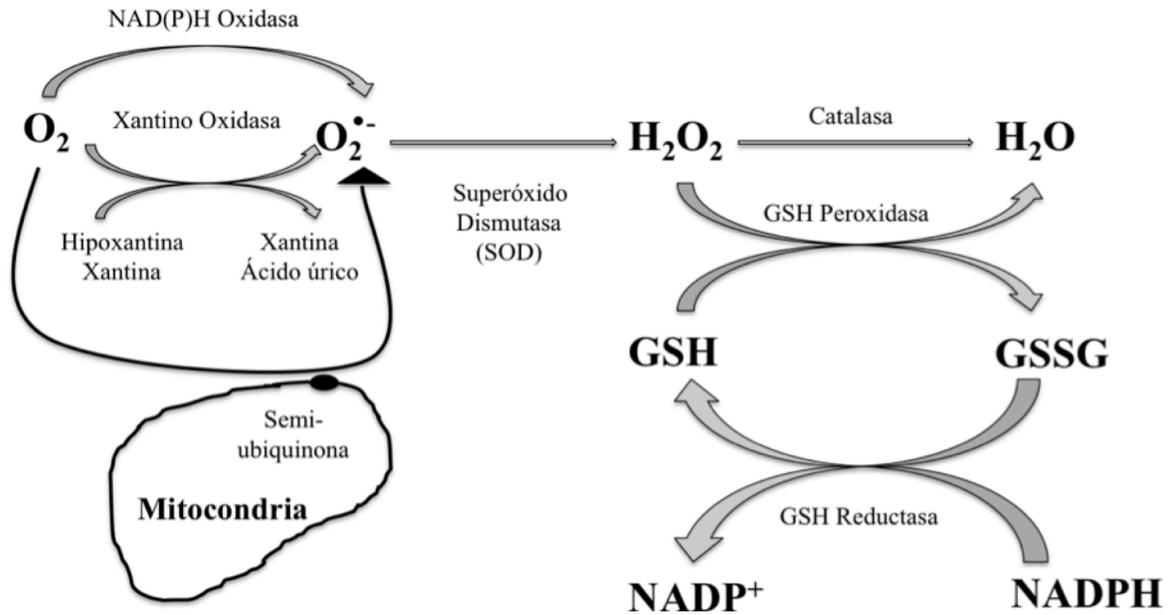


Figura 1. Vías de producción y depuración de especies reactivas del oxígeno (EROS). GSH: glutatión, GSSG: disulfuro de glutatión. Extraído de: Drögue W. Free Radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.

(b) Especies reactivas derivadas del nitrógeno La producción de ERNS proviene de la formación del radical óxido nítrico ($\cdot NO$). Este se produce en organismos superiores mediante la oxidación de uno de los átomos de nitrógeno guanido de L-arginina, reacción catalizada por la enzima NO sintasa (NOS). Dependiendo del microambiente, el $\cdot NO$ puede ser convertido en varias otras ERNS como el catión nitrosonio (NO^+), o los aniones nitroxilo (NO^-) o peroxinitrito ($ONOO^-$) (2). Estos compuestos son capaces de dañar biomoléculas, contribuyendo en gran medida al desarrollo de múltiples enfermedades y a favorecer el envejecimiento celular (1,2). En este sentido, el daño inducido por la deprivación de O_2 o isquemia de un órgano o tejido, seguido de la reperfusión con restauración del suministro de O_2 , se asocia a la inducción de EOX drástico, con generación masiva de EROS y ERNS que producen inflamación y muerte.

2. Daño por isquemia-reperfusión (IR)

Diversos escenarios determinan que un órgano esté sometido a una situación de IR. Este fenómeno se manifiesta en el trasplante, el infarto al miocardio, el accidente

cerebrovascular, traumatismos mayores, la cirugía bajo exclusión vascular y algunos estados de shock de diverso origen (3,4). En el hígado, la IR se produce en algunos procedimientos quirúrgicos, especialmente aquellos relacionados a resecciones extensas, shock o trasplantes. El daño por IR representa la mayor causa post trasplante hepático de falla del injerto. Esto ocurre independiente de las condiciones basales del hígado, siendo más relevante en órganos provenientes de donantes con complicaciones médicas (5). Una vez re-establecido el flujo, el hígado es blanco de un nuevo insulto, agravando aún más el daño provocado por la falta de oxígeno y nutrientes durante la isquemia (6).

El proceso de IR hepático tiene dos fases. La primera, involucra un compromiso celular inmediato de un evento isquémico seguido de la reperfusión. En cambio la segunda fase involucra al sistema inmune, específicamente la activación de células de Kupffer, infiltración de neutrófilos circulantes y linfocitos en el hígado post isquémico (7). El insulto isquémico inicial en el hígado produce necrosis limitada dentro de minutos de la reperfusión. La muerte celular necrótica inicial produce la liberación de contenidos celulares y compuestos endógenos (patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)), proteínas de estrés térmico (heat shock proteins), DNA, RNA) capaces de activar una respuesta innata a partir de células inmunes. Estos compuestos endógenos liberados se unen a las células inmunes a través de receptores especializados (receptores tipo toll) que se activan y determinan la respuesta directa de neutrófilos y fagocitos generando así una respuesta inflamatoria. Además, estos eventos se amplifican mediante formación y liberación de citoquinas y componentes del sistema del complemento (C5a). Tanto citoquinas como los fragmentos activados del complemento son capaces de activar células de Kúpffer y reclutar neutrófilos, células que pueden producir mayor cantidad de ROS, gatillando la expresión de moléculas de adhesión (CD11b/CD18) en neutrófilos lo que permite su reclutamiento en la vasculatura hepática (8). Por lo tanto, la IR hepática descontrolada es un proceso que determina falla microcirculatoria, activación plaquetaria, vasoconstricción persistente, producción de moléculas de adhesión, estrés oxidativo, activación de células de Kupffer, infiltración de neutrófilos

y muerte de hepatocitos (5). Se genera daño y muerte en el evento inicial, y en mayor medida por la respuesta gatillada en la reperfusión tardía.

El mecanismo exacto de muerte celular en el daño por IR aún permanece incierto. La necrosis oncótica es la consecuencia más común del daño metabólico asociado a la depleción de ATP. Minutos posterior a este daño, se produce un balonamiento¹ del hepatocito, asociado a pequeñas protusiones de la membrana citoplasmática, llamadas “blebs”. La mantención de este estado, produce depolarización mitocondrial, rotura lisosomal, pérdida bidireccional de aniones, cambios iónicos rápidos, formación acelerada de “blebs” e hinchazón celular. Si esto perdura algunos minutos, finalmente genera la rotura de las “blebs”. Este paso, causa el quiebre irreversible de la barrera de permeabilidad de la membrana plasmática. Se produce un colapso de todo el gradiente iónico y eléctrico a través de la membrana plasmática, pérdida de enzimas citosólicas e intermediarios metabólicos. La rotura de “blebs” marca el evento final precipitante de la muerte celular oncótica (7).

La apoptosis representa un escenario totalmente diferente. En la necrosis oncótica se observa muerte de grandes grupos celulares contiguos. En cambio, en la apoptosis existe muerte individual de células que pueden encontrarse separadas entre sí. Además, a diferencia de la necrosis oncótica donde se observa un balonamiento¹ celular previo a la muerte, en la apoptosis se observa un encogimiento² celular. También es posible observar cambios nucleares característicos en apoptosis: condensación de cromatina, degradación de DNA internucleosomal, lobulación y fragmentación nuclear. Muchos estímulos inician la apoptosis, incluyendo ligandos de receptores de muerte (factor de necrosis tumoral alfa -TNF α -, ligando FAS), daño al DNA (radiación iónica, agentes quimioterapéuticos para cáncer) y falta de factores de crecimiento, entre otras. La IR hepática produce activación de la vía c-Jun N-terminal kinasa 2 que activa la vía de permeabilización mitocondrial (MPT) generando así la liberación de citocromo c (Cyto C) y la activación de una cascada de cisteína-aspartato proteasas, llamadas caspasas, que degradan proteínas celulares para dar así la morfología celular típica (5,7).

¹ Del inglés “swelling”

² Del inglés “shrinking”

Así surge la controversia sobre la etiología del daño del parénquima hepático severo que se observa durante la reperfusión hepática. Independientemente de que necrosis y apoptosis han sido considerados procesos completamente distintos, el término “necroapoptosis” (Figura 2) ha sido utilizado para describir un proceso que se inicia con una señal de muerte en común; pero que termina en lisis celular (muerte celular necrótica u oncótica) o en reabsorción celular programada (apoptosis) (5).

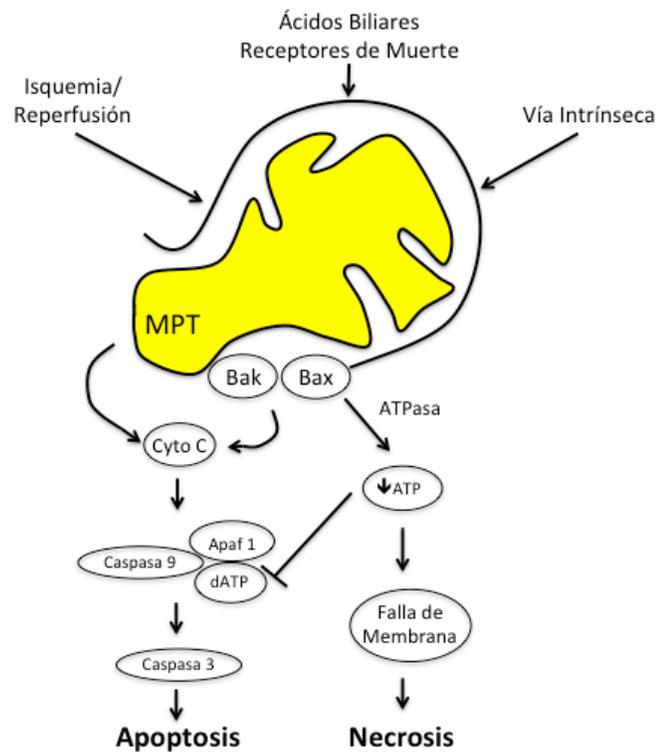


Figura 2. Necrosis y apoptosis como resultados de la permeabilización mitocondrial. Diversos estímulos convergen en la mitocondria para inducir la permeabilización de su membrana. Esto puede incluir la formación de canales en la membrana externa o la inducción de MPT, seguido de embalamiento mitocondrial y posteriormente rotura de la membrana externa. Algunas noxas pueden causar directamente la aparición de MPT. Tras la permeabilización mitocondrial, se produce la liberación del citocromo c con la consecuente activación secuencial de caspasa 9 y caspasa 3 en una reacción que requiere Apaf1 y dATP (o ATP) llevando así a apoptosis. Con una disfunción mitocondrial severa, los niveles de ATP celular disminuyen en parte debido a la activación de la ATPasa desacoplante mitocondrial. Con la depleción de ATP, la activación de las caspasas se bloquea y se produce necrosis. Modificado desde Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and Necrosis in the Liver: A Tale of Two Deaths? *Hepatology* 2006;43:S31-S44.(7)

La evidencia que involucra a la apoptosis como un evento primordial en el daño inducido por IR hepática se basa principalmente en estudios realizados con la técnica

TUNEL (marcado del extremo libre por desoxi-uridina trifosfato –dUTP- mediado por la desoxi transferasa terminal). Esta técnica no es específica para apoptosis. Estudios realizados con inhibidores de caspasas asociados a evaluación morfológica han demostrado que el daño por reperfusión no involucra a la apoptosis como causa relevante (9). Por lo tanto, actualmente se acepta que la noxa inducida por EROS en el daño por IR hepática se debe principalmente a necrosis.

3. Estrés oxidativo moderado

El ataque oxidativo a biomoléculas puede implicar la pérdida, ganancia o el cambio cualitativo de una determinada función. Es así como se entiende que a nivel celular el EOx pueda desencadenar un amplio espectro de respuestas, dependiendo del tipo celular, el nivel de ROS o RNS alcanzado y la duración de la exposición (10). Diversas condiciones patológicas, entre ellas la IR, han sido asociadas a la generación excesiva y/o prolongada en el tiempo de EROS y ERNS. Sin embargo, el aumento controlado y temporal en la producción de especies pro-oxidantes puede activar mecanismos redox que conllevan a la mantención de un estado estable o de homeostasis (2,10). El desbalance temporal en la producción y eliminación de especies pro-oxidantes en ausencia de daño celular corresponde al EOx moderado, cuya temporalidad limitada se asocia al gatillamiento de mecanismos citoprotectores contra agentes deletéreos. Este fenómeno ocurre a través de regulación de vías de señalización celular, que determinan la activación de mecanismos de citoprotección antioxidantes, previniendo el daño causado por incrementos drásticos de EROS y ERNS (2,10). Al respecto, destaca el fenómeno de preacondicionamiento de un órgano o tejido, proceso que se ha estudiado e implementado en diversos modelos.

4. Preacondicionamiento hepático frente a la IR

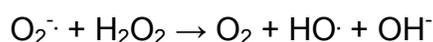
El preacondicionamiento es un proceso biológico endógeno que se manifiesta al exponer un órgano a una situación citotóxica que otorga protección a dicho órgano frente a una nueva exposición citotóxica más agresiva (11). A nivel hepático se han intentado múltiples estrategias de preacondicionamiento: la IR breve

(preacondicionamiento isquémico), la administración de fármacos y la terapia génica (12). Todos estos mecanismos representan una forma de hormesis, es decir, la estimulación de mecanismos protectores a través de un estrés moderado, que resulta en efectos biológicamente beneficiosos para los organismos (13).

(a) Preacondicionamiento hepático inducido por L-3,3',5-triyodotironina (T_3) La administración de T_3 estimula la calorigénesis acelerando el consumo de O_2 mitocondrial mediante la activación transcripcional de genes respiratorios. A nivel hepático, aumenta la generación de EROS tanto en los hepatocitos como en las células de Küpffer. Esto gatilla un EOX moderado que activa a factores de transcripción redox-sensibles. Consecuentemente, las células de Küpffer liberan citoquinas, como TNF- α e interleuquinas (IL-1 e IL-6), que incrementan la expresión hepática de proteínas citoprotectoras. Éstas poseen naturaleza anti-oxidante, anti-apoptótica y anti-inflamatoria, restableciendo la homeostasis redox (14). En este sentido se ha descrito que el EOX moderado, inducido por una dosis única de T_3 (0,1 mg/kg) protege al hígado de rata frente a la IR, en una ventana de 48 horas. Se constituye así un mecanismo de preacondicionamiento hepático no-invasivo, asociado a la activación de los factores de transcripción redox-sensibles NF- κ B y STAT3, y a un aumento de la respuesta hepática de fase aguda (15). Estos mecanismos adaptativos inducidos por T_3 representan una forma de hormesis, al restablecer la homeostasis redox, promover la viabilidad celular y permitir una protección significativa frente a la injuria inducida por la IR (10,14).

(b) Preacondicionamiento hepático inducido por hierro (Fe) El Fe es un micronutriente esencial y un bio-catalizador de reacciones de óxido reducción (16, 17). Se presenta en los estados de oxidación Fe^{+2} y Fe^{+3} , lo que le permite actuar como catalizador en reacciones redox al donar o aceptar electrones. Cuando su capacidad de eliminación o almacenamiento se ve superada, el Fe puede ser potencialmente tóxico, debido a la generación incontrolada de EROS (16,18). La toxicidad del Fe está relacionada con su capacidad de catalizar la generación de ROS. Esto se produce a través de reacciones tipo Fenton y Haber-Weiss en las

cuales se genera radical hidroxilo (HO·), especie altamente reactiva y nociva por su alta capacidad de interactuar con diversas biomoléculas celulares (19).



El transporte sanguíneo del Fe es mediado por transferrina, proteína sérica que une con alta afinidad 2 iones Fe^{+3} . Estos son incorporados a las células vía receptores para transferrina, reducidos a Fe^{+2} y liberados al citosol. Una fracción permanece unida a moléculas de bajo peso molecular (por ejemplo citrato, ATP, pirofosfatos y ácido ascórbico) constituyendo el llamado “pool de Fe lábil”, disponible para entrar en procesos redox intracelulares (18). El exceso de Fe intracelular es secuestrado por ferritina, la principal proteína para el almacenamiento de Fe intracelular. Esta cumple un papel clave en la prevención de la toxicidad desencadenada por el Fe (18). De esta manera, la reactividad potencialmente peligrosa y el potencial oxidativo del Fe se encuentran cuidadosamente modulados gracias a su captación por ferritina, como también por la presencia de moléculas antioxidantes (18).

Se ha descrito que un tratamiento sub-crónico con Fe (6 dosis de 50 mg/kg, en días alternados), preconditiona al hígado de la rata frente a la IR (20). El preconditionamiento inducido por Fe se relaciona con la inducción de EOX moderado. Esto permite la reversión de cambios en vías de transducción de señales, regulados por NF- κ B, secundarios a la injuria hepática inducida por la IR. Del mismo modo se observa la recuperación de la respuesta de fase aguda hepática, disminuida por la IR, y la supresión del EOX drástico inducido por la IR (20,21).

En conclusión, tanto T_3 como Fe preconditionan al hígado frente a la IR, constituyendo nuevas estrategias con potencial uso en la clínica humana. Sin embargo, la dosis preconditionante de T_3 (una dosis de 0,1 mg/kg) y/o el período

de tratamiento con Fe (6 dosis de 50mg/kg) podrían generar efectos colaterales no adecuados para su aplicación clínica. Por tal motivo resulta interesante evaluar el efecto precondicionante de la administración conjunta de Fe y T₃ que considere una disminución del período de tratamiento con Fe junto a una reducción de la dosis de T₃.

5. Factor de transcripción Nrf2

La capacidad del organismo de generar mecanismos de adaptación a diversos tipos de estrés es un requisito indispensable para la supervivencia celular y de los organismos (22). Esto explica el desarrollo de un complejo sistema de defensa para proteger al organismo frente a xenobióticos y especies reactivas pro-oxidantes. Existen enzimas de la familia de los citocromos P450 que metabolizan los xenobióticos (fase I), mediante reacciones de óxido reducción generando productos de mayor hidrosolubilidad, electrofílicos y altamente reactivos. En la fase II, estos productos son conjugados con ligandos endógenos hidrofílicos que reducen su electrofilicidad, entre los cuales destacan el glutatión en su forma reducida (GSH) y el ácido glucurónico (23). Entre las enzimas que participan indirectamente en la fase II, se encuentra la glutamato-cisteína-ligasa c (GCLc) enzima que cataliza la primera reacción de la síntesis de glutatión, etapa limitante de dicho proceso (24).

Algunos genes que codifican para enzimas de la fase II, poseen secuencias de consenso en sus promotores, denominadas elementos de respuesta antioxidante (ARE), con secuencias de DNA que pueden ser activadas por agentes oxidantes (19,22,23). Al producirse diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos, las secuencias ARE pueden activarse y desencadenar la transcripción de proteínas citoprotectoras. Entre los factores de transcripción que reconocen secuencias ARE destaca el factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 (Nrf2), principal factor para la transcripción de genes con secuencias ARE (23).

Nrf2 se expresa constitutivamente en la mayoría de las células, por lo que su actividad debe estar estrictamente regulada. Considerando que la célula debe contar con un determinado estado redox para mantener la homeostasis, en relación a la

transcripción y activación de diversas enzimas, Nrf2 no se encuentra libre y activo de forma persistente sino que únicamente cuando se generan condiciones de EOX (22). Los Nrfs son proteínas básicas con seis dominios conservados asociados a su regulación negativa, denominados Neh y localizados en la región N-terminal. Pertenecen a una familia de proteínas básicas con un cierre de leucinas (bZip) en la región C-terminal, siendo la región básica responsable de la unión al DNA, mientras que la región ácida sería requerida para la activación transcripcional (25).

La vida media de Nrf2 es muy corta. Se han encontrado niveles constitutivos de RNAm para Nrf2, sin embargo es difícil detectar a la proteína madura, lo que sugiere que existe una rápida degradación intracelular de ésta. Estudios con inhibidores del proteosoma indican que la degradación de Nrf2 ocurre vía ubiquitinación y degradación proteosomal (26). La célula sintetiza y degrada Nrf2 de manera sistemática, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en la síntesis *de novo* (27). Estudios en levaduras identificaron a la proteína Keap-1 que suprime la traslocación nuclear de Nrf2 y por ende su actividad transcripcional, lo que ha sido confirmado en células de mamíferos (22). Keap-1 se une a Nrf2 formando un complejo (Keap-1/Nrf2) que se retiene en el citosol mediante interacciones con el citoesqueleto (22). La degradación de Nrf2 es un evento constitutivo y se sugiere que Keap-1 funciona como un adaptador de sustratos al proteosoma, a través de su homo-dimerización que facilita la interacción de ciertos dominios, induciendo la ubiquitinación de residuos de lisina en Nrf2, promoviendo su degradación proteosomal (22).

En respuesta a electrófilos y agentes oxidantes (Figura 3), se produce la oxidación de grupos SH de cisteínas en Keap-1. Se promueve la disociación del complejo Keap-1/Nrf2. Seguido de la traslocación al núcleo de Nrf2, formación de heterodímeros con proteínas Maf y unión a secuencias ARE, ubicadas en regiones promotoras de genes que codifican para proteínas citoprotectoras antioxidantes (25, 28).

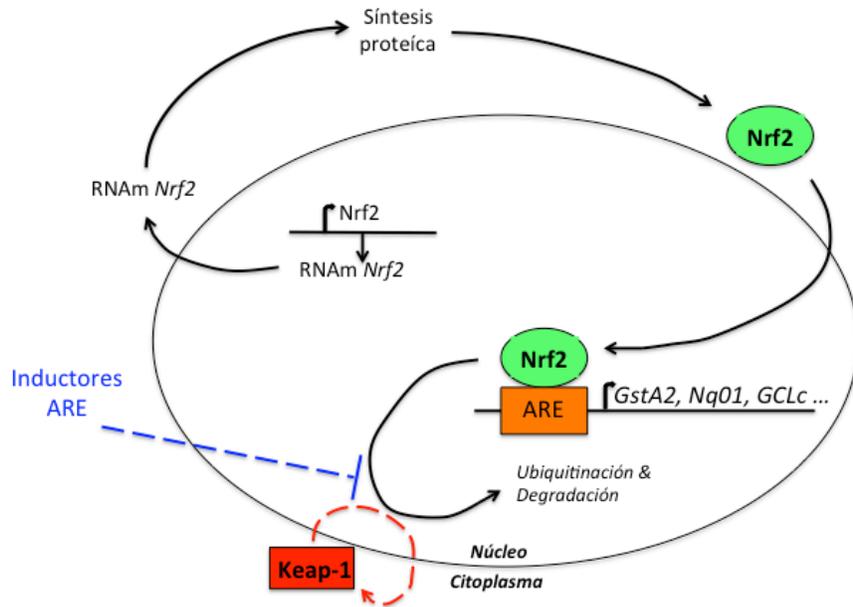


Figura 3. Vía de traslocación nuclear de Nrf2. La inducción de estrés oxidativo produce la oxidación de grupos SH de cisteínas de Keap1, generando así la disociación del complejo Keap1/Nrf2. Esto permite la entrada de Nrf2 al núcleo, su unión a secuencias ARE y la codificación de proteínas citoprotectoras como GCLc. Tomada desde Nguyen, T., Nioi P., Pickett C.B. J. Biol. Chem. 2009, 284:13291-13295.

Adicionalmente, modificaciones post transcripcionales, como fosforilación de serinas y treoninas por diversas quinasas, entre ellas PI3K, PKC, JNK y ERK, incrementarían la disociación de Nrf2 de su inhibidor Keap-1 y su posterior traslocación al núcleo (22).

En un modelo de trasplante hepático ortotópico en ratas que recibieron hígados sometidos a isquemia fría (20 horas a 4°C) se investigó la participación del complejo Keap-1/Nrf2 en el daño por IR hepática (29). Mediante la utilización de hígados donantes con hepatocitos específicos “knockout” para Keap-1, lograron demostrar una disminución del daño por IR post trasplante. Se logró una mejoría en la función hepatocelular y en la supervivencia de las ratas trasplantadas. La ablación de Keap-1 permitió reducir el tráfico de macrófagos y neutrófilos, citoquinas pro inflamatorias y necro-apoptosis hepatocelular. Además promovió funciones antiapoptóticas en hígados trasplantados; todo esto mediante un aumento en los niveles de Nrf2. Por el contrario, hígados donantes con deficiencia de Nrf2 (Nrf2^{-/-}) presentaron mayor daño por IR post trasplante. Esto indica que el complejo Keap-1/Nrf2 es el que previene el

daño por IR hepática en trasplante hepático ortotópico mediante señalización de Keap-1 que regula negativamente la vía Nrf2.

En este sentido, se ha descrito que ratas sometidas a protocolos de preconditionamiento hepático, como los ya descritos para T₃ y Fe (10,14-16,18), manifiestan incrementos transientes en la traslocación al núcleo del Nrf2 hepático, efectos que serían mediados por el estrés oxidativo transiente desarrollado por ambos protocolos preconditionantes (30,31).

Con estos antecedentes, resulta importante considerar la participación de la vía regulada por Nrf2 en el preconditionamiento hepático, inducido por la administración conjunta de Fe y T₃, frente a la IR. Para este propósito, se evaluará el efecto hepatoprotector de la administración conjunta de Fe y T₃ frente al daño inducido por la IR, utilizando un protocolo de tratamiento con un número reducido de dosis de Fe, seguido de la administración de una dosis reducida de T₃.

Estudios previos han indicado que la reducción de 6 a 2 dosis (50 mg/kg por dosis) de Fe genera EOX moderado sin efectos hepatoprotectores frente a la IR (32), efectos que también han sido observados con la administración de una dosis de T₃ de 0,05 mg/kg (12). El preconditionamiento hepático, inducido por Fe y T₃, será relacionado con (a) la normalización del EOX hepático y (b) cambios en la actividad de Nrf2 y expresión de glutamato-cisteína-ligasa c, como mecanismos mediadores de la hepatoprotección conferida por Fe y T₃.

Hipótesis

La administración conjunta de Fe y T₃ precondiciona al hígado de rata frente a la IR, asociado a la activación de Nrf2, lo que determina mayor expresión génica de glutamato-cisteína-ligasa c.

Objetivo General

Evaluar la respuesta hepatoprotectora frente a la IR en ratas pretratadas con Fe y T₃ asociado a cambios en la actividad de Nrf2 y expresión génica de glutamato-cisteína-ligasa c.

Objetivos Específicos:

1. Determinar el grado de protección conferido por Fe y T₃ frente al daño inducido por IR, mediante la medición de actividades séricas de transaminasas AST (aspartato transaminasa), ALT (alanina transaminasa) e histología hepática.
2. Evaluar la normalización del EOx hepático incrementado por la IR, mediante la relación entre el contenido total de proteínas oxidadas (grupos carbonilo)/ equivalentes totales de glutatión reducido (GSH) como índice de EOx hepático.
3. Evaluar la actividad de la vía regulada por Nrf2, mediante (a) cambios en contenidos citosólico y nuclear de Nrf2 hepático y de su inhibidor Keap-1 mediante técnica de western blot y (b) la expresión génica hepática de glutamato-cisteína-ligasa c mediante RT-qPCR.

Materiales y Métodos

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley (Bioterio Central, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) con pesos entre 150 y 180 g, mantenidas en ciclos de 12 horas alternados de luz/oscuridad, provistas de agua y alimento (Champion) ad libitum. Todos los procedimientos con los animales de experimentación cumplieron con la guía “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy of Sciences, NIH Publication 86-23, revised 1985)” y fueron aprobados por el Comité de Bioética (Facultad de Medicina, Universidad de Chile, CBA No. 0381, FMUCH).

Suplementación de Fe, T₃ e isquemia – reperfusión

La administración de Fe y T₃ se realizó en base a protocolos previos realizados en el Laboratorio de “Estrés oxidativo y hepatotoxicidad”, del programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile (20, 30).

Las ratas, agrupadas en 8 grupos experimentales (Figura 4), recibieron 2 dosis de Fe-dextrano (Fe⁺³) intraperitoneal (ip) (50mg/kg), en días alternos, y el grupo control recibió dosis isovolumétricas de suero fisiológico (vehículo del Fe-dextrano). El día 5 (72 horas posterior a la última dosis de Fe) los animales recibieron una dosis única de T₃ (0,05 mg/kg, ip) o cantidades isovolumétricas de NaOH 0,1N (vehículo de T₃). El día 7 (48 hrs post-dosis de T₃) los animales fueron anestesiados con 1 ml/kg i.p. de Zoletil 50 (clorhidrato de tiletamina 25mg/mL + clorhidrato de zolazepam 25mg/mL; Virbac, Carros, France) y luego sometidos a laparotomía media e isquemia hepática parcial, mediante la oclusión temporal del flujo sanguíneo a los lóbulos hepáticos medio e izquierdo, con un clip Schwartz (FST, Vancouver, BC, Canadá) durante 1 hora, seguido de 20 horas de reperfusión (15). Animales control fueron sometidos a anestesia y laparotomía media sin isquemia (cirugía sham), con lo cual se constituyó los siguientes 8 grupos experimentales (Figura 4): [a] salino-NaOH-

sham; [b] salino-NaOH-IR; [c] Fe-NaOH-sham; [d] Fe-NaOH-IR; [e] salino-T₃-sham; [f] salino-T₃-IR; [g] Fe-T₃-sham; [h] Fe-T₃-IR. Al término del período de reperfusión se obtuvo muestras de sangre, mediante punción cardíaca donde se evaluó las transaminasas séricas (ALT y AST) utilizando un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Se obtuvieron también muestras hepáticas (lóbulos isquemizados), las cuales fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C para posteriores ensayos de western blot (Nrf2 y Keap-1) y qPCR (glutamato-cisteína-ligasa-c) o fijadas en formalina a pH 7,0 para su posterior inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina (evaluación morfológica).

En grupos paralelos de animales se realizó una perfusión hepática in situ mediante una solución fría que contenía KCl 150 mM KCl y Tris 5 mM, pH 7,4, con el objetivo de remover la sangre. Las muestras hepáticas de estos animales (lóbulos isquemizados) se utilizaron para evaluar contenidos hepáticos de (a) equivalentes totales de glutatión reducido (GSH) y (b) proteínas oxidadas (POx).

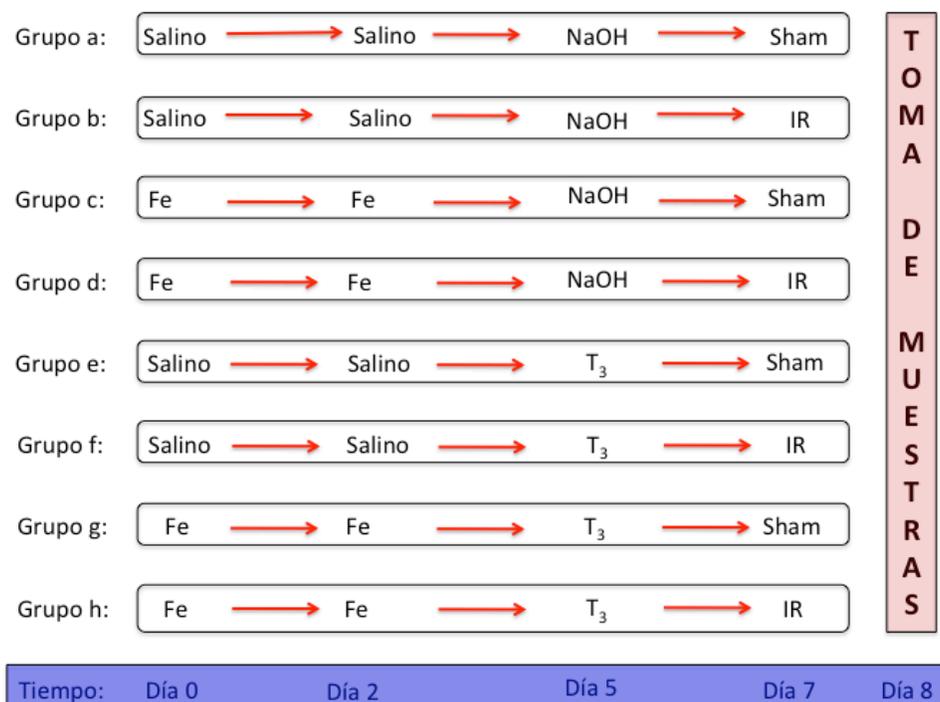


Figura 4. Esquema representativo de grupos experimentales y sus tratamientos en el tiempo. Fe: hierro. Salino: suero fisiológico (vehículo de Fe). T₃: L-3,3',5-triyodotironina. NaOH: Hidróxido de sodio (solvente de T₃). Sham: laparotomía media sin isquemia. IR: laparotomía media con isquemia hepática por una hora y reperfusión por 20 horas.

Determinación de parámetros de daño hepático (transaminasas e histologías)

Las transaminasas AST y ALT fueron medidas utilizando kits comerciales específicos (Wiener Lab, Rosario, Argentina) y expresadas en U/L. El fundamento del método se basa en las siguientes reacciones enzimáticas:

Aspartato amino transferasa: AST

AST

L-aspartato + α oxoglutarato -----> oxalacetato + L- glutamato

Malato Deshidrogenasa

Oxalacetato + NADH + H⁺ -----> L-malato + NAD⁺

Alanina amino transferasa: ALT

ALT

L-alanina + α oxoglutarato -----> piruvato + L- glutamato

Lactato Deshidrogenasa

Piruvato + NADH + H⁺ -----> L- lactato + NAD⁺

Muestras de suero, que con la enzima en estudio (AST o ALT), se adicionaron al medio de reacción (sustratos y enzimas del kit) y se cuantificó el consumo de NADH, a 340 nm y 37°C (disminución de la absorbancia (A)/min). La actividad de ambas enzimas se expresó como U/L de suero.

La evaluación histológica de cortes de hígado, incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina-eosina (4 a 5 muestras por grupo experimental), fue realizada por un patólogo que evaluó, en modalidad doble ciego, la histoarquitectura y la presencia de inflamación y necrosis (12).

Medición del contenido de equivalentes totales de glutatión reducido (GSH)

En homogeneizados desproteinizados de hígado se determinó GSH mediante la técnica autocatalítica de Tietze (33), en la cual se determinaron los equivalentes totales de GSH (GSH+GSSG) hepático utilizando la enzima glutatión reductasa dependiente de NADPH, la cual genera dos moles de glutatión reducido por cada mol de glutatión oxidado que la enzima reduce.

Glutatión Reductasa



La reacción posterior del GSH con DTNB (ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico) genera TNB, compuesto coloreado cuya formación se registró espectrofotométricamente por el aumento de A_{412} /minuto.



Para esta determinación, los hígados fueron perfundidos in situ, para remover la sangre, luego de lo cual se homogeneizaron (1:100) en HClO_4 0,5 N. El precipitado formado se decantó por centrifugación a 2000g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue neutralizado con K_3PO_4 1,75 M a pH 13. La cuantificación del GSH se efectuó en un medio que contiene un amortiguador fosfato de potasio 0,1 M, EDTA 1 mM pH 7, DTNB 0,08 mM, NADPH 0,24 mM y 0,11 U/mL de glutatión reductasa, preincubado durante 2 min a 30°C. A este medio se adicionaron 200 μL de sobrenadante neutralizado y luego se registró el aumento de A_{412} /min, que corresponde a la formación de TNB en celdas termorreguladas a 30°C. Los resultados fueron expresados en μmoles de GSH/g de hígado (equivalentes totales de GSH), utilizando una solución estándar de GSSG (10^{-2} mM).

Cuantificación de proteínas oxidadas (POX) mediante ensayo colorimétrico

La carbonilación de proteínas, producto de su oxidación (POX), fue medida mediante la formación de derivados hidrazónicos, producto de la interacción de carbonilos con 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH), los cuales se cuantificaron mediante espectrofotometría según la técnica descrita por Reznick y Packer (34). Muestras de 200-300 mg de hígados perfundidos in situ, fueron homogeneizadas en 1 a 2 mL de buffer frío (fosfato, pH 6,7 con EDTA 1mM e inhibidores de proteasas), seguido de centrifugación (10.000 g; 15 min, 4°C). Alícuotas de 200 µL de sobrenadante (muestra y control), previo control de ácidos nucleicos contaminantes (cambios de A entre 280 y 260 nm) fueron tratadas con 800 µL de DNPH (muestra) y 800 µL de HCl 2,5M (control), incubadas (1 hora en oscuridad, temperatura ambiente), y tratadas con ácido tricloroacético (TCA) al 20% p/v. Luego de incubación (5 min, sobre hielo) y centrifugación (10.000 g, 5 min, 4°C), se resuspendió el precipitado (1 mL TCA al 10%), se centrifugó (10.000 g, 5 min, 4°C) y se disolvió el sedimento en etanol/etilacetato (1:1), centrifugando (10.000 g, 5 min, 4°C) y lavando 2 veces. El sedimento final se suspendió en 500 µL de hidrocloreuro de guanidina (6M). Alícuotas de 220 µL de muestras y controles fueron ubicadas en pocillos (placa) para medir cambios en su absorbancia a 370nm utilizando un lector de placa (EPOCH).

Para cuantificar el contenido de proteínas de las muestras, se elaboró una curva de calibración con albúmina bovina, cuya pendiente fue $0,011 \mu\text{M}^{-1}$. El contenido de POx (nmoles carbonilos/mg proteínas) se calculó utilizando la absorbancia promedio de las muestras menos la absorbancia promedio de los controles (A corregida o AC), la pendiente de la curva de calibración, y el factor de dilución (500 µL/200 µL).

La fórmula aplicada fue:

$$\text{nmoles carbonilos/mg proteínas} = [(AC)/0,011 \mu\text{M}^{-1}](500 \mu\text{L}/200 \mu\text{L})$$

Expresión génica de glutamato cisteína ligasa c mediante RTqPCR

Para evaluar la expresión génica de glutamato cisteína ligasa c (GCLc) mediante PCR cuantitativo a tiempo real (RTqPCR), se aisló RNA total desde 30 mg de hígado congelado, utilizando mini kit RNeasy® Lipid Tissue (QUIAGEN Sciences, Maryland, USA) según indicaciones del fabricante. Para cuantificar el RNA total se midió el cociente de A 260nm/280 nm (espectrofotometría). La integridad del RNA fue determinada por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% teñidos con bromuro de etidio. El RNA resultante (libre de DNA) fue transcrito de forma reversa a DNAc utilizando transcriptasa reversa ThermoScript RT-PCR System (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El qRT PCR se evaluó con un termociclador Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, California, USA) utilizando el master mix Brilliant II SYBR Green QPCR (Agilent Technologies, California, USA) siguiendo los protocolos del fabricante. Los partidores, optimizados para alcanzar eficiencia de 92 a 100%, tuvieron las siguientes secuencias (5'→3'):

<u>ARNm</u>	<u>Partidor sentido</u>	<u>Partidor antisentido</u>
Rat β -actin	agc cat gta cgt agc cat cc	ctc tca gct gtg gtg gtg aa
Rat RPS23	gta ggg gtt gaa gcc aaa ca	cac ctt aaa gcg gac tcc ag
Rat GCLc	ggg aag gaa ggc gtg ttt cct	gtc gac ttc cat gtt ttc aag gt

Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa para verificar la longitud correcta de amplificación. El análisis de curvas de disociación demostró la formación de un producto único de PCR en cada reacción. El nivel de expresión de cada muestra fue normalizado contra Rps23 y β -actina para cada rata utilizada (control interno). La expresión relativa fue calculada utilizando el método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$) y los valores fueron normalizados respecto a Rps23 y β -actina (datos no mostrados) como un control génico interno.

Cambios en contenidos citosólicos y nucleares de Nrf2 y Keap 1

En extractos de proteínas citosólicas y nucleares, obtenidos mediante un kit comercial, con inhibidores de proteasas (Nuclear Extraction Kit N° 10009277, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EEUU), se evaluó contenidos de Nrf2 y Keap-1, citosólico y nuclear, mediante western blot, utilizando 50 µg y 35 µg, de extractos de proteínas citosólicas y nucleares, respectivamente. Dichas muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12% mediante SDS-PAGE (35), utilizando marcadores de peso molecular en el intervalo de 20 a 118 kDa en todos los casos. Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa, cuya presencia fue evidenciada mediante tinción con rojo Ponceau antes de la inmunotransferencia. Las membranas fueron bloqueadas (1 hora a temperatura ambiente) con solución tampón Tris (TBS) que contenía 5% de albúmina bovina sérica (ABS) (36). La transferencia a las membranas se realizó a 75 mA por toda la noche. Las membranas fueron lavadas con TBS el cual contenía 0,1% Tween 20 e hibridadas con anticuerpos policlonales de conejo para Nrf2 (Cell Signalling Technology Inc., MA, EEUU) y para Keap-1 (Cell Signalling Technology Inc., MA, EEUU). Como control de carga se utilizó β -actina para proteínas citosólicas (ICN Biomedicals, INC., Aurora, OH) y lámina A/C para proteínas nucleares (BD Transduction Laboratories, San José, CA) y anticuerpos monoclonales de conejo específicos para cada proteína. Luego de un periodo de lavado previamente estandarizado, los complejos antígeno anticuerpo fueron detectados mediante peroxidasa anti-IgG de cabra o anti-IgG de conejo. Los complejos fueron detectados con un kit de detección (Pierce, Rockford, IL)(12). Los contenidos citosólicos y nucleares de las proteínas estudiadas se presentan como unidades relativas (proteína nuclear/proteína citosólica) y sus efectos netos (IR – Sham).

Análisis Estadístico

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó valores previos de actividades de AST y ALT, obtenidos en nuestro laboratorio para el precondicionamiento hepático frente a la IR con dosis y/o períodos de tratamiento reducidos con T₃ (12) y Fe (32). Al comparar los resultados de ambas intervenciones por separado (Fe y T₃) se observó que a las dosis utilizadas, el efecto protector conferido fue menor con Fe que con T₃. Por lo tanto, se consideró correcto utilizar estos valores para realizar el cálculo del tamaño muestral ya que asumimos que el tratamiento conjunto (Fe y T₃) potenciaría el efecto hepatoprotector. Suponiendo un límite α de 0,05, un poder de 80% (1- β) y un valor del efecto f de 0,84 (programa estadístico G*Power 3.1) se estimó un tamaño muestral total de 24 animales, por lo que se incluyó 3-5 animales por grupo.

Todos los resultados se expresaron como promedios \pm error estándar de la media (SEM) para 3-5 animales por grupo. La significancia estadística de las diferencias entre los valores promedios de los diferentes grupos experimentales fue determinada por ANOVA unifactorial seguido del post-test de Newman-Keuls (GraphPad Prism versión 2.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Protección hepatocelular frente a la IR

I. Transaminasas Séricas

Los resultados de la determinación de las actividades séricas de las transaminasas ALT y AST se muestran en la Figura 5A. Se observa que en el grupo no preacondicionado (grupo b) la IR gatilla daño hepático, como lo indican los incrementos en AST (3,5 veces) y ALT (3,4 veces), en relación a sus controles sham (grupo a). Los valores de ambas transaminasas en los grupos tratados de manera independiente con Fe (grupo d) o T₃ (grupo f) fueron significativamente mayores que los de sus controles (grupos c y e, respectivamente). En cambio, el pretratamiento con Fe seguido de la administración de T₃ (grupo h) determinó valores de ALT y AST similares al grupo control (grupo g). Esto conlleva a disminuciones netas significativas en este grupo, respecto a controles Fe y T₃ (Figura 5B).

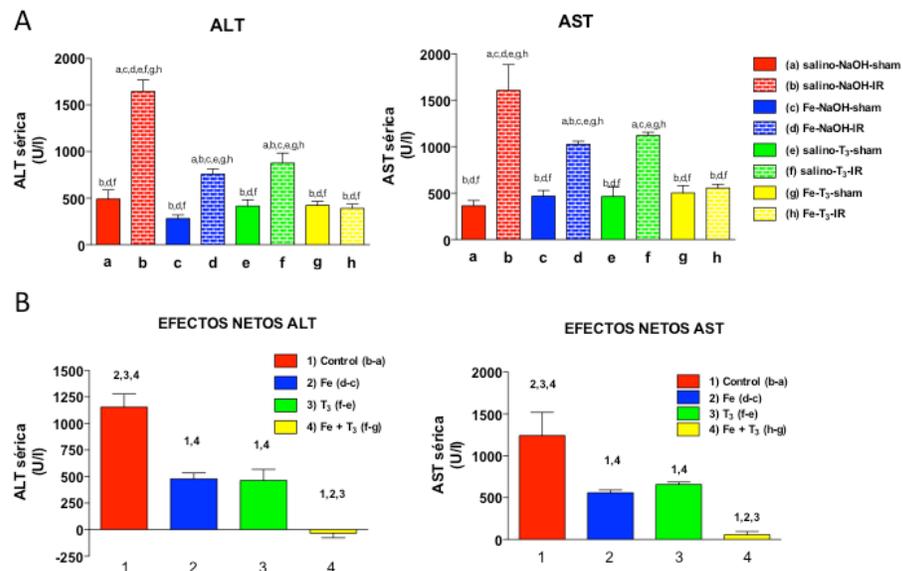


Figura 5. (A) Cambios en los niveles séricos de transaminasas ALT y AST en ratas (promedio \pm SEM, 4 a 5 por grupo) sometidas a IR (1 hora de isquemia/20 horas de reperusión) o sham (laparotomía media sin isquemia) con o sin preacondicionamiento (Fe, T₃, Fe + T₃). **(B)** Efectos netos inducidos por la IR en condiciones control (1, sin preacondicionamiento), administración de Fe (2), T₃ (3), o Fe + T₃ (4), calculado como se describe en la figura. Significancia estadística evaluada por Anova unifactorial y test de Newman-Keuls ($P < 0,05$). Diferencias estadísticamente significativas entre grupos se indican con letras (transaminasas) y números (efectos netos) sobre las barras.

II. Evaluación Histología Hepática

La evaluación histológica (Figura 6) de las muestras hepáticas de los grupos control-sham, Fe-sham, T₃-sham y Fe-T₃-sham (figuras 6A, 6C, 6E y 6G, respectivamente) indica morfología hepática normal con histoarquitectura conservada, sin presencia de necrosis. En cambio, en muestras de animales sometidos a IR (Figuras 6B, 6D y 6F) destaca la presencia de histoarquitectura distorsionada con necrosis extensa. Junto a ello, se observan incrementos significativos en el grado de inflamación (Figura 7A) y necrosis (Figura 7B). Por el contrario, muestras hepáticas del grupo preacondicionado con Fe y T₃ (Figura 6H) presentan histoarquitectura conservada, sin presencia de necrosis, junto a un puntaje de inflamación y necrosis similar al del grupo control (Figura 7A y 7B).

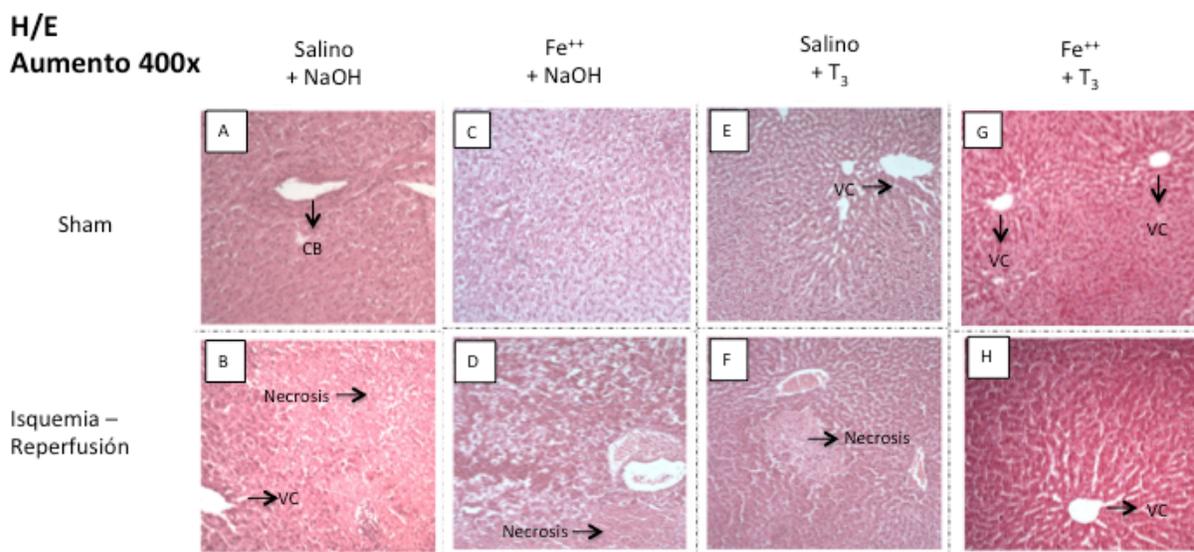


Figura 6. Microscopías representativas de cortes de hígado de ratas control y preacondicionadas con Fe (2 dosis de 50 mg/kg), T₃ (1 dosis de 0,05 mg/kg) o Fe + T₃ sometidas a IR (1 hora de isquemia/ 20 reperusión) o sham (laparotomía media sin isquemia), de un total de 3-6 ratas por grupo. Los cortes fueron fijados en formaldehído y teñidos con hematoxilina eosina. Cada letra indica la microfotografía correspondiente al grupo experimental respectivo (aumento 400x). CB: Conducto biliar. VC: Vena central.

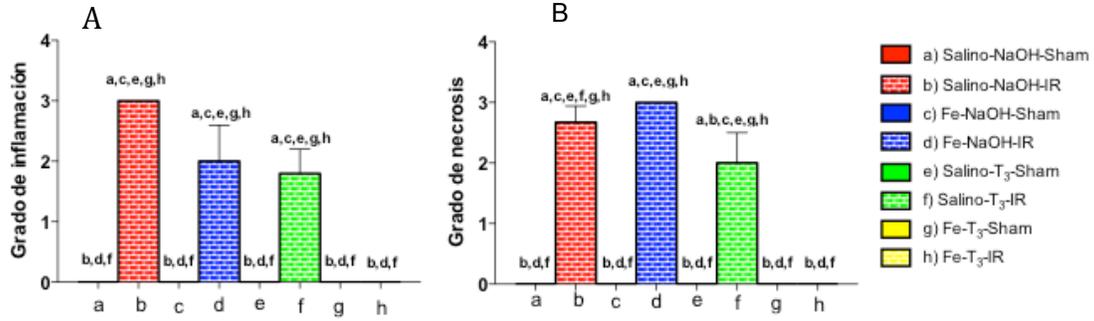


Figura 7. Cuantificación del grado de inflamación (A) y necrosis (B) observado en histologías hepáticas (promedio \pm SEM; 4 a 5 animales por grupo). Los análisis se hicieron acorde al score de *Korourian & Cols (Toxicol Sci 1999;47:110–117)*. La puntuación consideró 0 (grado mínimo) y 4 (grado máximo). Significancia estadística evaluada por Anova unifactorial y test de Newman-Keuls. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre grupos se indican con letras sobre las barras.

La figura 8 muestra los valores de las transaminasas que se correlacionan directa y significativamente con los de inflamación (Figura 8A) y necrosis (Figura 8B).

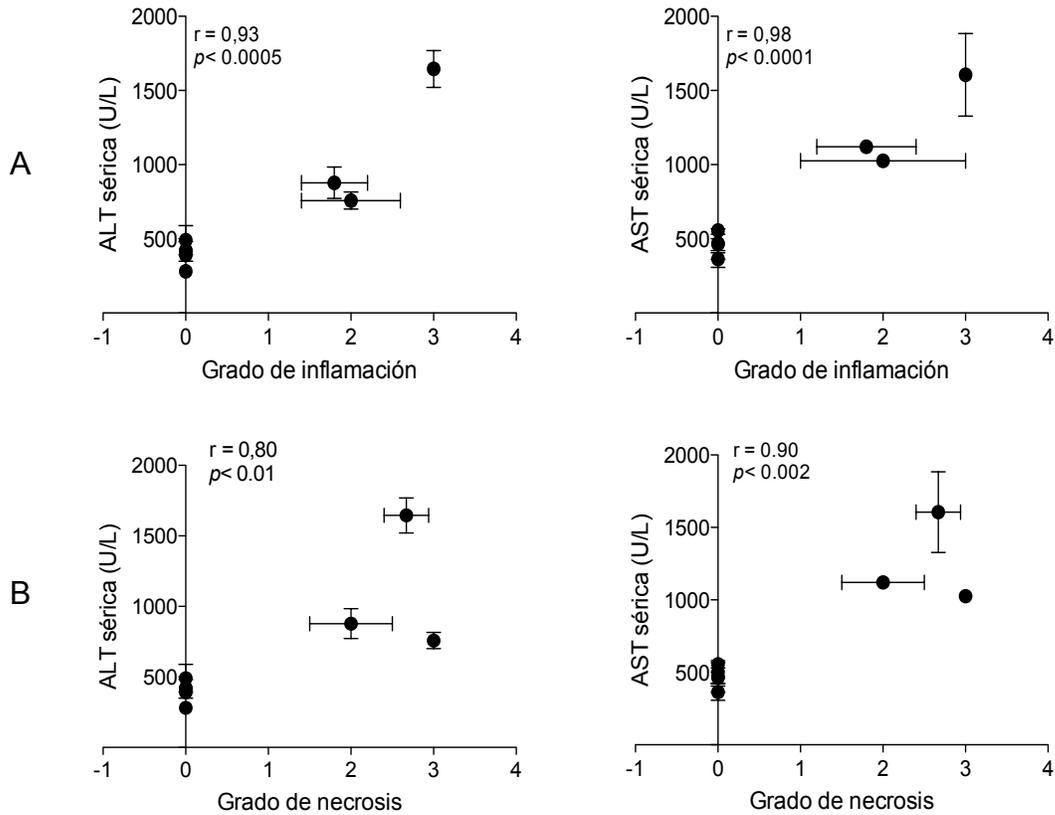


Figura 8. Correlación entre grado de inflamación y necrosis versus niveles séricos de transaminasas. Correlación de Spearman (r). $P < 0,05$ estadísticamente significativo.

Evaluación del EOX hepático

1. Evaluación POX/GSH

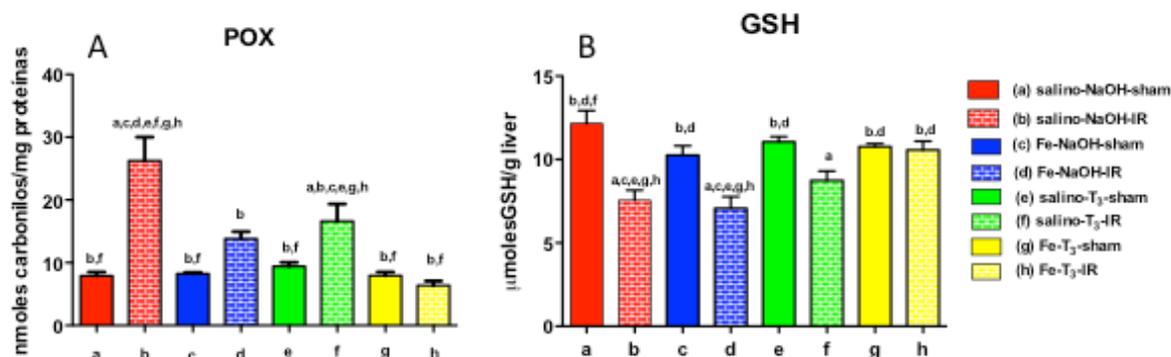


Figura 9. Cambios en el contenido total de proteínas oxidadas (POX) (A) y de equivalentes totales de glutatión reducido (GSH)(B) en ratas (promedio \pm SEM; 4 a 5 por grupo) sometidas a IR (1 hora de isquemia/20 horas de reperusión) o sham (laparotomía media sin isquemia) con o sin preacondicionamiento (Fe, T₃, Fe + T₃). Significancia estadística evaluada por Anova unifactorial y test de Newman-Keuls ($P < 0,05$). Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre grupos se indican con letras sobre las barras.

Las figuras 9 y 10 muestran que en los animales no preacondicionados (grupo b), la IR gatilla estrés oxidativo drástico, con incrementos en el contenido de POX (230% de aumento, figura 9A) y disminución de GSH (40% de reducción, figura 9B). Esto determina un incremento significativo en la relación POX/GSH (380% de aumento, figura 10), en relación a los controles sham (grupo a). En los grupos tratados de manera independiente con Fe (grupo d) o T₃ (grupo f), los valores de POX fueron significativamente mayores que los de sus controles (grupos c y e, respectivamente). En cambio, en estos mismos grupos (d y f) los valores de GSH fueron significativamente menores respecto a sus controles (grupos c y e, respectivamente). El pretratamiento con Fe seguido de la administración de T₃ (grupo h) determinó la normalización del estado redox hepático, representado por valores de POX, GSH y relación POX/GSH (figuras 9A, 9B y 10, respectivamente) similares a los de su grupo control (grupo g).

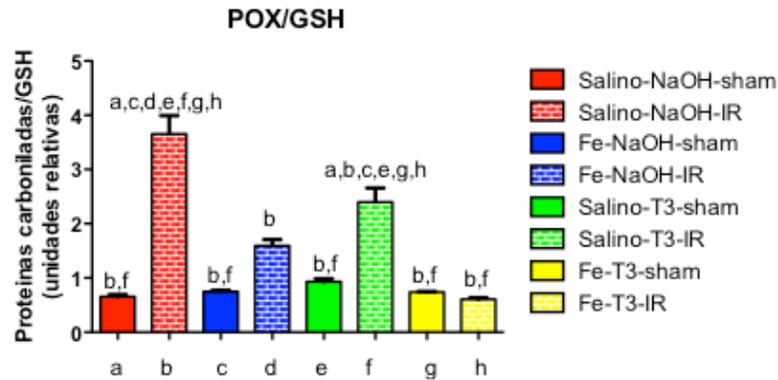


Figura 10. Cambios en la relación POX/GSH (promedio \pm SEM; 4-5 ratas por grupo) en animales sometidos a IR (1 hora de isquemia/20 horas de reperfusión) o sham (laparotomía media sin isquemia) con o sin preconditionamiento (Fe, T₃, Fe + T₃). Significancia estadística evaluada por Anova unifactorial y test de Newman-Keuls (P<0,05). Diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre grupos se indican con letras sobre las barras.

Evaluación de la vía Nrf2 y expresión génica de GCLc

I. *Western blot para Nrf2/Keap-1*

Los cambios en las relaciones entre los contenidos nuclear/citosólico de Nrf2 y de su inhibidor Keap-1 se observan en la Figura 11. Es importante destacar que en el grupo preconditionado con Fe y T₃ (grupo h) la IR incrementó significativamente el contenido nuclear de Nrf2. El efecto neto significativo de la IR en este grupo experimental (Figura 11C) señala el ingreso de Nrf2 desde el citoplasma al núcleo y por tanto su activación. Respecto a cambios en contenidos nuclear/citosólico del inhibidor Keap-1, no se observan cambios significativos gatillados por la IR.

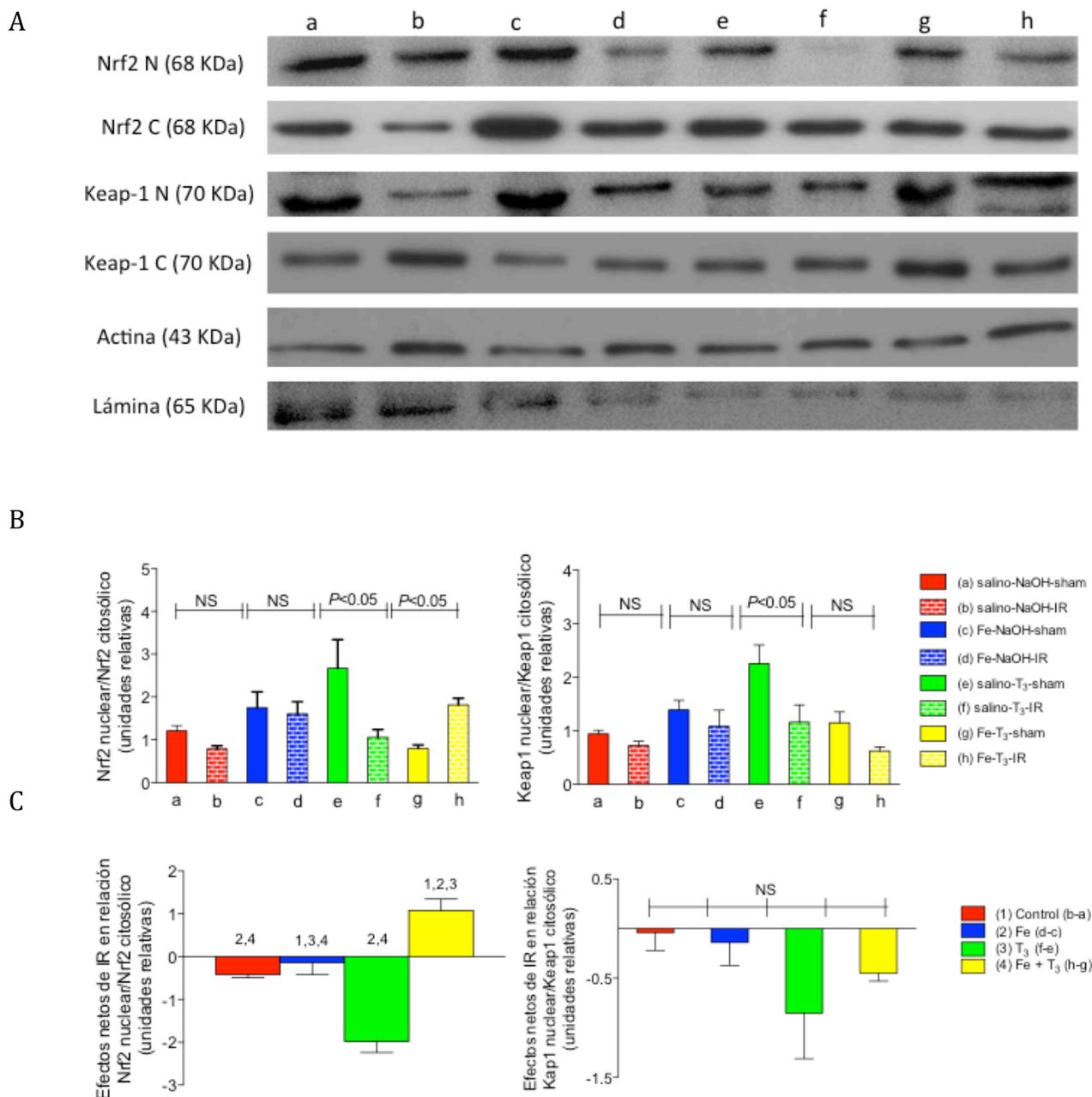


Figura 11. Cambios en los contenidos citosólico y nuclear de Nrf2 y Keap1 en ratas (4 a 5 por grupo) sometidas a IR (1 hora de isquemia/20 horas de reperusión) o sham (laparotomía media sin isquemia) con o sin preacondicionamiento (Fe, T₃, Fe + T₃). (A) Niveles (promedios \pm SEM) de Nrf2 nuclear y citosólico (68 kDa), niveles de Keap1 nuclear y citosólico (70 kDa), β -actina (43 kDa), y lámina A/C (65 kDa). (B) Relaciones Nrf2 nuclear/citosólico y Keap1 nuclear/citosólico. (C) Efectos netos de la IR sobre las relaciones Nrf2 nuclear/citosólico y Keap1 nuclear/citosólico. Significancia estadística evaluada por Anova unifactorial y test de Newman-Keuls ($P < 0,05$). Diferencias estadísticamente significativas entre grupos se indican sobre las barras.

En concordancia con el aumento de Nrf2 nuclear, gatillado por la IR en el grupo preacondicionado con Fe y T₃, los niveles de mRNA de glutamato cisteína ligasa c (GCLc) también fueron incrementados significativamente (figura 12A). En el resto de los grupos no se observó este cambio. Consecuentemente, se obtuvo un efecto neto positivo y significativo de la IR (figura 12B); lo que señala que ésta gatilla una mayor expresión de GCLc al ser expuesta al pretratamiento con Fe y T₃.

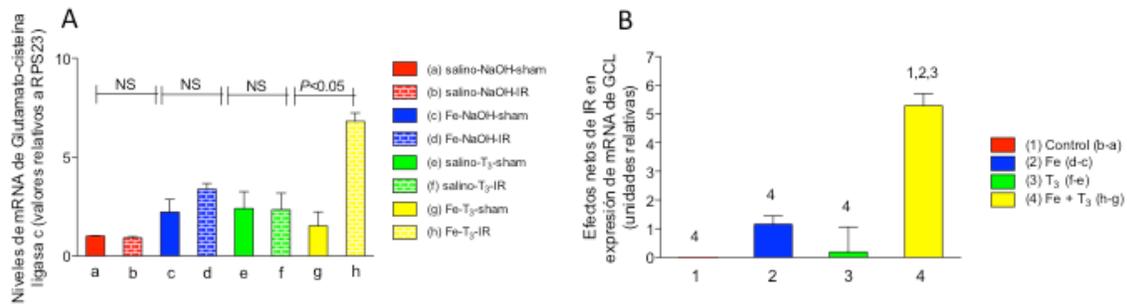


Figura 12. Cambios en la expresión génica de GCLc cuantificada mediante técnica de qPCR (promedio \pm SEM en ratas (4 a 5 por grupo) sometidas a IR (1 hora de isquemia/20 horas de reperusión) o sham (laparotomía media sin isquemia) con o sin preacondicionamiento (Fe, T₃, Fe + T₃). (A) Niveles de mRNA de GCLc (valores relativos a RPS23). (B) Efectos netos de la IR sobre niveles de GCLc. Significancia estadística evaluada por Anova unifactorial y test de Newman-Keuls ($P < 0,05$). Diferencias estadísticamente significativas entre grupos se indican sobre las barras.

Estos resultados muestran que la relación de los contenidos netos nuclear/citosólico de Nrf2 se correlaciona directa y significativamente con los niveles netos de mRNA de GCLc (Figura 13).

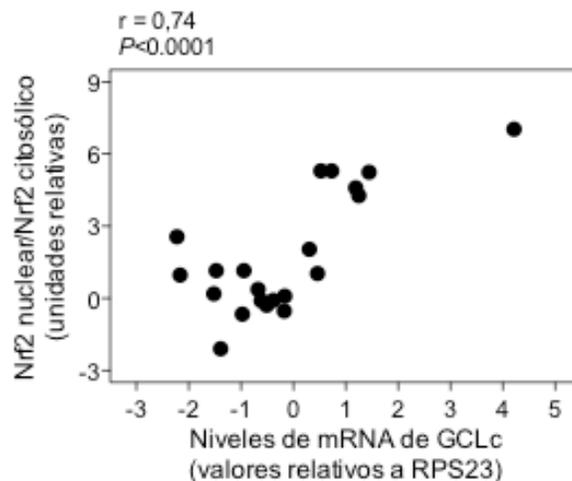


Figura 13. Correlación entre niveles (valores netos) nucleares/citosólicos de Nrf2 y los niveles (valores netos) de mRNA de GCLc. Correlación de Pearson (r). $P < 0,05$ estadísticamente significativo.

Discusión

Daño por IR

El fenómeno de IR hepática es inherente a la práctica clínica actual. Se puede observar en resecciones hepáticas, trasplantes o trauma hepático e involucra muerte del hepatocito y del endotelio (12). El protocolo de IR utilizado en este estudio (1 hora de isquemia/20 horas de reperfusión) indujo cambios significativos en los parámetros de daño demostrado por el alza significativa observada en los niveles de transaminasas séricas, asociada a la evaluación histológica con presencia de inflamación y necrosis. Similar a lo observado en otros estudios (12,15,20,32), una hora de isquemia, seguida de 20 horas de reperfusión es un evento que genera lesión y destrucción tisular hepática, con liberación de transaminasas y alteración de la histoarquitectura hepática. La asociación significativa observada entre las transaminasas y el grado de inflamación y necrosis apoya el hecho que la IR es un evento dañino y determinante de la viabilidad celular hepática.

Prevención de daño por IR mediante EOx moderado

Se han desarrollado diversas estrategias para intentar disminuir el daño inducido por la IR, entre ellas el preacondicionamiento isquémico. Si bien este protocolo ha resultado de utilidad en resecciones y trasplantes hepáticos, esta maniobra es considerada controversial en la clínica y trasplantes humanos (37-40).

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la administración de una dosis de 0,1mg/kg de T₃ (15) o 6 dosis en días alternados de 50mg/kg de Fe (20), protegen significativamente al hígado, frente a un protocolo posterior de IR en el mismo órgano. Ambas estrategias de preacondicionamiento gatillan estrés oxidativo moderado, condición que tiene un papel causal en la protección conferida en ambos casos (21,41). A nivel hepático, la inducción de EOx moderado y transiente es considerado un estímulo hormético que genera preacondicionamiento contra IR en varios modelos experimentales (14). En este sentido nuestro grupo ha demostrado que tanto la reducción de la dosis de T₃ (0,05mg/kg) como la disminución del número

de dosis de Fe (2 dosis de 50mg/kg), gatillan estrés oxidativo transiente pero no conllevan a hepatoprotección frente a un protocolo posterior de IR (12,32). Esta diferencia se debe probablemente a que las dosis reducidas de ambas estrategias precondicionantes producen estrés oxidativo moderado, sin alcanzar a desencadenar los mecanismos que conllevan a hepatoprotección. En el caso de las dosis reducidas de T₃ (0,05 mg/kg), se ha demostrado (12) el aumento de la relación POX/GSH consecuente con la producción de EOX moderado. Sin embargo, no existe activación de NF-κB ni aumentos en la expresión proteica y del mRNA de la Haptoglobina, proteína de fase aguda en el tejido hepático (12). La dosis reducida de Fe (2 dosis de 50 mg/kg) produce, por si sola, una disminución transiente del contenido de GSH hepático que se recupera tras 72 horas (32), sin producir normalización de la transaminasa AST tras un ciclo de IR (1 hora isquemia, 20 horas de reperfusión) ni de la histología hepática.

La disminución del GSH observada en los grupos sometidos a IR se debe a su oxidación secundaria a la producción de EROS y ERNS. Una vez producido el GSSG, éste puede ser eliminado por vía biliar siempre y cuando no sea recuperado por la glutatión reductasa mediante consumo de NADPH. Esta pérdida de GSH, se traduce en una disminución del glutatión total (GSH+GSSG), la cual se cuantifica mediante la técnica descrita por Tietze (33).

Hepatoprotección conferida por protocolo combinado Fe y T₃

Considerando que las dosis exclusivas de Fe y de T₃ utilizadas en nuestros estudios podrían generar efectos colaterales no adecuados para su aplicación clínica, en esta tesis se evaluó el efecto precondicionante otorgado por un protocolo combinado de Fe y T₃. El estudio evidenció una protección significativa frente al protocolo combinado de Fe y T₃. Esto lo señalan la normalización de transaminasas séricas e histoarquitectura hepática, la ausencia de inflamación o necrosis, junto con la reducción del estrés oxidativo hepático drástico, gatillado por la IR.

Actividad de la vía citoprotectora Nrf2 – GCLc

Para estudiar los mecanismos de protección involucrados en el preacondicionamiento hepático inducido por el protocolo Fe y T₃ combinado, se evaluó la actividad de la vía citoprotectora regulada por Nrf2, junto con la expresión de GCLc. Estudios previos de nuestro laboratorio han indicado que protocolos de preacondicionamiento hepático gatillados tanto por T₃ (10) como por Fe (31) incrementan el ingreso al núcleo de Nrf2, efecto que representa la activación de este factor de transcripción. Para que esto ocurra, es necesario que Nrf2 se libere, mediante oxidación de grupos SH de cisteínas por las EROS generadas, de su inhibidor Keap-1 (22). En condiciones normales, Keap-1 se encuentra como homodímero y se une a Nrf2 en relación 2:1, permitiendo su ubiquitinización y degradación por vía del proteosoma (22).

En esta tesis, no se observaron cambios significativos en Keap-1 en relación a la IR entre los diversos grupos (efectos netos). Tal como se observó en los estudios de western blot, Keap-1 puede migrar en los geles formando dos bandas, lo cual podría deberse a la oxidación de sus residuos de cisteínas por el con formación de enlaces disulfuro y cambios conformacionales de la proteína (25-27).

Los estudios realizados en esta tesis muestran que el preacondicionamiento hepático inducido por Fe y T₃ frente a la IR, se acompaña de un aumento en la relación Nrf2 nuclear/Nrf2 citosólico indicativa de su activación (30). En concordancia, el preacondicionamiento con Fe y T₃ incrementa la expresión de glutamato cisteína ligasa-c (GCLc) dependiente de Nrf2, enzima antioxidante que ejerce significativa hepatoprotección, al aumentar la síntesis y recuperación del GSH celular (42). Considerando que tanto Fe como T₃, en las dosis utilizadas en este estudio, gatillan estrés oxidativo hepático transiente, la administración conjunta de ambos podría ejercer potenciación que condicionaría la hepatoprotección observada en el tratamiento conjunto. Este efecto sería mediado por la condición pro-oxidante inducida, la cual tendría un papel central en la activación de la traslocación al núcleo de Nrf-2, permitiendo así la expresión de proteínas con potencial antioxidante como GCLc, enzima limitante en la síntesis de GSH.

El aumento de esta enzima, permitiría incrementar el contenido de GSH disponible como defensa antioxidante hepática. De forma similar, otras enzimas hepatoprotectoras que son reguladas por Nrf2, tales como hemo oxigenasa-1, superóxido dismutasa 1, peroxirredoxina y tioredoxina reductasa (8), podrían contribuir a la normalización de la respuesta inflamatoria observada en este estudio, incrementando la citoprotección y la resistencia hepática frente a la IR. Por lo tanto, la activación de Nrf2 podría ser un factor gatillante para la inducción de diversos mecanismos antioxidantes y hepatoprotectores que merecen ser evaluados en estudios futuros.

Potencial uso clínico

Es importante señalar que la utilización clínica de Fe en dosis repetidas de 100-125 mg/kg (im o ev), 1-3 veces por semana, durante 4 a 12 semanas, tiene una buena tolerancia en humanos con anemia (43,44). Por lo tanto, las dosis de Fe utilizadas en este protocolo podrían constituir una estrategia de preconditionamiento segura y adecuada con relevancia clínica.

Con relación al uso clínico de T₃ hay evidencias contradictorias al respecto. Si bien se ha sugerido que esta hormona podría modificar la función cardíaca post-isquémica (45); su uso en clínica humana no tiene un apoyo adecuado (46) debido a sus posibles efectos adversos sobre el metabolismo y actividad cardíacos.

Los resultados de este estudio indican que el uso de Fe y T₃ en dosis reducidas, respecto a protocolos hepatoprotectores previamente descritos (15,20), previenen el daño inducido por la IR. Esto constituye una estrategia de preconditionamiento no invasiva, con potencial uso clínico, ya que efectos adversos de T₃ a nivel cardíaco, o la posible citotoxicidad inducida por Fe, pueden ser atenuados al combinar los efectos hepatoprotectores de ambos.

Conclusión

La hepatoprotección observada al combinar Fe y T₃ puede deberse a la potenciación del estrés oxidativo moderado, inducido por ambas estrategias de forma independiente. Esto permitiría alcanzar un nivel adecuado para la activación de Nrf2 y aumentar la expresión de GCLc. Estudios futuros son necesarios para la profundización de otros mecanismos involucrados y su potencial aplicación clínica.

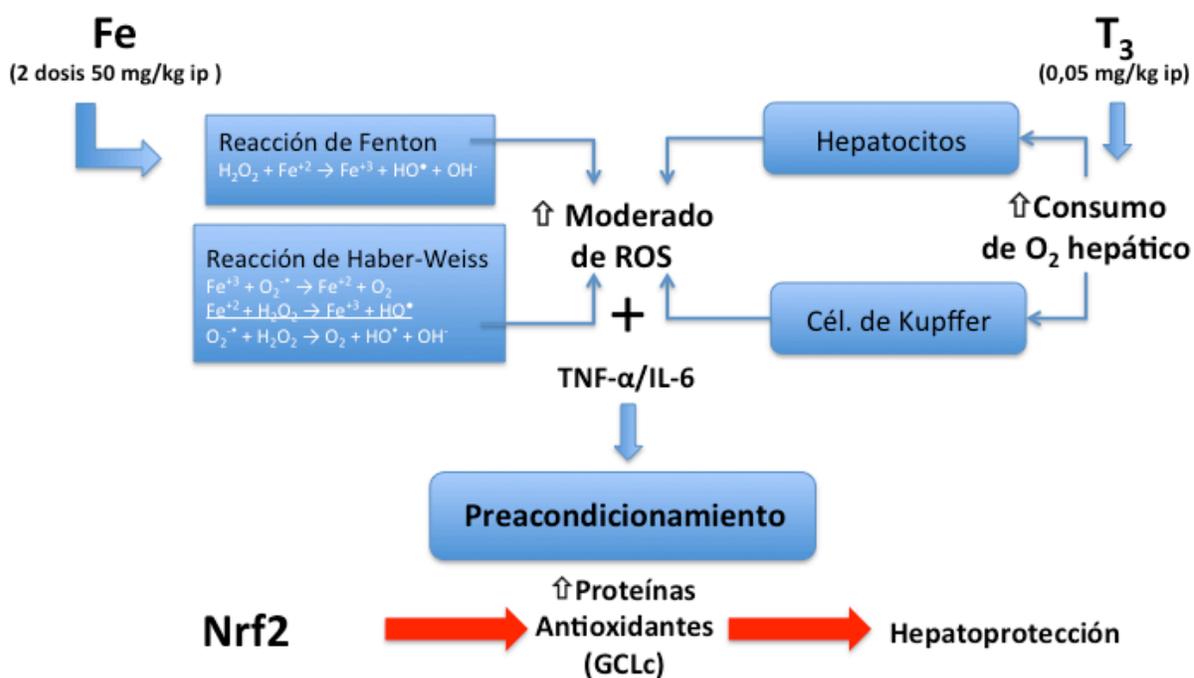


Figura 14. Figura que resume posible mecanismo de hepatoprotección producido por la combinación de Fe y T₃. La administración de dosis reducidas de Fe (2 dosis de 50mg/Kg ip) asociado a una dosis reducida de T₃, producen estrés oxidativo moderado. Esto produce la activación de Nrf2 asociado al aumento de proteínas antioxidantes (GCLc) permitiendo la hepatoprotección.

Bibliografía

1. Sies, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl.* 25: 1058-1071, 1986.
2. Drögue, W. Free Radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82: 47-95, 2002.
3. McCord, J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 312:159-163, 1985.
4. Ramírez, P; Marín, J.M.; Piñeiro, A.; Chávez-Cartaya, R.; Parrilla, P. Investigación experimental aplicada a la clínica: isquemia reperfusión hepática. *Cir Esp.* 67: 281-291, 2000.
5. Peralta, C.; Jiménez-Castro, M.; Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: Effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol.* 59: 1094–1106, 2013.
6. Serracino-Inglott, F.; Habib, N.A.; Mathie, R.T. Hepatic ischemia-reperfusion injury, *Am J Surg.* 181: 160-166, 2001.
7. Malhi, H.; Gores, G.J.; Lemasters, J.J. Apoptosis and Necrosis in the Liver: A Tale of Two Deaths? *Hepatology.* 43: S31-S44, 2006.
8. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present Concepts. *J Gastroenterol Hepatol.* 26 (Suppl. 1): 173-179, 2011.
9. Jaeschke, H.; Woolbright, B.L. *Transplantation Reviews.* 26: 103–114, 2012.
10. Videla, L.A. Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanisms. *World J Hepatol.* 1: 72-78, 2009.
11. Yellon, D.M.; Dana, A. The preconditioning phenomenon: A tool for the scientist or clinical reality? *Cir Res.* 87: 543-550, 2000.
12. Mardones, M.; Valenzuela, R.; Romanque, P.; Covarrubias, N.; Anghileri, F.; Fernández, V.; Videla, L.A.; Tapia, G. Prevention of liver ischemia reperfusion injury by a combined thyroid hormone and fish oil protocol. *J Nutr Biochem.* 23: 1113-1120, 2012.
13. Calabrese, E.J. Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes-Dodson law are manifestations of hormesis. *Ageing Res Rev.* 7: 8-20, 2008.

14. Videla, L.A. Hormetic responses of thyroid hormone calorigenesis in the liver: association with oxidative stress. *IUBMB Life*. 62: 460-466, 2010.
15. Fernández, V.; Castillo, I.; Tapia, G.; Romanque, P.; Uribe-Echavarría, S.; Uribe, M.; Cartier-Ugarte, D.; Santander, G.; Vial, M.T.; Videla, L.A. Thyroid hormone preconditioning: protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat. *Hepatology*. 45: 170-177, 2007.
16. Aust, S.D.; Morehouse, L.A.; Thomas, C.E. Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Radic Biol Med*. 1: 3–15, 1985.
17. Bacon, B.R.; Britton, R.S. The pathology of hepatic iron overload: a free radical mediated process? *Hepatology*. 11: 127–137, 1990.
18. Puntarulo, S. Iron, oxidative stress and human health. *Mol Asp Med*. 26: 299-312, 2005.
19. Galaris, D.; Pantopoulos, K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 45: 1-23, 2008.
20. Galleano, M.; Tapia, G.; Puntarulo, S.; Varela, P.; Videla, L.A.; Fernández, V. Liver preconditioning induced by iron in a rat model of ischemia/reperfusion. *Life Sci*. 89: 221-228, 2011.
21. Fernández, V.; Vargas, R.; Castillo, V.; Cádiz, N.; Bastías, D.; Román, S.; Tapia, G.; Videla, L.A. Reestablishment of Ischemia-Reperfusion Liver Injury by N-Acetylcysteine Administration prior to a Preconditioning Iron Protocol. *Scientific World Journal Volume*. Article ID 607285, doi:10.1155/2013/607285. 2013.
22. Königsberg, M. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista Educación Bioquímica*. 26: 18-25, 2007.
23. Kobayashi, M.; Yamamoto, M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Reg*. 46: 113-140, 2006.
24. Shenvi, S.V.; Smith, E.J.; Hagen TM. Transcriptional regulation of rat γ -glutamate cysteine ligase catalytic subunit gene is mediated through a distal antioxidant response element. *Pharmacol Res*. 60: 229–236, 2009.
25. Zhang, D. Mechanistic Studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev*. 38: 769-789, 2006.

26. Kobayashi, A.; Kang, M.; Watai, Y.; Tong, K.I.; Shibata, T.; Uchida, K.; Yamamoto, M. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol.* 26: 221-229, 2006.
27. Kensler, T.W.; Wakabayashi, N.; Biswal, S. Cell survival responses to environmental stresses via de Keap 1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47: 89-116, 2007.
28. Aleksunes, L.M.; Manautou, J.E. Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol.* 35: 459-473, 2007.
29. Bibo, Ke.; Xiu-Da, Shen; Yu, Zhang; Haofeng, Ji; Feng, Gao; Shi, Yue; Naoko, Kamo; Yuan, Zhai; Masayuki, Yamamoto; Ronald W. Busuttil; Jerzy W. Kupiec-Weglinski. KEAP1-NRF2 complex in ischemia-induced hepatocellular damage of mouse liver transplants. *J Hepatol.* 59: 1200–1207, 2013.
30. Romanque, P.; Cornejo, P.; Valdés, S.; Videla, L.A. Thyroid hormone administration induces rat liver Nrf2 activation: Suppression by N-Acetylcysteine pretreatment. *Thyroid.* 21: 655-662, 2011.
31. Morales P, Vargas R, Videla LA, Fernández V. Nrf2 activation in the liver of rats subjected to a preconditioning sub-chronic iron protocol. *Food Funct* 2014; 5: 243 – 250.
32. Vargas, R.; Suárez, M.; Fernández, V. Determinación de un protocolo de tratamiento con hierro (Fe) no precondicionante frente a la isquemia-reperfusión hepática. XXXIII Congreso de la Sociedad de Farmacología de Chile, Olmué, Chile, 16 al 19 de Noviembre de 2011. *Rev Farmacol Chile.* 4:78 (Resumen), 2011.
33. Tietze F. Enzimic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 27: 502-522, 1969.
34. Reznic, A.Z.; Packer, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233: 357–363, 1994.
35. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685, 1970.

36. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 76: 4350-4354, 1979.
37. Clavien, P.A.; Selzner, M.; Rüdiger, H.A.; Graf, R.; Kadry, Z.; Rousson, V.; Jochum, W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 238: 843-850, 2003.
38. Smyrniotis, V.; Theodoraki, K.; Arkadopoulos, N.; Fragulidis, G.; Condi-Pafiti, A.; Plemenou-Fragou, M.; Voros, D.; Vassiliou, J.; Dimakakos, P. Ischemic preconditioning versus intermittent vascular occlusion in liver resections performed under selective vascular exclusion: a prospective randomized study. *Am J Surg.* 192: 669-674, 2006.
39. Heizmann, O.; Loehe, F.; Volk, A.; Schauer, R.J. Ischemic preconditioning improves postoperative outcome after liver resections: a randomized controlled study. *Eur J Med Res.* 13: 79-86, 2008.
40. Koneru, B.; Fisher, A.; He, Y.; Klein, K.M.; Skurnick, J.; Wilson, D.J.; de la Torre, A.N.; Merchant, A.; Arora, R.; Samanta, A.K. Ischemic preconditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial of safety and efficacy. *Liver Transpl.* 11: 196-202, 2005.
41. Fernández, V.; Tapia, G.; Varela, P.; Gaete, L.; Vera, G.; Mora, C.; Vial, M.T.; Videla, L.A. Causal role of oxidative stress in liver preconditioning by thyroid hormone in rats. *Free Radic Biol Med.* 44: 1724–1731, 2008.
42. Lu S. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1830: 3143–3153, 2013.
43. Silverstein, S.B.; Rodgers, G.M. Parenteral iron therapy options. *Am J Hematol.* 76:74-78, 2004.
44. Bayraktar, U.D.; Bayraktar, S. Treatment of iron deficiency anemia associated with gastrointestinal tract diseases. *World J Gastroenterol.* 16: 2720-2725, 2010.
45. Pantos, C.; Mourouzis, I.; Cokkinos, D.V. Thyroid hormone as a therapeutic option for treating ischaemic heart disease: from early reperfusion to late remodelling. *Vasc Pharmacol.* 52: 157–65, 2010.

46. Pantos, C.; Mourouzis, I.; Cokkinos, D.V. New insights into the role of thyroid hormone in cardiac remodeling: time to reconsider? *Heart Fail Rev.* 16: 79–96, 2011.