



UNIVERSIDAD DE TALCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**EL MEDIADOR PRO – RESOLUTIVO MARESINA 1 ESTIMULA LA DIVISIÓN
HEPÁTICA Y RESOLUCIÓN DE LA FIBROSIS EN MODELO DE FIBROSIS
INDUCIDO POR DIETILNITROSAMINA.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MEDICA**

ALUMNO: MATIAS IGNACIO SABAJ SOTO

PROFESOR GUÍA: DRA. JESSICA PAMELA ZUÑIGA HERNÁNDEZ

TALCA-CHILE

2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

Por las noches en las que siempre me acompañaste, esto te lo dedico a ti. Espero poder reencontrarme contigo algún día. Gracias por todo, pequeña anarquista.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo. En primero lugar quiero agradecer a la Dra Jessica Pamela Zuñiga Hernandez por su apoyo incondicional y especialmente por la paciencia que tuvo durante todo este tiempo conmigo. Por otro lado, mis padres fueron un soporte esencial, tanto en el área económica como emocional, a mi prima Lina Francisca Faundez y a mi amiga Carla Ignacia Alarcon Sepulveda por ayudarme y aconsejarme, a Javiera Retamal Zuñiga por animarme a seguir y a todos los que me ayudaron ya sea directa como indirectamente, muchas gracias.

INDICE

<i>N°</i>	<i>Sección</i>	<i>Página</i>
	Agradecimientos	II
	Índice	III
	Índice de tablas e imágenes	VI
1	Resumen	1
2	Introducción	2
3	Marco teórico	3
3.1	Hígado	3
3.1.1	Anatomía hepática	3
3.1.2	Componentes del tejido hepático	5
3.2	Estadios de la lesión hepática	9
3.2.1	Fibrosis	9
3.2.2	Actividad celular y división hepática	11
3.2.2.1	Caspasa-3 activa	11
3.2.2.2	Ciclina D1	13

3.2.2.3	Cirrosis y falla hepática	14
3.2.3	Resolución de la fibrosis	15
3.3	Modelos de estudio de daño hepático	16
3.4	Ácidos grasos omega 3	18
3.4.1	Maresina - 1	20
3.4.1.1	Mecanismo de maresina a nivel hepático	21
3.4.1.2	Mecanismo de acción en otros tejidos	22
3.5	Importancia Biomédica del estudio de terapias hepatoprotectoras.	23
4	Hipótesis y objetivos	24
5	Materiales y métodos	25
5.1	Animales	25
5.2	Modelo de fibrósis de dietilnitrosamina	25
5.3	Grupos y controles	26
5.4	Eutanasia	26
5.5	Evaluación de la morfología hepática	27
5.6	Índice de actividad mitótica	28
5.7	Electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE)	28
5.8	Western Blot	29

6	Resultados	31
6.1	Migración electroforética de extractos proteicos	31
6.2	Cuantificación de la expresión proteica mediante Western blotting	32
7.3	Análisis histopatológicos de cortes hepáticos	33
7	Discusión	37
8	Conclusión	42
9	Referencias	43

INDICE DE TABLAS E IMÁGENES

Figura 1	Sección del lóbulo hepático.	4
Figura 2	Representación de los acinos hepáticos con identificación de las zonas Z1-Z3.	6
Figura 3	Modelo simplificado de la expresión y activación de ciclina D1	14
Figura 4	Tinción de azul de Coomasie de muestras corrida en geles SDS-PAGE.	31
Figura 5	Efecto de MaR-1 sobre los niveles de caspasa 3 activa y ciclina D1.	32
Figura 6	Fotomicrografías de parénquima hepático teñidos con (H&E).	33
Figura 7	Análisis de la cito-arquitectura hepática.	34

1 RESUMEN

El hígado es un órgano que posee variadas funciones dentro del organismo, además posee un intrincado sistema de reparación y regeneración, el cual consiste en la generación de matriz extracelular por parte de las células estrelladas (en conjunto con otras líneas celulares del microambiente hepático) con la posterior regeneración de estas. Alteraciones y mantención de este proceso es muy común, lo cual deriva en varias patologías muy prevalentes en la población, como lo es la cirrosis hepática. Dentro de los estudios utilizados para evaluar los procesos de fibrosis hepática se encuentra la inducción por dietilnitrosamina, modelo ampliamente usando, mediante el cual se puede evaluar el efecto de diversos tratamientos anti-fibróticos, como es el caso de los ácidos grasos poliinsaturados, como los ácidos grasos omega 3 y omega 6. En el último tiempo se han descubierto varios derivados procedentes de estos ácidos grasos, los cuales son capaces de mediar tanto la respuesta inflamatoria como la generación matriz extracelular, denominados “Specific pro-resolving mediators”. Dentro de este grupo es posible encontrar a las maresinas, derivadas del ácido docosahexaenoico. Varios autores han estudiado sus efectos anti-inflamatorios en modelos murinos, evidenciándose las grandes ventajas de este compuesto a lo largo de los años. En esta tesis se pudo evidenciar el rol de maresina-1 sobre la fibrosis hepática en modelo de ratas cepa Sprague dawley, en donde maresina-1 protege al tejido hepático frente a la generación de necrosis, además de mantener la integridad de la cito - arquitectura hepática, por otro lado, carece de capacidad reductora de infiltrado leucocitario en hígado y promueve la replicación celular.

2 INTRODUCCIÓN

El hígado cumple funciones esenciales en nuestro organismo tales como síntesis, almacenamiento, transformación, degradación y destoxificación de xenobioticos y compuestos endógenos. Es por esto que un daño a nivel de este órgano tiene consecuencias perjudiciales a nivel sistémico. Sin embargo, nuestro organismo tiene un mecanismo de respuesta ante el daño, es decir, tiene la habilidad para regenerarse y recuperar su función, lo cual se puede ver afectada por diversas etiologías, encontrándose dentro de las más relevantes, la respuesta ante un daño tisular repetitivo, conocida como fibrosis.

Existen diversas patologías que tienen como resultado algún grado de fibrosis, dentro de ellas la hepatitis crónica viral (HV)-B, HVC, la enfermedad hepática alcohólica (ALD) y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (AFLD), las cuales pueden cursar con cirrosis hepática y/o también insuficiencia hepática. Estas patologías son un problema de salud pública que se traduce en una morbi-mortalidad significativa, alcanzando cifras de mortalidad cercanas al 12 por cada 100.000 habitantes en Estados Unidos. En Chile la tasa de mortalidad por cirrosis hepática para el segundo periodo 1990-2007 fue de 17 muertes por cada 100.000 habitantes, 8 para la alcohólica y 9 para la no alcohólica. Estas cifras indican la importancia de las terapias anti-fibróticas, ya que pueden contribuir a la disminución del curso de estas patologías que por lo general terminan en desenlaces fatales. Muchos estudios indican que estas terapias están enfocadas a reducir tanto la inflamación como la deposición de matriz extracelular (ECM, por sus siglas en ingles), interfiriendo con la fibrogénesis o induciendo la fibrinólisis por medio de fármacos. Por otro lado, se ha encontrado que existen diversas moléculas que pueden ejercer efectos hepatoprotectores a este órgano, entre los cuales encontramos a los derivados alimenticios esenciales: ácidos grasos Omega-3 (ω -3) y Omega-6 (ω -6), siendo estos una alternativa interesante para combatir la fibrosis hepática.

3 MARCO TEÓRICO

El hígado es una glándula que cumple funciones de: almacenamiento de glucógeno, transformación de carbohidratos, mantención estable de glicemia en periodos postprandiales, oxidación de ácidos grasos, desaminación de aminoácidos, síntesis de proteínas plasmáticas (albumina, factores de coagulación, proteínas de fase aguda, entre otros) y decodificación de sustancias exógenas como el alcohol y drogas, entre otras funciones. El parénquima hepático está compuesto por los hepatocitos, que realizan innumerables funciones metabólicas, incluyendo la síntesis y secreción de proteínas plasmáticas, lipogénesis, ensamblaje y secreción de lipoproteínas, lipoproteínas del tipo VLDL (del inglés very low-density lipoprotein), biosíntesis del colesterol y metabolismo xenobiótico. Un gran número de proteínas secretoras, incluidas la mayoría de las proteínas plasmáticas como la albúmina, las apolipoproteínas y los factores de la coagulación, son sintetizadas por los hepatocitos⁽¹⁾.

3.1 Hígado

3.1.1 Anatomía hepática

El hígado es el órgano más grande del cuerpo y representa aproximadamente del 2 % al 3 % del peso corporal promedio. El hígado tiene 2 lóbulos típicamente descritos de dos maneras, por anatomía morfológica y por anatomía funcional⁽²⁾. Es un órgano bien vascularizado y en reposo recibe hasta el 25 % del gasto cardíaco total (más que cualquier

otro órgano). Su suministro doble de sangre se divide de forma única entre la arteria hepática, que aporta entre el 25 % y el 30 % del suministro de sangre, y la vena porta, que es responsable del 70 % al 75 % restante. La sangre arterial y portal finalmente se mezcla dentro de los sinusoides hepáticos antes de drenar en la circulación sistémica a través del sistema venoso hepático⁽²⁾. El hígado tiene tres compartimentos principales estrechamente integrados: los hepatocitos que conforman el parénquima hepático, el sistema biliar y el sistema vascular. El primero comprende el 70 % de las células; el sistema biliar se comunica a través y fuera del hígado con órganos extrahepáticos inmediatamente adyacentes; y el último es, en muchos sentidos, el más complejo de los tres sistemas, el sistema vascular, el que se comunica por fuera y por todo el hígado⁽³⁾. Estructura anatomo-histológicas importantes son el lóbulo y el acino hepático. El acino es una unidad funcional del hígado. En general, el hígado se divide en lóbulos hexagonales orientados alrededor de las venas centrales, tal como se esquematiza en la Figura 1. En las esquinas del lóbulo están los tractos portales que incluyen una rama de la vena porta, una arteria hepática y un conducto biliar. El acino se basa en vasos ramificados de los conductos porta, donde suministra sangre a través de la vena porta y la arteria hepática, mientras que los vasos penetrantes fluyen hacia el acino a través de los cordones hepáticos⁽⁴⁾.

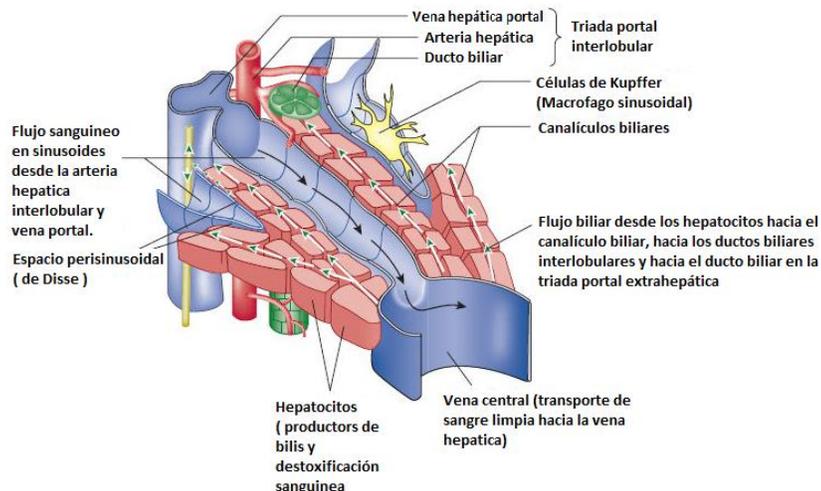


Figura 1: Sección del lóbulo hepático con diagrama funcional de la bilis y del flujo sanguíneo. Flechas indican el flujo sanguíneo hacia la vena central. Adaptado de Moore KL, et al (2013)⁽⁵⁾.

3.1.2 Componentes del tejido hepático.

Sinusoides: Son conductos vasculares intraparenquimatosos especializados que se parecen a los capilares sistémicos pero que carecen de un revestimiento endotelial continuo (fenestrado) (Figura 2). A diferencia de otros compartimentos hepáticos, los sinusoides involucran tipos celulares múltiples y dispares: células endoteliales sinusoidales predominantemente fenestradas (SEC), así como células estrelladas hepáticas (HSCs) y varias células inmunológicamente activas, incluidas las células de Küpffer (KCs) y células natural killer (NK). No hay membrana basal entre las células endoteliales fenestradas y los hepatocitos que recubren los sinusoides; están separados por el espacio de Disse, el cual corresponde a una interface enriquecida en proteínas, permitiendo la transferencia de moléculas de señalización y nutrientes entre las células hepáticas⁽⁶⁾. La sangre que fluye a través de la luz sinusoidal transporta su contenido de oxígeno, nutrientes, hormonas y factores inflamatorios desde la triada hacia la vena, dispersándose a través del hígado⁽³⁾. Las zonas 1, 2 y 3 (Z1 – Z3) en el acino expresan diferentes áreas metabólicas que aumentan las distancias de difusión del suministro de sangre⁽⁴⁾.

Hepatocitos: Los hepatocitos forman una capa de células crucialmente importante que separa la sangre sinusoidal de la bilis canalicular. Tienen una polaridad organizada de manera única con una membrana basal enfrentada a células endoteliales sinusoidales hepáticas, mientras que uno o más polos apicales pueden contribuir a varios canalículos biliares conjuntamente con los hepatocitos directamente opuestos⁽⁷⁾. Funcionalmente, los hepatocitos de la zona periportal/zona 1, representado en la figura 3, están especializados en funciones hepáticas oxidativas como la gluconeogénesis, la β -oxidación de ácidos grasos y

la síntesis de colesterol, mientras que las células de la zona 3 son más importantes para la lipogénesis y la desintoxicación de los fármacos, lo que está basado en el sistema enzimático citocromo P-450 (CYP450)⁽⁸⁾. Por otro lado, la zona medio-acinar o zona 2 es aquella que se encuentra entre la zona 1 y la zona 3. La zona 3 o centrolobular es aquella que bordea la vena central y está asociada con la desintoxicación (por ejemplo del paracetamol), el metabolismo aeróbico, la glucólisis y la hidrólisis⁽⁹⁾.

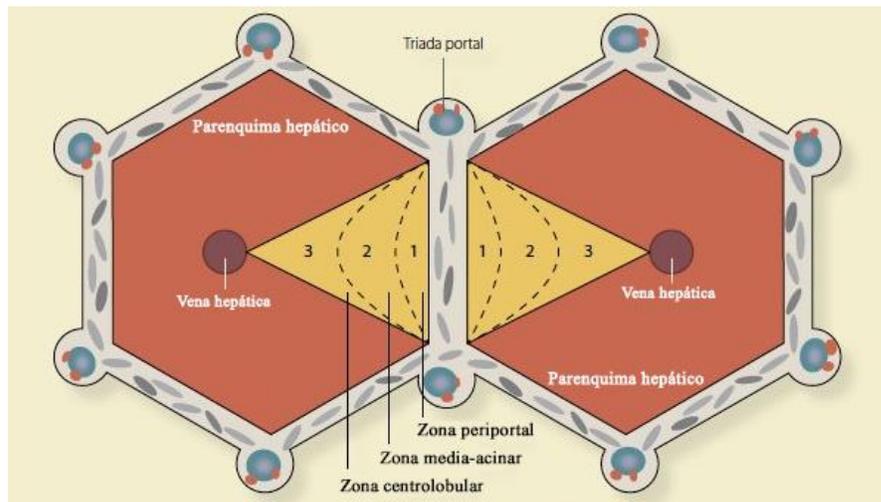


Figura 2: Representación de los acinos hepáticos con identificación de las zonas Z1-Z3. Figura adaptada de Villegas-Serrano, E. et al. 2017⁽¹⁰⁾.

Células estrelladas hepáticas (HSCs): Las HSCs son pericitos del hígado que ocupan el espacio entre las células parenquimatosas y las células endoteliales sinusoidales del lóbulo hepático. Las HSCs comprenden funciones especializadas tales como almacenamiento de vitamina A, funciones hemodinámicas, soporte de la regeneración hepática e inmunorregulación. Después de la generación de una lesión hepática, las HSCs se someten a un proceso de activación y transformación en una estructura altamente proliferativa similar a los miofibroblastos. La activación de HSCs en hígado dañado se caracteriza morfológicamente por agrandamiento del retículo endoplasmático rugoso,

pérdida de acumulos de vitamina A, membrana nuclear con volantes y aparición de filamentos contráctiles. La expresión de la proteína del citoesqueleto α actina del músculo liso (α -SMA, por sus siglas en inglés) se incrementa, lo que confiere un aumento del potencial contráctil, en donde α -SMA se reconoce como un marcador de HSCs activadas. Las HSC activadas sintetizan y secretan una gran cantidad de componentes de ECM como colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos y glucoproteínas, además se produce un deterioro de la degradación de ECM (fibrólisis). El aumento de la deposición neta de ECM conduce a una interrupción gradual de la arquitectura hepática normal y finalmente cirrosis hepática⁽¹¹⁾ en donde el componente de ECM mayormente producido por las HSCs corresponde al colágeno tipo 1 (col-I) y en conjunto con otros constituyentes de ECM producidos por HSCs tales como proteoglicanos sulfatados y glicoproteínas adhesivas, el col-I forma las bandas fibróticas que rodean los nódulos en los hígados cirróticos. Sin embargo, la deposición temprana de ECM en el espacio subendotelial causa una disminución de la función hepática y también contribuye a la perpetuación de la activación de las HSCs⁽¹²⁾. Las HSCs activadas también son mediadores significativos de la inmunorregulación hepática, secretan numerosas quimioquinas y citocinas, como la interleucina (IL)-6, IL-8, el péptido quimiotáctico monocitario-1 (MCP-1), y regulan la activación de las células T. Por lo tanto, las HSCs inician y amplifican la inflamación hepática al inducir la infiltración de leucocitos mono y polimorfonucleares (PMN). Además, las HSCs activadas promueven la diferenciación de los macrófagos hepáticos con funciones proinflamatorias y profibróticas⁽¹³⁾. Las HSCs presentan a nivel de membrana señales estimuladores y co-estimuladoras de la respuesta inmune como CD40⁽¹⁴⁾, CD80⁽¹⁵⁾ y HLA-I y HLA-II⁽¹⁶⁾. HLA-I tiene como función el transporte y presentación de péptidos degradados intracelularmente a linfocitos citotóxicos CD8⁺⁽¹⁷⁾, por otro lado HLA-II tiene la capacidad de presentar antígenos a los linfocitos T CD4⁺⁽¹⁸⁾. La interacción del ligando específico de CD40 gatilla mecanismos de señalización interna, estimulando la síntesis de quimioquinas⁽¹⁶⁾. Las HSCs además presentan CD68, una glicoproteína que cumplen un rol en la endocitosis y en el tráfico lisosomal de los antígenos⁽¹⁹⁾, lo cual le confiere la capacidad de comportarse como una célula presentadora de antígenos (CPA)⁽¹⁶⁾.

Celulas de Küpffer (KCs): Las KCs son un componente crítico del sistema fagocítico mononuclear, conformando el mayor grupo de macrófagos residentes y son fundamentales tanto para la respuesta hepática como sistémica a los patógenos⁽²⁰⁾. Las KC son mediadores críticos tanto de la lesión como de la reparación hepática, además son las responsables de la eliminación de patógenos y productos microbianos⁽²¹⁾. En respuesta a los agentes de daño hepático, incluido el uso nocivo del alcohol, la infección por VHC y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), las KCs se activan para expresar citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF)- α , IL-1 β e IL-6, moléculas quimiotácticas como MCP-1 y CXCL8 (del inglés chemokine CXC motif ligand), y enzimas, como la óxido nítrico sintasa inducible (*i*NOS). Como resultado de este escenario inflamatorio, las KCs también sintetizan factores profibrogénicos, como el *factor de crecimiento transformante* (TGF)- β 1 capaz de activar las HSCs, la participación de las KCs en la patogénesis de la fibrosis hepática crónica se ha relacionado principalmente con la inflamación hepática y la activación de HSC⁽²²⁾. Las KCs exhiben una tremenda plasticidad; dependiendo del entorno metabólico e inmune local, puede expresar una gamma de fenotipos polarizados, desde el fenotipo pro-inflamatorio M1 activado en respuesta a la unión de los receptores toll-like (TLR) con los ligandos de lipopolisacárido (LPS) e interferón gamma (IFN)- γ , lo que lleva a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, especies de oxígeno reactivo (ERO) y óxido nítrico⁽²³⁾. El otro fenotipo alternativo es M2, el cual es activado después de ser estimulado por IL-4 / IL-13, promoviendo la remodelación tisular y ejerciendo funciones inmuno-reguladoras a través de la producción de ornitina y poliaminas. Múltiples fenotipos M2 han sido observados y cada uno de ellos está involucrado en la resolución de la inflamación y la cicatrización de heridas⁽²⁴⁾.

3.3 Estadios de la lesión y daño hepático

3.2.1 Fibrosis

La fibrosis hepática es un proceso reversible de reparación de heridas en respuesta a una lesión hepática causada por múltiples sustancias hepatotóxicas, HV, alcohol, enfermedades hepáticas autoinmunes y atresia biliar. La fibrosis hepática se caracteriza por la deposición de ECM producida por células fibrogénicas o mielo-fibroblastos (MF) activados, la lesión transitoria se recupera a la condición normal en la fase aguda, sin embargo, si se produce una lesión, la inflamación y la acumulación de ECM forman tejido cicatricial causado por una sustitución progresiva del parénquima hepático como resultado de la cirrosis, que es la etapa final de la fibrosis⁽²⁵⁾. También hay una acumulación de otras proteínas matriciales, que incluyen elastina, hialuronato, proteoglicanos y fibronectina. Este tipo de matriz tiene la capacidad de activar HSCs quinescentes, lo que lleva a la pérdida de microvellosidades de hepatocitos y la desaparición de las fenestraciones endoteliales. Este cambio arquitectónico de las células endoteliales también afecta el transporte de solutos desde los sinusoides a los hepatocitos, contribuyendo aún más a la disfunción de los hepatocitos. Además, la acumulación de ECM en sí misma provoca vías de retroalimentación positiva que amplifican la fibrosis⁽²⁶⁾. La remodelación de la ECM es fundamental para la preservación de la homeostasis durante la lesión hepática. Esta homeostasis depende del equilibrio fino entre las metaloproteinas de la matriz (MMP) y sus inhibidores, inhibidores tisulares de las metaloproteinas de la matriz (TIMP). Si bien el aumento excesivo de la ECM está controlado por MMP (especialmente MMP 1, 2, 8 y 13), la fibrosis progresiva se correlaciona con el aumento marcado de los TIMP (TIMP-1 y TIMP-2). Además, debido a que TIMP-1 también tiene efectos antiapoptóticos sobre las HSCs, induce la fibrogénesis al promover la supervivencia de las células fibrogénicas⁽²⁷⁾. Las células fibrogénicas (miofibroblastos) desempeñan un papel central durante la fibrosis hepática, su origen ha sido ampliamente estudiado, y se han identificado varias fuentes de MF. Debido a que las HSCs

son las principales células productoras de ECM en el hígado lesionado, actualmente se consideran la principal fuente de MF. Los MF hepáticos también pueden originarse a partir de fibroblastos y células mesenquimatosas derivadas de médula ósea⁽²⁸⁾. Durante la fibrogénesis hepática, la lesión parenquimatosa y la reacción inflamatoria resultante generan un gran panel de señales que estimulan la inducción de factores de transcripción específicos y morfógenos en HSC quiescentes, iniciando así la activación y la adquisición de propiedades fibrogénicas y proinflamatorias.

La activación sostenida de los mecanismos de compensación del daño hepático conduce a cambios discretos en el comportamiento de las HSCs que incluyen proliferación, quimiotaxis, fibrogénesis, contractilidad, pérdida de retinoides y liberación de quimioatrayentes / citocinas⁽²⁹⁾. En la etapa temprana de la lesión, todos los tipos de células vecinas pueden contribuir a la estimulación paracrina de la activación de HSCs, como hepatocitos, SECs, KCs, linfocitos y NK. La producción de ECM, en particular col-I en HSCs se regula post-transcripcionalmente por múltiples estímulos y vías:

- El **factor de crecimiento transformante beta** (TGF- β por sus siglas en ingles) es sintetizado principalmente por HSCs/MF, KC, células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSECs por sus siglas en ingles) y hepatocitos en el hígado. La familia TGF- β 1 está compuesta por seis miembros y entre ellos los TGF- β 1 han demostrado tener un papel clave en el inicio y mantenimiento de la fibrosis hepática. El nivel de expresión de TGF- β 1 aumenta en el hígado fibrótico y alcanza un máximo en la cirrosis. El efecto pro-fibrogénico de TGF- β 1 es intrincado, involucra múltiples aspectos: el efecto primario de TGF- β 1 es estimular la activación de HSCs y el bucle autocrino TGF- β 1 en HSCs activadas, generando una retroalimentación positiva importante para la progresión de la fibrosis hepática. TGF- β 1 induce la expresión de los genes productores de matriz e inhibe la degradación de la ECM mediante la regulación negativa de la expresión de MMP y la promoción de TIMP, lo que conduce a una deposición excesiva de fibras de colágeno y promueve el desarrollo de la fibrosis hepática⁽³⁰⁾. El **factor de crecimiento derivado de plaquetas** (PDGF por sus siglas en inglés) es el mitogeno más potente para las HSCs. La familia de PDGF tiene

cuatro miembros, PDGF-A, -B, -C y -D. El PDGF y sus receptores están notablemente sobre-expresados en los tejidos fibrosos, y su actividad aumenta con el grado de fibrosis hepática. Se ha demostrado que la PDFG regula positivamente la expresión de MMP-2, MMP-9 y TIMP-1 e inhibe la actividad de la colagenasa, reduciendo así la degradación de la ECM⁽³¹⁾. Las **interleucinas pro-fibrogenicas** son sintetizadas y secretadas rápidamente por las KCs y SEC en respuesta al daño tisular. De entre ellas, la más importante es la IL -1 β la cual puede activar directamente las HSCs y estimularlas para producir MMP-9, MMP-13 y TIMP-1, lo que produce fibrogénesis hepática⁽³²⁾. **TNF- α** es una citoquina vital involucrada en inflamación, inmunidad y organización celular. Aunque los macrófagos activados son una fuente importante de TNF- α , pueden ser producidos por varias otras células, incluyendo fibroblastos, astrocitos, KCs, entre otros. La región promotora del gen TNF- α contiene sitios de unión para varios factores de transcripción, que incluyen el factor de transcripción nuclear (NF- κ B, por sus siglas en ingles), elemento de respuesta AMP cíclico (CRE), proteínas activadoras (AP)-1 y 2 y células T activadas por factor nuclear⁽³³⁾.

3.2.2 Actividad celular y división hepática

3.2.2.1 Caspasa 3 activa

En los mamíferos, las caspasas son una familia de cisteino-proteasas que contribuyen a varias funciones, entre ellas la apoptosis celular, en donde (principalmente caspasa-3) se genera una cascada de señalización, lo que deriva en una activación inapropiada o una desactivación rápida de proteínas estructurales clave y enzimas de señalización, homeostáticas y de reparación importantes⁽³⁴⁾. Todas las caspasas son producidas por las

células como zimógenos catalíticamente inactivos y cursan por un proceso de proteólisis durante su activación⁽³⁵⁾. Estas se pueden clasificar en dos grandes grupos: las caspasas iniciadoras (comprendidas por caspasa-2, caspasa-8, caspasa-9 y caspasa-10) y las caspasas ejecutoras (comprendidas por caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7). Las formas funcionales de las caspasas iniciadoras promueven directa o indirectamente la activación de las caspasas ejecutoras^(36, 37). Las caspasas iniciadoras no solo activan a las ejecutoras, sino que también actúan como sustratos de estas. Caspasas iniciadoras son activadas por caspasa-3, generándose un feedback de amplificación el cual es seguido por el incremento de la activación de las caspasas. Es bien establecido que esta caspasa es la ejecutora dominante, cuya activación deriva en la muerte celular⁽³⁸⁾. Las dos principales vías de activación de caspasa son: la vía del receptor/extrínseca y la vía mitocondrial/intrínseca; ambas gatillan una cascada de señalización en las caspasas la cual inducen la fragmentación del DNA⁽³⁹⁾. En la vía apoptótica extrínseca, la cascada de señalización de caspasa es gatillada por señales procedentes de los receptores de muerte de la membrana celular, los cuales son activados por ligandos, como el TNF- α , FASL(CD95L) y el ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL, por sus siglas en inglés)^(40, 41). En la vía apoptótica intrínseca, la cascada de activación de caspasa puede ser gatillada por varios estímulos, incluyendo la estimulación por receptor de linfocitos T, radiación ultra-violeta, daño del DNA, estrés del retículo endoplásmico, hormonas (glucocorticoides) y privación de citoquinas. Esta vía depende exclusivamente de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa^(42, 43), resultando en la permeabilización de moléculas como el citocromo C⁽⁴⁴⁾.

Activación de la cascada de señalización de caspasas resulta en la escisión de un número importante de proteínas celulares, conocidas como los “sustratos de la muerte celular”. Estas proteínas, incluida la actina (la cual mantiene unida a la célula) y las lamininas nucleares, son escindidas lo cual resulta en la condensación de la cromatina y en una contracción nuclear. En adición, escisión del inhibidor del complejo DNasa activado por caspasa (iCAD, por sus siglas en inglés) resulta en la liberación de endonucleasas, las cuales viajan al núcleo para fragmentar el DNA. Escisión de proteínas del cito-esqueleto, como la actina, plectina y gelsolina derivan en la fragmentación, formación de cuerpos apoptóticos y

en la destrucción celular⁽⁴⁵⁾. Durante la apoptosis, caspasa 3 activada induce la escisión de iCAD, lo cual libera el complejo CAD en su forma activa desde iCAD⁽⁴⁶⁾. CAD es una endonucleasa específica de DNA de doble hebra, cuya actividad lleva a la generación de rupturas de doble cadena en las regiones inter-nucleosoma de la cromatina⁽⁴⁷⁾. La poli ADP ribosa polimerasa es uno de los objetivos nucleares importante para las caspasas, ya que participa en muchas funciones celulares, incluida la reparación del DNA y el mantenimiento de la estabilidad genómica⁽⁴⁸⁾.

3.2.2.2 Ciclina D1

Las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDK por sus siglas en inglés) son un grupo de proteínas actúan sobre los miembros de la familia de las proteínas retinoblastomas (Rb) para regular la entrada y progresión del ciclo celular al coordinar la replicación del DNA y la división celular (figura 4). Como parte de la regulación de las HSCs quiescentes, las ciclinas y los CDKs determinan si las HSCs ingresan en la fase G1 del ciclo celular para progresar a fase S o permanecen en G0, en respuesta a señales mitogénicas externas⁽⁴⁹⁾. La regulación es llevada a cabo principalmente por Ras y mecanismos de señalización dependiente de Ras⁽⁵⁰⁾. La activación mitogénica mediada por la activación de receptores de tirosina quinasa en la membrana celular, como es el caso del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR por sus siglas en inglés) el cual inicia la señalización en cascada Ras-Raf-MEK-ERK, el cual induce la expresión de ciclina D1⁽⁵¹⁾. Dentro de las funciones de ciclina D1 está la promoción de la proliferación celular a través de la formación de complejos con CDK4/6, siendo este complejo el encargado de la fosforilación la proteína Rb inactivando su función, de este modo inhibe la supresión en el ciclo celular y promueve la transición G1/S. La fosforilación de Rb mediada por el complejo ciclina D-CDK4/6 libera el factor de transcripción E2F y promueve la activación de genes esenciales para la síntesis de DNA^(52, 53). El punto de restricción (R), al final de la fase G1, determina el tiempo al cual las células se vuelven refractarias a la señalización mitogénica extracelular, pasando a una

regulación autónoma, destinada a replicar su DNA y continuar en el ciclo celular hacia la división mitótica⁽⁵⁴⁾.

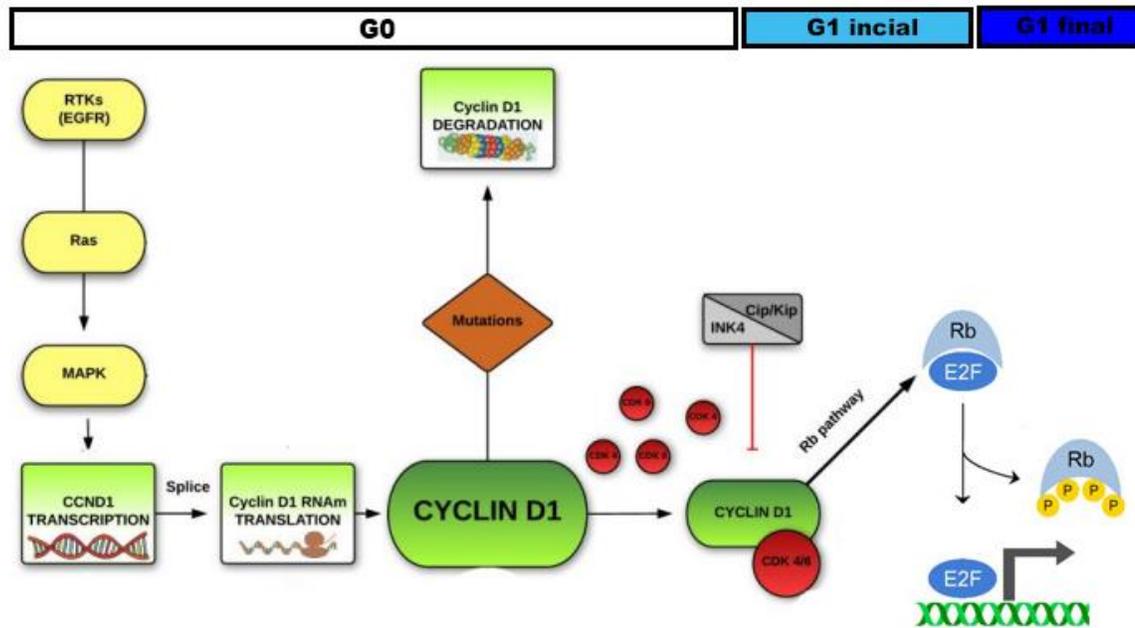


Figura 3. Modelo simplificado de la expresión y activación de ciclina D1. Adaptado de García, P, et al (2016)⁽⁵⁵⁾.

3.2.2.3 Cirrosis y falla hepática

La cirrosis hepática es la ruta patológica final común de daño hepático que surge de una amplia variedad de enfermedades hepáticas crónicas. Aunque las causas de la cirrosis hepática son multifactoriales, hay algunas características patológicas que son comunes a todos los casos de cirrosis hepática, incluida la degeneración y necrosis de los hepatocitos, y el reemplazo del parénquima hepático por tejidos fibróticos y nódulos regenerativos, y la pérdida de la función hepática. La fibrosis como un precursor de la cirrosis es un proceso

patológico fundamental en la evolución de todas las enfermedades hepáticas crónicas a la cirrosis⁽⁵⁶⁾. La transición de la enfermedad hepática crónica a la cirrosis implica la inflamación, la activación de las HSCs con la consiguiente fibrogénesis, la angiogénesis y las lesiones de extinción parenquimatosa causadas por la oclusión vascular. Este proceso conduce a cambios micro vasculares hepáticos pronunciados, caracterizados por remodelación sinusoidal (deposición de matriz extracelular a partir de HSCs activadas proliferantes que producen capilarización de los sinusoides hepáticos), formación de derivaciones intra-hepáticas (debido a la angiogénesis y pérdida de células parenquimatosas) y disfunción endotelial hepática⁽⁵⁷⁾. Esto finalmente produce falla hepática, con aparición de situaciones clínicas relevantes como la hipertensión portal y la encefalopatía hepática con consecuencias fatales para el paciente.

3.2.3 Resolución de la fibrosis

La fibrosis hepática es el resultado de la respuesta del hígado frente a la cicatrización reiterada de heridas. Después de una lesión hepática aguda, las células parenquimatosas regeneran y reemplazan las células necróticas o apoptóticas. Este proceso está asociado con una respuesta inflamatoria y una deposición limitada de ECM. Si la lesión hepática persiste, eventualmente la regeneración hepática falla y los hepatocitos se sustituyen por abundante ECM, incluido el colágeno fibrilar. La distribución de este material fibroso depende del origen de la lesión hepática. En la hepatitis viral crónica y los trastornos colestásicos crónicos, el tejido fibrótico se localiza inicialmente alrededor de los conductos portales, mientras que en ALD, se localiza en las áreas pericentrales y perisinusoidales⁽⁵⁸⁾. Las HSC activadas migran y se acumulan en los sitios de reparación de tejidos, secretan grandes cantidades de ECM y regulan la degradación de ECM⁽⁵⁹⁾. La proliferación de las HSCs está regulada en parte por las ciclinas G1, dentro de las cuales se encuentran a las ciclinas D y ciclinas E, desempeñando papeles cruciales en la transición de estas del estado G0 al estado G1 del ciclo celular, mediante la activación del complejo de ciclinas CDK4/CDK6, que

controla la progresión de las HSCs hacia la fase G1 en respuesta a señales mitogénicas externas⁽⁴⁹⁾. Los hepatocitos dañados liberan ROS y mediadores fibrogénicos e inducen el reclutamiento de glóbulos blancos por las células inflamatorias. La apoptosis de hepatocitos dañados estimula las acciones fibrogénicas de los miofibroblastos hepáticos⁽⁶⁰⁾.

El aumento de la actividad colagenolítica es un mecanismo importante de resolución de la fibrosis. Los colágenos fibrilares (I y III) se degradan mediante MMP intersticiales (MMP-1, -8 y -13 en humanos y MMP-13 en roedores). Durante la resolución de la fibrosis, la actividad de MMP aumenta debido a una disminución rápida en la expresión de TIMP-1. Se produce una degradación parcial del colágeno fibrilar y la interacción alterada entre las HSC activadas y la ECM favorece la apoptosis. La eliminación de las HSCs activadas por apoptosis precede a la resolución de la fibrosis. La estimulación de los receptores de la muerte en las HSCs activadas y una disminución en los factores de supervivencia, incluido TIMP-1, pueden precipitar la apoptosis de la HSC⁽⁶¹⁾.

3.3 Modelos de estudio de daño hepático

Existen diversos modelos de estudio del daño hepático, los cuales se pueden clasificar en físicos y químicos: **(i) Físicos: Lipopolisacáridos (LPS)** son un componente de las paredes celulares de bacterias Gram negativas que activa a las KCs y provocan daño hepático. La migración de neutrófilos, la liberación de EROS y la amplificación de la señal conduce a la lesión tisular⁽⁶²⁾. **Isquemia/reperfusión** es un modelo que consiste en la interrupción del flujo sanguíneo hepático que se produce para minimizar la pérdida de sangre intra-operatoria durante la resección hepática o durante el trasplante hepático, provoca un periodo de isquemia hepática. La lesión inflamatoria del órgano es una preocupación principal después de la cirugía y/o el trasplante de hígado. Durante la fase inicial de la lesión, las KCs se

activan, liberan EROs y citocinas proinflamatorias, incluido el TNF- α ^(63, 64). **Nutrición (modelo de NAFLD)** se basa en la sobre nutrición y un estilo de vida sedentario que conduce a un aumento de peso y, en última instancia, a la obesidad. La mayoría de los modelos animales se centran en proporcionar una dieta que causa daño hepático⁽⁶⁵⁾. **Ligación conductor biliar** consiste en la canulación/obstrucción por ligadura del conducto biliar (LCB), lo que induce cirrosis, produciendo cambios morfológicos que son comparables a los observados en la cirrosis biliar humana⁽⁶⁶⁾. **(ii) Químicos: Tetracloruro de carbono (CCL₄)**. Es uno de los mejores modelos de daño y fibrosis hepáticos estudiados. Una sola dosis o muy pocas dosis dan como resultado un daño hepático agudo que a las pocas semanas genera fibrosis y se puede producir cirrosis experimental, mediante dosis repetidas⁽⁶⁷⁾. Debido a la integración por parte de Chile a la normativa establecida por el protocolo Relativo a los Clorofluorocarbonos del Convenio de Viena para la Protección de la Capa de Ozono, reunida en Montreal, Canadá (desde el 14 al 16 de septiembre de 1987), se imposibilita la utilización de compuestos que agoten la capa de ozono, entre los cuales se encuentra el CCl₄, situación que imposibilita poder estudiar este modelo de fibrosis en nuestro país. **n-nitrosodiethylamine (DEN)**: Diversas nitrosaminas, incluido el DEN, son hepatotoxinas agudas y carcinógenos en muchas especies animales. La administración crónica de DEN en roedores en dosis altas es extremadamente eficaz para inducir fibrosis y/o tumores hepáticos. Incluso una sola aplicación de DEN a 10-90 mg/kg de peso corporal generalmente tiene un efecto carcinogénico irreversible en los roedores⁽⁶⁸⁾. En el primer paso, DEN se hidroxila a α -hidroxilnitrosamina, este paso de bioactivación es dependiente de oxígeno y NADPH y está mediado por el CYP450. Después de la escisión del acetaldehído, se forma un ion electrofílico de etildiazonio. Este ion etildiazonio causa daño al ADN al reaccionar con nucleófilos como bases de ADN⁽⁶⁹⁾. La degradación final de DEN conduce a la formación de intermediarios reactivos que son causantes de la formación de macromoléculas metiladas. En particular, la formación de N7-metilguanina y O6-metilguanina en el ADN es sumamente crítica⁽⁷⁰⁾. En las moléculas de ADN afectadas, estas bases modificadas dan lugar a depurinaciones, produciendo sitios apurínicos que pueden dar lugar a transversiones de guanina a timina, o dar como resultado un emparejamiento incorrecto directo con la base. El estrés oxidativo causado por DEN es bien conocido por contribuir a la patogénesis en la HCC⁽⁷¹⁾. La administración de DEN causa necrosis severa, pero también deposición de ECM en el hígado, particularmente colágeno, producto de la lesión parenquimatosa y la reacción

inflamatoria resultante se genera un gran panel de señales que estimulan la síntesis de factores de transcripción específicos y morfógenos en HSCs quiescentes, iniciando así la activación y la adquisición de propiedades fibrogénicas y proinflamatorias⁽⁷²⁾. Este modelo de daño hepático crónico es el propuesto en esta tesis para llevar a cabo los estudios conducentes a responder nuestra hipótesis.

3.4 Ácidos grasos omega 3.

Los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) son ácidos grasos que contienen dos o más enlaces dobles carbono-carbono no saturados con átomos de hidrogeno en múltiples ubicaciones dentro de la molécula. Los PUFA se pueden clasificar en varios grupos por su estructura química en ácidos grasos omega-3 y omega-6: los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (ω -3 o n-3) se refieren a un grupo de PUFA en el que el primer doble enlace se encuentra a 3 carbonos del átomo de carbono extremo (omega) de la molécula; los omega-6 (ω -6 o n-6) son una familia de PUFA que tienen en común un doble enlace final carbono-carbono en la posición n-6, es decir, el sexto enlace contando desde el extremo metilo de la molécula⁽⁷³⁾. Los PUFA ω -3 son sintetizados por la ácido α -linolenico de ácidos grasos ω -3 (ALA) de cadena formando los ácidos grasos ω -3 de cadena larga: ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Los PUFA ω -6 derivan del ácido linoleico (LA), que también se puede convertir en el ácido γ -linoleico (GLA) de 18 carbonos y los ácidos araquidónicos (AA) y di-homo- γ -linoleico (DGLA) de 20 carbonos. Tanto LA como ALA se consideran ácidos grasos esenciales porque las células de mamíferos no pueden sintetizar estos ácidos grasos a partir de precursores más simples⁽⁷⁴⁾. El DHA posee una alta relevancia en el sistema nervioso, al conferir flexibilidad a las membranas neuronales, terminales axónicas y células de la retina. Los animales de laboratorio (roedores y primates) con deficiencias de ω -3 inducidas experimentalmente muestran déficits en la estructura de la retina, desarrollo de la agudeza visual y rendimiento cognitivo⁽⁷⁵⁾.

El cerebro tiene una composición única de ácidos grasos con altos niveles de palmitato, el ácido ω -6, PUFA, AA y DHA, pero niveles bajos de otros PUFA ω -3, especialmente EPA. También se presentan diferencias en el enriquecimiento de fosfolípidos: DHA y el ácido docosapentaenoico están predominantemente enriquecidos con fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, mientras que EPA aparece referiblemente esterificado al fosfatidilinositol⁽⁷⁶⁾. Los PUFA ω -3 pueden ser útiles para reducir la grasa hepática en pacientes obesos con NAFLD, además los estudios preclínicos en ratones han establecido que el DHA puede prevenir la NASH y la fibrosis asociada a NASH. Por otro lado, los cambios en el contenido hepático de EPA y DHA afectan significativamente a los lípidos oxidados derivados de PUFAs ω -3 y ω -6. Estos lípidos oxidados desempeñan un papel en la inflamación y afectarán el inicio y la progresión de NASH⁽⁷⁷⁾.

Está bien establecido que los mediadores de lípidos derivados de PUFAs ω -3 juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria. Estos mediadores derivados de enzimas son un grupo variado de formas oxigenadas de los PUFA ω -3 C20 y C22. Los mediadores lipídicos clásicos incluyen prostaglandinas (PGs) y leucotrienos (LTs), y se han identificado dos nuevas clases de mediadores estructuralmente distintos. Los primeros se denominan “pro-resolvin mediators” (SPM) y los segundos son oxo-derivados electrofílicos de ácidos grasos⁽⁷⁸⁾. Los mediadores lipídicos clásicos son un grupo variado de formas oxigenadas, con los derivados de los PUFAs C20, como EPA, llamados eicosanoides, mientras que los de C22 EPA y DHA son denominados docosanoides. La biosíntesis es catalizada por tres sistemas enzimáticos: ciclooxigenasa (COX) y subsecuentes sintasas, lipoxigenasas (LOX) y enzimas oxidasa de función mixta del CYP450. COX cataliza la oxigenación inicial de PUFA no esterificado, para producir prostaglandina H (PGH), un intermediario de vida corta, que se metaboliza adicionalmente a otras series de PGs, prostaciclina (PGI), tromboxanos (TXA), LT, lipoxinas (LX), y ácidos grasos hidroxí e hidroperoxi. Los vertebrados tienen dos isoformas principales de COX: COX-1 (expresión constitutiva y cumple con la regulación de proliferación de células normales y neoplásicas,) y COX-2 (media los procesos inflamatorios e interviene en la señalización por prostanoides)⁽⁷⁹⁾. Los SPM son una clase en

rápida expansión de moléculas autacoides involucradas en la resolución activa de la inflamación, se producen a través de las vías COX y LOX. La EPA produce resolvinas de la serie E (RvE), mientras que DHA produce docosanoides, como las protectinas, las resolvinas de la clase D (RvD) y las maresinas (MaR). Recientemente se han identificado mediadores análogos de las resolvinas de la serie D derivadas de DHA, protectinas y MaR de DHA, e incluyen RvDn-3 DHA, MaR1n-3 DHA y productos relacionados. PD1n-3 DHA y MaR-1n-3 DHA han sido sintetizados recientemente y demuestran potentes propiedades antiinflamatorias y pro resolutorias, con acciones comparables a las resolvinas derivadas de EPA y DHA en modelos murinos de inflamación aguda y leucocitos humanos⁽⁸⁰⁾.

Los mecanismos subyacentes a los efectos hepatoprotectores de los PUFA ω -3 no se conocen por completo, sin embargo, se ha demostrado que los PUFA ω -3 regulan positivamente la expresión de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y, en consecuencia, reducen la formación de aniones superóxido, peroxinitrito y radicales hidroxilos. Por otra parte, se ha encontrado que tienen la capacidad de prevenir la conversión del AA en los eicosanoides pro-inflamatorios a través de las vías de la COX-2 y 5-LOX compitiendo con el sustrato o inhibiendo la actividad de las enzimas generadoras de eicosanoides. Por último, se ha descubierto que los precursores de ácidos grasos ω -3 generan resolvinas y protegen los productos, que están implicados en la resolución de la inflamación y la esteatosis hepática⁽⁸¹⁾.

3.4.1 Maresina – 1 (MaR-1)

Los mediadores pro-resolventes derivados de ω -3 juegan un papel importante en el control de la inflamación y el estrés oxidativo. Estos mediadores (resolvinas y protectinas) se pueden bio-sintetizar a partir del EPA y el DHA. El DHA es un precursor bio-sintético de los SPM, entre los cuales se encuentra MaR-1. El proceso de síntesis de este compuesto no

está completamente dilucidado, sin embargo, existen algunos mecanismos propuestos. Como se muestra en la figura 5, el DHA en los macrófagos es oxigenado en su C14 por la enzima 12-LOX: extrae un átomo de hidrogeno del grupo metileno del C12 e inserta un oxigeno molecular en el C14 para formar 14S-hydroperoxy-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-docosahexaenoic acid (14-HpDHA)⁽⁸²⁾. Este HpDHA se convierte luego en 13S,14S-epóxido por la acción de la misma enzima después de una segunda extracción de hidrógeno del grupo metileno en C9⁽⁸³⁾. La conversión del 13S,14S-epóxido a 7R,14S-dihydroxydocosa-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-ácido hexaenoico (MaR-1) se realiza a través de una hidrólisis mediada por enzimas que convierten la geometría de doble enlace en la posición C8 de Z a E y en la posición C12 de Z a E, dando una geometría final alrededor de la región de trieno de MaR1 correspondiente a 8E,10E,12Z, así como también dirige la inserción de un grupo hidroxilo (proveniente de H₂O) en C7⁽⁸²⁾. En una ruta alterna, el 14-HpDHA puede sufrir un proceso de doble di-oxigenación, generando el compuesto 7S,14S-diHDHA⁽⁸²⁾. Por otro lado, el intermediario 14-HpDHA puede sufrir otra doble dioxigenación en el penúltimo carbono (ω -1), generando el ácido 14S,21R-dihydroxydocosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico⁽⁸⁴⁾.

3.4.1.1 Mecanismo de maresina a nivel hepático

El estrés oxidativo es un factor crítico para generar daño hepático. Los ROS son considerados un marcador importante de estrés oxidativo y su generación contribuye a la acumulación de peroxidos, que conduce a la necrosis celular y la lesión hepática⁽⁸⁵⁾. El proceso de peroxidación lipídica ocurre cuando se generan ROS procedente de la oxidación de los lípidos de las membranas celulares, lo que puede causar la elevación del ácido tiobarbitúrico (TBARS), lo que eventualmente lleva a un cambio en la estructura y función celular. La reducción del estrés oxidativo ha sido implicada con un papel importante en la reducción del daño hepático^(86, 87). Neutrófilos y NAPDH oxidasa juegan un rol clave en la producción de ROS y los niveles mieloperoxidasa (MPO) pueden reflejar el grado de infiltración de neutrófilos⁽⁸⁸⁾. La vía MAPK / NF κ B es importante en la inflamación, donde el estrés puede activar las MAPK dando lugar a la generación de ROS, la activación de la

translocación nuclear de NF- κ B puede aumentar la expresión de moléculas proinflamatorias tales como IL-1 β , TNF- α , COX-2 e iNOS y conduciendo al daño hepático⁽⁸⁹⁾. Mar-1 es capaz de: i) reducir los niveles de MPO en el tejido hepático, con la subsiguiente reducción de la infiltración y generación de neutrófilos y ROS respectivamente, generando indirectamente una reducción de los niveles de TBARS, ii) aumento de la capacidad antioxidante por parte de glutatión (GSH), GP-X, catalasa (CAT) y SOD, iii) inhibe significativamente la producción de varias citoquinas proinflamatorias que incluyen IL-6, IL-1 β , TNF- α y MCP-1 séricas, además promueve la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10, iv) inhibir la traslocación nuclear y fosforilación de NF - κ b y de MAPKs respectivamente⁽⁸⁹⁾.

3.4.1.2 Mecanismo de acción en otros tejidos

MaR1 es eficaz para mejorar múltiples etapas de la resolución de la inflamación después de una lesión de medula espinal. Estos incluyen: regulación a la baja de citoquinas pro-inflamatorias, silenciamiento de vías inflamatorias, reducción de los recuentos de neutrófilos y macrófagos, cambio en el fenotipo de los macrófagos y estimulación de la actividad fagocítica de los macrófagos. Los efectos biológicos inducidos por el tratamiento con MaR1 llevaron a una mejora significativa en la función locomotora y la protección contra el daño tisular secundario⁽⁹⁰⁾. MaR-1 puede reducir la expresión de NLRP3, caspasa-1, IL-1 β y la generación de ROS, los cuales son inducidos por niveles séricos elevados de glucosa en las células mesangiales glomerulares (GMCs por sus siglas en inglés); además, también se puede revertir el aumento de expresión de TGF- β 1 y fibronectina seguida de niveles elevados de glucosa en las GMC. Por lo anterior, MaR-1 posee un efecto protector en la nefropatía diabética al mitigar la fibrosis temprana e inflamación⁽⁹¹⁾.

3.5 Importancia Biomédica del estudio de terapias hepatoprotectoras.

La fibrosis hepática es un problema de salud pública que se traduce en morbilidad y mortalidad significativa. Cientos de miles de personas en el mundo sufren de cirrosis, en parte debido a la pandemia de la obesidad combinada con la alta incidencia de abuso de alcohol y la hepatitis viral. En Chile, se observa que de acuerdo a su etiología la cirrosis puede presentarse por medio VHB (con baja prevalencia de infección en el país), por VHC cuya prevalencia, según datos entregados por la Encuesta Nacional de Salud (ENS), fue de 0,01% en el periodo comprendido entre 2009 – 2010, sin embargo, no dejó de ser una causa importante de cirrosis y carcinoma humano. En el periodo de 1990 – 2007 se registraron 44.894 defunciones por cirrosis hepática, donde la tasa de mortalidad por cirrosis hepática para el periodo fue de 17 muertes/100.000 habitantes (superior a la observada en EEUU)⁽⁹²⁾.

Tomando en consideración estos datos, se destaca la importancia de la presente investigación, ya que un posible efecto hepatoprotector de MaR-1 podría ayudar a disminuir estas cifras a nivel país y mundial, es por esto que se propone como objetivo general estudiar el efecto de la administración de MaR-1 sobre progresión y reversión de la fibrosis hepática. Por otra parte, los resultados extraídos desde esta tesis serían un aporte a la ciencia, debido a que podrían entregar información sobre el mecanismo de acción y potencial rol hepatoprotector de MaR-1, escenarios que aún no han sido dilucidados.

4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: La administración de MaR-1 tiene efectos inhibidores sobre el daño hepático crónico inducido por dietilnitrosarina, lo que estaría asociado a la reparación y regeneración hepática.

Objetivo general: Evaluar el efecto de la administración de MaR-1 sobre la progresión y reversión de la fibrosis hepática inducido por DEN en ratas cepa Sprague-dawley.

- **Objetivo específico 1:** Determinación de los cambios anti-fibróticos mediados por MaR-1 mediante análisis por histología H&E.
- **Objetivo específico 2:** Determinación de los cambios en la regulación del ciclo celular mediante análisis del índice mitótico, niveles de caspasa-3 activa y ciclina D1.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales

Ratas macho cepa Sprague-Dawley (90-120 g) fueron obtenidas desde el Bioterio de la Universidad de Talca, Dirección de Investigación, Universidad de Talca. Los animales fueron criados y mantenidos en el Bioterio de la Univerdad de Talca, en una jaula con un máximo de 4 ejemplares. Fueron alojadas en una habitación con temperatura controlada con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, con aire acondicionado a 25 °C, Estas tuvieron acceso libre a la dieta comercial Champion S.A. y agua *ad libitum*. Durante el periodo de tratamiento se observó el comportamiento de las ratas, color de pelaje y color de las deposiciones, controlando que la alimentación fuera la adecuada y se masó a todos los animales a lo menos una vez a la semana para asegurar un adecuado crecimiento y generar ajuste de dosis mientras duró el tratamiento.

5.2 Modelo de fibrósis por dietilnitrosamina

La fibrosis hepática fue inducida mediante la inyección intraperitoneal (*i.p*) dietilnitrosamina (DEN) a una dosis de 70 mg/2 ml (diluido con NaCl 0,15 M) por Kg de peso corporal. Las inyecciones se administraron una vez por semana por un periodo de 4 semanas (28 días).

5.3 Grupos y controles

El control de fibrosis recibió DEN sin administración de MaR1. Desde el comienzo del experimento los grupos de tratamiento se inyectan dos veces a la semana con MaR-1 (70 ng/ MaR-1 por animal). Para el propósito de este estudio, los animales se asignarán aleatoriamente a uno de los siguientes grupos (n= 24 total):

- i. Grupo control: etanol 0,025% en solución salina (vehículo MaR-1) + NaCl 0,15M (vehículo DEN).
- ii. Grupo daño (DEN): 0,025% en solución salina (vehículo MaR-1) + DEN.
- iii. Grupo control de tratamiento (MaR-1 + veh): MaR1 + 0,15M NaCl (vehículo de DEN).
- iv. Grupo tratamiento (MaR-1 + DEN): MaR-1 + DEN.

5.4 Eutanasia

Los animales fueron anestesiados via inyección *i.p.* con una mezcla de anestésicos-sedantes (acepromacina 1ml/kg. Xilazina 3 mg/kg y ketamil 15-20 mg/kg peso vivo). Se verificó inconciencia mediante detección de reflejo pedal. Posteriormente se ubicaron sobre plataforma quirúrgica para roedores (homeotérmica) y se realizó una incisión del abdomen y tórax del animal (apertura de línea alba), con la finalidad de exponer el hígado y corazón, extrayéndose de 3 a 5 ml de sangre por punción cardiaca y retirando completamente el hígado, ambas maniobras generaron hipovolemia con hipotensión y muerte posterior del animal. Si durante el proceso el animal no mostró signos de sedación se administró un refuerzo de la anestesia (20 – 25% de la dosis original) para asegurar que el animal no sufra durante el proceso de extracción de la muestra. Una vez extraído el hígado este se cortó en diferentes porciones; las fracciones fueron almacenadas de la siguiente manera: i) frasco con

formalina al 10% y ii) tubo para almacenamiento a -80°C hasta experimentación. La sangre extraída por punción cardiaca se depositaron en un tubo sin anticoagulante y se dejó en reposo por lo menos 24 horas con la finalidad de que sedimente por gravedad y luego fue centrifugado a 4000 rpm durante 5 minutos, se extrajo el suero y fue almacenado a -20°C .

Todas las ratas recibieron atención humanitaria de conformidad con las directrices de la Universidad de Talca, los procedimientos de animales y protocolo cumplieron con declaración ética en este proyecto, la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, el cual fue aprobado por el comité de bioética CIEQUAL de la universidad de Talca.

5.5 Evaluación de la morfología hepática

Se utilizó microscopía óptica para analizar los cortes de hígado, fijados en formalina, incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina-eosina. Se tomaron al menos 8 muestras por cada grupo experimental y cada muestra correspondió al menos a 2 cortes de cada lóbulo isquemizado (lóbulos medios). Los cortes fueron analizados por un patólogo de forma ciega, siendo informados de acuerdo a la presencia de inflamación, necrosis y citoarquitectura del tejido, factores que se evaluaron en forma cualitativa, utilizando desde 1 a 3 cruces (+ a +++) y recuento manual del infiltrado de leucocitos. Se analizaron al menos 2 fotografías de cada muestra. Para la cuantificación histológica se utilizaron patrones de necrosis e inflamación, de acuerdo al score de Korourian⁽⁹³⁾, con la siguiente pauta:

- Para necrosis se consideraron los siguientes puntajes: hepatocitos necróticos ocasionales ($<1\%$) = 0; hepatocitos necróticos frecuentes (5-10 %) = 1; focos necróticos pequeños (10-20 hepatocitos) = 2; áreas extensas de necrosis (25 % de compromiso del área a estudiar) = 3.

5.6 Índice de actividad mitótica (MAI)

Se tomaron imágenes de venas centrales de los acinos hepáticos, en aumento 400 X, en los cuales se contó el número total de células y el total de células en proceso de mitosis por área de observación, con lo cual se calculó el porcentaje de células en mitosis. Para esto se utilizó un microscopio ACCU-SCOPE 3013 (EUA) en conjunto con el software ACCU-SCOPE Micrometrics.

5.7 Electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE):

Las proteínas en el extracto citosólico fueron separadas según el método descrito por Laemmli⁴⁷. Mediante preparación de geles separadores al 12 % (H₂O ultra pura, Acrilamida-Bisacrilamida, buffer Tris 0.5 M pH 8.8, SDS 10 %, persulfato de amonio 10 %, TEMED 10 %), una vez preparado el gel separador se adicionó rápidamente entre las placas de vidrio previamente montadas en estructura de moldeado y de sostén, sobre el gel se le adiciono 1 ml de isopropanol para evitar la entrada de oxígeno y la posterior formación de burbujas en el gel. Por otro lado, se realizó el gel concentrador 4 % (H₂O ultra-pura, Acrilamida-Bisacrilamida, buffer Tris 0,5 M pH 6.8, SDS 10 %, Persulfato de Amonio 10 %, 10 µl TEMED 10 %). Una vez solidificado el gel separador alrededor de 20 a 30 min a 20 °C se retiró el isopropanol y se le adicionó el gel concentrador además se posicionó la peineta para la formación de pocillos. Inmediatamente después de que solidificó el gel concentrador, se retiró cuidadosamente el peine para dejar los pocillos de carga descubiertos. El buffer de corrida contiene 3,03 g de Tris-Base, 14,4 g de glicina y 1g SDS ajustando el pH a 8,3 con HCL y aforado a 1L. Posteriormente, se posicionaron las placas en el marco de sujeción y

conjunto de electrodos y se vertió el Buffer. Para la preparación de las muestras, se adicionó el Buffer de carga 2X en la razón 1:1 muestra: Buffer y buffer 1X para otorgar un volumen final. Una vez preparadas las muestras se desnaturaron a 95°C por 10 min y se cargaron en cada pocillo correspondiente, por otro lado, se cargaron 3 µl de marcador de peso molecular preteñido (Benchmark Protein Ladder, Gibco BRL, Life technologies, USA). La electroforesis se realizó en una cámara Protean II Mini gel (Bio- Rad Laboratories, Hercules, USA) durante 15 min a 70 volts con el objetivo de que las proteínas se agrupen en el gel concentrador y luego se cambió a 100 volts por un tiempo de 1 hr y 30 min o hasta que se observe una buena resolución del gel y una migración adecuada hasta la parte inferior del gel. Una vez terminada la corrida se desprendió el gel de las placas, cortando y desechando el gel separador del concentrador. La tinción se realizó con el colorante azul de Comassie R250 (0,25 g de colorante Azul de Comassie R250, 225 ml de Metanol, 45 ml de Ácido Acético con aforo a 500 ml). El gel se dejó en inmersión por al menos 12 horas en la solución colorante. Posterior a la tinción se realizó la decoloración del gel con solución de lavado (200 ml de Metanol, 150 ml Ácido Acético aforado a 650 ml). La secuencia de lavado realizada correspondió a 1 lavado por 10 min y repeticiones de lavados de 30 min con agitación constante hasta obtener un gel de fondo transparente.

5.8 Western Blot

Una vez realizada la corrida y separación de proteínas se procedió con la técnica de western blot, en donde las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, utilizando el sistema Mini Protean (BIO-Rad Laboratories) a 300 mA y 70 volt por 2 horas, en tampón de transferencia (Tis-base 25 mM, glicina 150 mM, metanol al 10 %). Finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó con leche (Svelty®, Nestle Vevey, Suiza) al 5% p/v en TBS-T durante 2 horas a temperatura ambiente, y se lavó 3 veces por 20 min con tampón TBS-Tween 20 al 0,1 %. Luego del lavado la membrana se incubó con el anticuerpo

primario correspondiente: i) Active Caspasa 3 (1:100); ii) Ciclina D1(1:500), y GAPDH (1:5000), se dejaron incubando toda la noche a 4 °C (Merck Millipore, Alemania).

Luego de la incubación la membrana se lavó 3 veces por 20 min con TBS-Tween 20 al 0,1 % y posteriormente se incubó con un segundo anticuerpo, anti-ratón o anti- conejo (Según indicación del anticuerpo primario, Merck Millipore), durante al menos 1 hr 30 min y se lavó nuevamente 3 veces con TBS-Tween 20 por 20 min. Como sistema de detección se utilizó el kit quimioluminiscente “SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent” (Pierce Biotechnology Inc. Rockford, USA), utilizando una solución luminol/enhancer y solución peróxido estable 1:1, y finalmente la membrana se expuso en foto documentador Omega Lum G (Aplegen, Gel Company, Ca, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 Migración electroforética de extractos proteicos

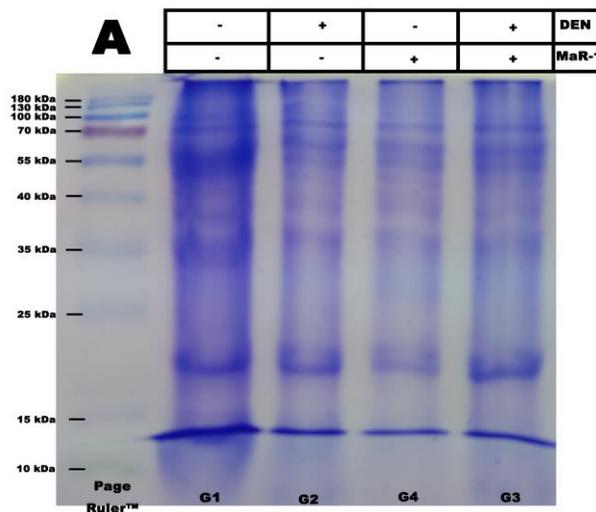


Figura 4: Tinción de azul de Coomassie de muestras corrida en geles SDS-PAGE. Electroforesis de extractos proteicos procedente de tejido hepático de ratas. Control (G1), DEN (G2), MaR-1 (G4) y DEN/MaR-1 (G3).

Se analizó la concentración e integridad de las proteínas mediante SDS-PAGE seguido de técnica de tinción de geles mediante azul de coomassie. Se observa que la concentración es en apariencia mayor en el grupo control por lo que se procedió en los siguientes geles a estandarizar la carga total por pocillo a 50 ug de proteínas por carril. Por otra parte, la integridad de las proteínas fue óptima a los pesos moleculares donde se planteó hacer los posteriores western blots (para ciclina D1 el peso molecular es de 30 KDa y para caspasa 3 activa el peso molecular es de 17 KDa).

6.2 Cuantificación de la expresión proteica mediante Western blotting

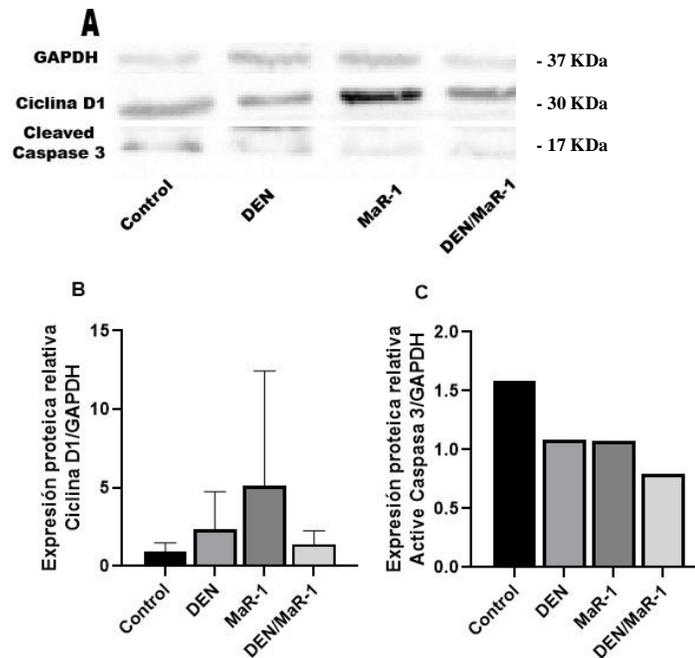


Figura 5: Efecto de MaR-1 sobre los niveles de caspasa-3 activa y ciclina D1 en tejido hepático de ratas sometidas a fibrosis: control, DEN, MaR-1 y DEN/MaR-1. (a) Detección mediante Western blotting de la expresión proteica de caspasa 3 y ciclina D1, normalizados con GAPDH. Se analizaron y cuantificó (B - C) al menos 4 animales por grupo experimental, considerando una SEM ± 1 SD.

Determinación de la expresión de las proteínas ciclina D1 y caspasa-3 activa mediante técnica de western blotting (figura 5). (Figura 5.A) Analisis de inmunotransferencia, en donde se observa un aumento del marcaje de ciclina D1 en el grupo MaR-1, lo cual se ve reflejado en la cuantificación de esta proteína (figura 5.B), sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos. A nivel de caspasa-3 activa se observa una correlación entre la imagen del western blot y su cuantificación (figura 5.A y 5.C), sin embargo, no se observan diferencias entre los grupos, si una disminución entre el grupo

DEN/MaR-1 y grupo control, pero no se pudo determinar estadísticamente, atribuible a una contaminación por parte de los reactivos de trabajo por elementos fúngicos, obteniendo resultados no interpretables en la mayoría de los 25 ensayos realizados (tanto para caspasa-3 activa y ciclina D1), por lo que se expone el valor de una determinación por grupo experimental.

6.3 Análisis histopatológico de cortes hepáticos

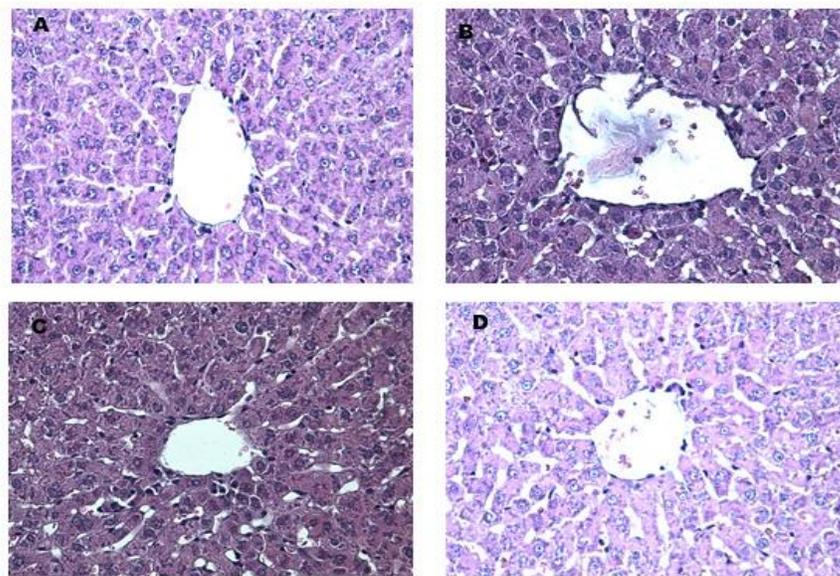


Figura 6: Microfotografías representativas de parénquima hepático, teñidos con H&E, provenientes de grupo control (A), grupo DEN (B), grupo control MaR-1 (C) y grupo DEN/MaR-1 (D). Aumento de 400 X mediante microscopía óptica. En todas las microfotografías se observa la vena central al centro de cada imagen.

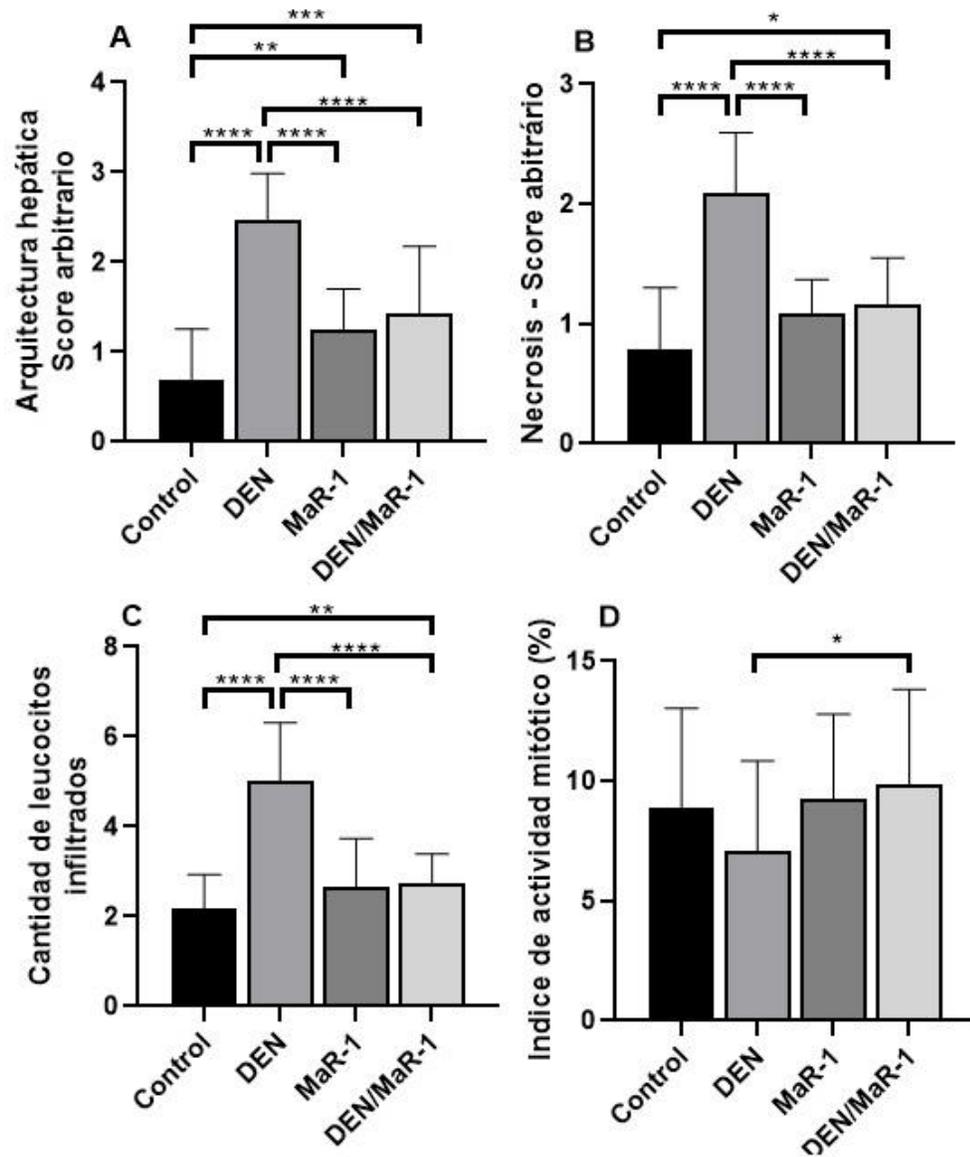


Figura 7: Análisis de la cito-arquitectura hepática mediante: (A) arquitectura hepática; (B) necrosis; (C) infiltrado inflamatorio; y (D) Índice de actividad mitótica. Para analizar estos datos se utilizaron unidades arbitrarias según la escala Korourian⁽⁹⁸⁾. Se analizaron al menos 4 animales por grupo experimental, considerando una SEM \pm 1 SD. * corresponde a una significancia de *p value* < 0,05, ** corresponde a una significancia de *p value* < 0,01, ***corresponde a una significancia de *p value* < 0,001 y **** corresponde a una significancia de *p value* < 0,0001.

El estudio histopatológico fue realizado en cortes de hígado para observar cualquier deformidad en la estructura hepática. Los grupos controles presentaron una organización parenquimatosa normal (Imagen 6.A), sin embargo, el grupo tratado con DEN presentó una infiltración de linfocitos y una necrosis masiva en la región perivenular y región media (inter venas centrales) (Imagen 6.B) en comparación con el grupo control, grupo MaR-1 (Imagen 6.C) y grupo DEN/MaR-1 (Imagen 6.D).

En base a la cito-arquitectura de los grupos (figura 7.A), la valorización del grupo DEN fue 3,6 veces mayor que el grupo control, 2 veces mayor que el grupo MaR-1 y 1,7 veces mayor que el grupo DEN/MaR-1, por otro lado, los niveles del grupo MaR-1 y DEN/MaR-1 son 1,8 y 2,1 veces mayor en comparación con el grupo control respectivamente y no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

En base a la necrosis (Figura 7.B) los niveles del grupo DEN fueron 2,7 veces mayor que el grupo control, 1,9 veces mayor que el grupo MaR-1 y 1,8 veces mayor que el grupo DEN/MaR-1, por otro lado, los niveles del grupo DEN/MaR-1 fueron 1,5 veces mayor que el grupo control, mientras que no presentó diferencias estadísticamente significativas con el grupo MaR-1, además MaR-1 no tampoco presentó diferencias estadísticamente significativas con el grupo control.

Respecto a la inflamación (figura 7.C) los niveles del grupo DEN fueron 2,3 veces mayor que el grupo control, 1,9 veces mayor que el grupo MaR-1 y 1,8 veces mayor que el grupo DEN/MaR-1, por otro lado, los niveles del grupo MaR-1 no presentaron diferencias

estadísticamente significativas con el grupo control y DEN/MaR-1, sin embargo, el grupo DEN/MaR-1 presentó niveles 1,3 veces mayores que el grupo control.

Respecto al MAI (Figura 7.D) solo los niveles del grupo DEN/MaR-1 presentaron niveles 1,4 veces mayor que el grupo DEN, mientras que el resto de los grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

7 DISCUSIÓN

En el hígado, el daño por fibrosis constituye un problema clínico importante cuyo pronóstico no siempre es favorable. La fibrosis hepática es un proceso reversible de reparación de heridas en respuesta a una lesión hepática. Esta se caracteriza por la deposición de ECM producida por células fibrogénicas o MF activados, lo cual si persiste en el tiempo deriva en la acumulación de ECM y reemplazo del parénquima hepático, perdiéndose la funcionalidad de estos⁽²⁵⁾. La plasticidad de las células hepáticas permite mantener el hígado en un estado de homeostasis mediante la replicación de estas, además poseen la capacidad reparar la mayoría de lesiones a nivel de parénquima hepático de esta forma, en donde los hepatocitos presentan una actividad replicativa baja a diferencia del resto de la población celular hepática⁽⁹⁴⁾.

MaR-1 es un derivado de DHA recientemente descubierto, el cual tendría implicancias terapéuticas sobre el daño hepático. MaR-1 protege las células hepáticas de la injuria mediante la prevención y/o resolución de la hipoxia y lipotoxicidad del retículo endoplásmico en pacientes con NAFLD, es más, la administración de MaR-1 previo a la adición de palmitato resulta en una vuelta a la homeostasia y reducción de las células apoptóticas e incrementa la fagocitosis, signo cardinal de la resolución activa de la inflamación⁽⁹⁵⁾. Previamente, LaIglesia y cols, probaron que MaR-1 poseía acciones antiesteatósicas mediante su capacidad de disminuir la expresión proteica de enzimas claves en la lipogénesis, sobreexpresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos y aumento de la autofagia. Junto a lo anterior, MaR-1 induce el fenotipo M2 en macrófagos en modelo de NASH, mediante el incremento del ratio CD206⁺/CD80⁺ y aumento de los marcadores genéticos de M2. Este cambio de M1 a M2 mejora los síntomas de la enfermedad hepática por disminución del peso total, baja de triglicéridos, y disminución de depósitos de

colágeno y α -SMA⁽⁹⁶⁾. Lo anterior es importante dado que MaR-1 sería un agente hepatoprotector.

El desarrollo de fibrosis avanzada y particularmente la cirrosis está asociada con complicaciones significativas y potencialmente mortales, siendo el único tratamiento disponible el trasplante hepático. Sin embargo, el trasplante no siempre es posible, debido a la limitada disponibilidad de órganos y la presencia de co-morbilidades contraindicantes⁽⁹⁷⁾. El estrés oxidativo y la inflamación son ejes esenciales en el daño crónico hepático. La producción de ROS, generado preferentemente por las KCs y hepatocitos, induce la proliferación, transdiferenciación y síntesis de colágeno por parte de las HSCs, contribuyendo al establecimiento de la fibrosis⁽⁹⁸⁾. En la literatura ha sido evidenciado que DEN es capaz de inducir la muerte de los hepatocitos y estimular la proliferación de estos solo en etapas tardías de fibrosis⁽⁹⁹⁾. Dentro de los mecanismos conocidos y propuestos de MaR-1, destaca su capacidad para disminuir la formación de ROS y consecutivamente la reducción de los procesos de lipo-peroxidación, mediante la inhibición de la MPO, con la subsecuente reducción del infiltrado de neutrófilos e inhibición de la actividad de NADPH oxidasa⁽⁸⁹⁾. Por otra parte se han determinado que una variedad de estímulos como factores de crecimiento, citoquinas y ROS pueden activar la vía de NF- κ B⁽¹⁰⁰⁾, lo cual deriva en la translocación de NF- κ B al núcleo, activando la transcripción de ciertos genes de citoquinas pro-inflamatorias⁽¹⁰¹⁾ como IL-6, IL-1 β y TNF- α ⁽¹⁰²⁾, siendo aquí en donde MaR-1 es capaz de inhibir la translocación nuclear y fosforilación de NF- κ B y de MAPKs respectivamente⁽¹⁰³⁾, evitando la transcripción de genes encargados de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias., además de que posee un efecto hepato-protector al reducir el estrés oxidativo⁽⁸⁹⁾. En el presente estudio, mediante el análisis histológico, se evidenciaron disminuciones significativas en los niveles de necrosis, inflamación y alteración de la arquitectura hepática en los tejidos tratados con DEN y MaR-1, lo anterior en consideración que DEN produjo un deterioro marcado de la citoarquitectura, generando pérdidas de los inusoides y en algunos casos también colapso de la vena central. Lo anterior ratificaría el efecto protector de MaR-1 sobre el daño inducido por DEN⁽⁷²⁾, lo cual estaría relacionado con su capacidad de disminuir los niveles de ROS generados por este modelo de estudio,

aminorando la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias por la vía de señalización de NF- κ B, lo que disminuye los niveles de TGF- β , mediante la inactivación de las HSCs activas y por ende la generación de ECM, manteniendo la integridad y funcionalidad del parénquima hepático, además la disminución de ROS y de leucocitos infiltrantes disminuiría significativamente el daño ocasionado al micro-ambiente celular hepático. Cabe destacar que debido a las limitaciones de tiempo del presente estudio no fue posible evidenciar variaciones cuantitativas en los niveles de ROS y/o de los mecanismos involucrados en su generación, lo cual sería ideal para futuros estudios, de forma que se pueda identificar que especies se ven afectadas en comparación con el resto, permitiendo esbozar un posible mecanismo de acción de MaR-1.

La infiltración leucocitaria generada en el daño del tejido hepático gatilla la producción de ROS⁽⁶⁰⁾, con la subsecuente generación de TBARS, llevando a un cambio en la estructura y función celular⁽⁸⁷⁾. Los eventos anteriores son capaces de activar la vía de apoptosis celular intrínseca (daño directo sobre la estructura celular con la posterior permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la posterior liberación de su contenido) y/o la vía extrínseca (unión de ligandos a receptores de muerte celular, generando cascadas de señalización interna), con la final escisión y activación de caspasa-3^(40, 41, 45). La cuantificación de la expresión de la proteínas caspas-3 activa se realizó de acuerdo a los protocolos mencionados, sin embargo, no se encontraron diferencias con significancia estadísticas entre estos, lo cual difiere de lo estipulado en literatura, en relación al daño inducido por DEN, debiéndose encontrar elevados niveles de caspasa-3 activa, ya sea por la activación de la vía extrínseca o intrínseca, siendo estos niveles explicados en primera instancia por contaminación cruzada durante el desarrollo de las técnicas, dificultando la lectura e interpretación de los resultados obtenidos (además de la imposibilidad de recolectar la cantidad mínima ideal de determinaciones para el análisis estadístico), sin embargo también cabe la posibilidad de que los niveles obtenidos sean producto de la necrosis del tejido. El modelo de daño mediado por DEN posee la capacidad de generar necrosis severa en los tejidos⁽⁷²⁾, lo cual deriva en una destrucción rápida de las células, sin dejar posibilidad alguna para el inicio de los procesos de recepción, señalización y activación de una respuesta

efectora por la vía apoptótica⁽¹⁰⁴⁾. Para poder descartar el efecto del proceso de necrosis sobre la expresión de caspasa-3 activa, se propone, para estudios futuros, un análisis por citometría de flujo, mediante el uso de la tinción de anexina V en conjunto con yoduro de propidio, los cuales permiten diferenciar células viables (carentes de ambas tinciones), apoptóticas (presencia de anexina V) y necróticas (presencia de ambas tinciones)⁽¹⁰⁵⁾.

La proliferación celular es regulada por el ciclo celular⁽¹⁰⁶⁾, como se evidencia con las HSCs, en donde la progresión es llevada a cabo por los complejos de ciclina/CDK. El complejo de ciclina/CDK4/6 promueve la transición del estado G1 a la fase S del ciclo celular, permitiendo la proliferación de las HSCs activadas⁽¹⁰⁷⁾. Varios autores han evidenciado la acción de mitógenos sobre el tejido hepático durante la fibrosis, especialmente sobre las HSCs: PDGF⁽³¹⁾, TGF- β ⁽¹⁰⁸⁾, entre otros, cuyas rutas de activación están mediadas por la vía de las MAPKs⁽⁸⁹⁾. También se ha evidenciado que la activación de ciclina D1 estaría potenciada en base a los niveles de ROS, estas moléculas actuarían directamente sobre las vías de señalización de las MAPKs⁽¹⁰⁰⁾ lo cual generaría la expresión de ciclina D1⁽⁵¹⁾. La expresión de ciclina D1 se ha visto aumentada en ratas tratadas con DEN⁽¹⁰⁹⁾ lo que se relacionaría con un aumento de la vía de β -catenina y por ende de Wnt (señal relacionada con la diferenciación y proliferación celular). Existen estudios de MaR-1 sobre la especie *planaria* que han dilucidado las capacidades de esta molecular para estimular los procesos de replicación y regeneración celular⁽¹¹⁰⁾. En el presente estudio, el análisis histológico del MAI evidenció un aumento de la división celular en ratas tratadas con DEN/MaR-1 al compararlas con el grupo DEN, lo cual permite establecer la existencia de una posible capacidad pro-estimulante de la división celular por MaR-1, lo cual se relacionaría con la capacidad de esta molecular de restablecer el tejido que ha sido expuesto a un daño estructural, desconociéndose el mecanismo involucrado en este proceso. Por otra parte, los niveles de expresión de ciclina D1 no presentaron diferencias con significancia estadística entre los grupos, lo cual discrepa con lo estipulado en la literatura, posiblemente atribuible a la acción de los procesos de necrosis en el tejido⁽⁷²⁾. Si bien existen varias familias de ciclinas que intervienen en el ciclo celular⁽⁵⁰⁾, hasta la fecha solo se han estudiado las familias E y D

en tejido hepático^(111, 112), lo cual no descarta la posibilidad de la participación de la familia E en la replicación hepática, situación que sería importante valorar en un futuro experimental.

Para clarificar la actividad pro-regenerativa conferida por MaR-1 a las células del microambiente hepático, es prudente realizar a futuro técnicas que permitan diferenciar a las HSCs de los hepatocitos en división, descartando variaciones a nivel histológico (MAI) producto de la división de las HSCs ocurrida naturalmente durante los procesos de fibrosis. Para este fin, se recomienda el uso de tinciones histológicas más específicas que permitan identificar a los filamentos α -SMA de las HSCs⁽¹¹³⁾ y la proteína Ki-67 para evidenciar las fases del ciclo celular⁽¹¹⁴⁾, utilizadas en conjunto para la diferenciación propuesta.

8 CONCLUSIONES

Mediante el presente trabajo, fue posible poner en evidencia los efectos de MaR-1 propuestos en la literatura, contrastando estos con lo obtenido experimentalmente. Los resultados obtenidos no discreparon en gran medida según lo estipulado. MaR-1 presentó efecto hepato-protectores, sin embargo, no se pudo establecer un efecto pro-regenerativo debido a la incongruencia de datos. La causa más probable atribuible a estas discrepancias radica en la capacidad del DEN de generar necrosis severa, además de los problemas de ejecución producto de contaminación de reactivos. Para poder verificar y/o refutar estas aseveraciones, es necesario la evaluación con estudios posteriores, buscando esclarecer las incongruencias anteriormente descritas.

9 BIBLIOGRAFIA

1. Wang S, Kaufman RJ. How does protein misfolding in the endoplasmic reticulum affect lipid metabolism in the liver? *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(2):125-32.
2. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin North Am*. 2010;90(4):643-53.
3. Brunt EM, Gouw AS, Hubscher SG, Tiniakos DG, Bedossa P, Burt AD, et al. Pathology of the liver sinusoids. *Histopathology*. 2014;64(7):907-20.
4. Ferri D, Moro L, Mastrodonato M, Capuano F, Marra E, Liquori GE, et al. Ultrastructural zonal heterogeneity of hepatocytes and mitochondria within the hepatic acinus during liver regeneration after partial hepatectomy. *Biol Cell*. 2005;97(4):277-88.
5. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. *Clinically Oriented Anatomy: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins*; 2013.
6. Larkin AL, Rodrigues RR, Murali TM, Rajagopalan P. Designing a multicellular organotypic 3D liver model with a detachable, nanoscale polymeric Space of Disse. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19(11):875-84.
7. Katz NR. Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *J Nutr*. 1992;122(3 Suppl):843-9.
8. Rezania V, Coombe D, Tuszynski JA. A physiologically-based flow network model for hepatic drug elimination III: 2D/3D DLA lobule models. *Theor Biol Med Model*. 2016;13:9.
9. Beath SV. Hepatic function and physiology in the newborn. *Semin Neonatol*. 2003;8(5):337-46.
10. Villegas-Serrano EY, Aguilar-Vega L, Pérez-Armendáriz EM, Zurabian R. Linajes madurativos de las células que regeneran al hígado. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*. 2017;60:5-10.
11. Hellerbrand C. Hepatic stellate cells--the pericytes in the liver. *Pflugers Arch*. 2013;465(6):775-8.
12. Ichikawa S, Mucida D, Tyznik AJ, Kronenberg M, Cheroutre H. Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders. *J Immunol*. 2011;186(10):5549-55.
13. Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci*. 2002;7:d1899-914.
14. Wang F, Liu S, Du T, Chen H, Li Z, Yan J. NF- κ B inhibition alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via suppression of activated hepatic stellate cells. *Experimental and therapeutic medicine*. 2014;8(1):95-9.
15. Croft M, Dubey C. Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. (1040-8401 (Print)).
16. Vinas O, Bataller R Fau - Sancho-Bru P, Sancho-Bru P Fau - Gines P, Gines P Fau - Berenguer C, Berenguer C Fau - Enrich C, Enrich C Fau - Nicolas JM, et al. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. (0270-9139 (Print)).
17. Harding CV. Class I MHC presentation of exogenous antigens. (0271-9142 (Print)).
18. Villadangos JA. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. (0161-5890 (Print)).
19. Ramprasad MP, Terpstra V Fau - Kondratenko N, Kondratenko N Fau - Quehenberger O, Quehenberger O Fau - Steinberg D, Steinberg D. Cell surface expression of mouse macrophage mannose receptor and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. (0027-8424 (Print)).
20. Naito M, Hasegawa G, Takahashi K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech*. 1997;39(4):350-64.

21. Fox ES, Thomas P, Broitman SA. Comparative studies of endotoxin uptake by isolated rat Kupffer and peritoneal cells. *Infect Immun*. 1987;55(12):2962-6.
22. López-Navarrete G, Ramos-Martínez E, Suárez-Álvarez K, Aguirre-García J, Ledezma-Soto Y, León-Cabrera S, et al. Th2-associated alternative Kupffer cell activation promotes liver fibrosis without inducing local inflammation. *Int J Biol Sci*. 2011;7(9):1273-86.
23. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):953-64.
24. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol*. 2013;3(2):785-97.
25. Kim JH, Lee S, Lee MY, Shin HK. Therapeutic effect of Soshiho-tang, a traditional herbal formula, on liver fibrosis or cirrhosis in animal models: a systematic review and meta-analysis. *J Ethnopharmacol*. 2014;154(1):1-16.
26. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*. 2001;21(3):351-72.
27. Guo J, Friedman SL. Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*. 2007;27(4):413-26.
28. Kisseleva T, Brenner DA. Fibrogenesis of parenchymal organs. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5(3):338-42.
29. Cohen-Naftaly M, Friedman SL. Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2011;4(6):391-417.
30. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7312-24.
31. Martin IV, Borkham-Kamphorst E, Zok S, van Roeyen CR, Eriksson U, Boor P, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-C neutralization reveals differential roles of PDGF receptors in liver and kidney fibrosis. *Am J Pathol*. 2013;182(1):107-17.
32. Gieling RG, Wallace K, Han YP. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(6):G1324-31.
33. Szlosarek PW, Balkwill FR. Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol*. 2003;4(9):565-73.
34. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death And Differentiation*. 1999;6:99.
35. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281(5381):1312-6.
36. Guerrero AD, Chen M, Wang J. Delineation of the caspase-9 signaling cascade. *Apoptosis*. 2008;13(1):177-86.
37. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(11):897-907.
38. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276(10):7320-6.
39. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008;27(48):6194-206.
40. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*. 1993;74(5):845-53.
41. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000;407(6805):789-95.
42. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007;87(1):99-163.
43. Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, et al. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood*. 2005;106(13):4131-8.
44. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2665-72.

45. Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol.* 2002;71(6):907-20.
46. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998;391(6662):43-50.
47. Hanus J, Kalinowska-Herok M, Widlak P. The major apoptotic endonuclease DFF40/CAD is a deoxyribose-specific and double-strand-specific enzyme. *Apoptosis.* 2008;13(3):377-82.
48. Agarwal A, Mahfouz RZ, Sharma RK, Sarkar O, Mangrola D, Mathur PP. Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:143.
49. Pietras EM, Warr MR, Passegué E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *The Journal of Cell Biology.* 2011;195(5):709-20.
50. Musgrove EA. Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth Factors.* 2006;24(1):13-9.
51. Albanese C, Johnson J, Watanabe G, Eklund N, Vu D, Arnold A, et al. Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem.* 1995;270(40):23589-97.
52. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(3):153-66.
53. Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 2004;18(22):2699-711.
54. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996;274(5293):1672-7.
55. Ramos-García P, Gil-Montoya JA, Scully C, Ayén A, González-Ruiz L, Navarro-Triviño FJ, et al. An update on the implications of cyclin D1 in oral carcinogenesis. *Oral Dis.* 2017;23(7):897-912.
56. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J Clin Pathol.* 1978;31(5):395-414.
57. Cholongitas E, Quaglia A, Samonakis D, Senzolo M, Triantos C, Patch D, et al. Transjugular liver biopsy: how good is it for accurate histological interpretation? *Gut.* 2006;55(12):1789-94.
58. Pinzani M. Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol.* 1999;21(4):475-90.
59. Arriazu E, Ruiz de Galarreta M, Cubero FJ, Varela-Rey M, Pérez de Obanos MP, Leung TM, et al. Extracellular matrix and liver disease. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21(7):1078-97.
60. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology.* 2004;39(2):273-8.
61. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation.* 2005;115(2):209-18.
62. Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol.* 2000;81(2):145-57.
63. Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology.* 1999;30(1):203-8.
64. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 1996;270(5):G798-G803.
65. Hebbard L, George J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8(1):35-44.
66. Tag CG, Sauer-Lehnen S, Weiskirchen S, Borkham-Kamphorst E, Tolba RH, Tacke F, et al. Bile duct ligation in mice: induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis. *J Vis Exp.* 2015(96).
67. Pérez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology.* 1983;3(1):112-20.
68. Tolba R, Kraus T, Liedtke C, Schwarz M, Weiskirchen R. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Lab Anim.* 2015;49(1 Suppl):59-69.

69. Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol*. 2009;90(4):367-86.
70. Magee PN, Farber E. Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat-liver nucleic acids by dimethylnitrosamine *in vivo*. *Biochemical Journal*. 1962;83(1):114.
71. Kolaja KL, Klaunig JE. Vitamin E Modulation of Hepatic Focal Lesion Growth in Mice1. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997;143(2):380-7.
72. George J, Rao KR, Stern R, Chandrakasan G. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. *Toxicology*. 2001;156(2-3):129-38.
73. Grosso G, Galvano F, Marventano S, Malaguarnera M, Bucolo C, Drago F, et al. Omega-3 fatty acids and depression: scientific evidence and biological mechanisms. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:313570.
74. Din JN, Newby DE, Flapan AD. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease--fishing for a natural treatment. *BMJ*. 2004;328(7430):30-5.
75. Kidd PM. Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. *Altern Med Rev*. 2007;12(3):207-27.
76. Chen CT, Liu Z, Ouellet M, Calon F, Bazinet RP. Rapid beta-oxidation of eicosapentaenoic acid in mouse brain: an in situ study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009;80(2-3):157-63.
77. Jump DB, Depner CM, Tripathy S, Lytle KA. Potential for dietary ω -3 fatty acids to prevent nonalcoholic fatty liver disease and reduce the risk of primary liver cancer. *Adv Nutr*. 2015;6(6):694-702.
78. Cipollina C, Salvatore SR, Muldoon MF, Freeman BA, Schopfer FJ. Generation and dietary modulation of anti-inflammatory electrophilic omega-3 fatty acid derivatives. *PLoS One*. 2014;9(4):e94836.
79. Kulmacz RJ, van der Donk WA, Tsai AL. Comparison of the properties of prostaglandin H synthase-1 and -2. *Prog Lipid Res*. 2003;42(5):377-404.
80. Balas L, Guichardant M, Durand T, Lagarde M. Confusion between protectin D1 (PD1) and its isomer protectin DX (PDX). An overview on the dihydroxy-docosatrienes described to date. *Biochimie*. 2014;99:1-7.
81. Shaaban AA, Shaker ME, Zalata KR, El-kashef HA, Ibrahim TM. Modulation of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress, injury and fibrosis by olmesartan and omega-3. *Chem Biol Interact*. 2014;207:81-91.
82. Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, et al. Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J Exp Med*. 2009;206(1):15-23.
83. Dalli J, Zhu M, Vlasenko NA, Deng B, Haeggström JZ, Petasis NA, et al. The novel 13S,14S-epoxy-maresin is converted by human macrophages to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), and shifts macrophage phenotype. *FASEB J*. 2013;27(7):2573-83.
84. Lu Y, Tian H, Hong S. Novel 14,21-dihydroxy-docosahexaenoic acids: structures, formation pathways, and enhancement of wound healing. *J Lipid Res*. 2010;51(5):923-32.
85. Hu L, Li L, Xu D, Xia X, Pi R, Wang W, et al. Protective effects of neohesperidin dihydrochalcone against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in vivo and in vitro. *Chem Biol Interact*. 2014;213:51-9.
86. Zhang F, Wang X, Qiu X, Wang J, Fang H, Wang Z, et al. The protective effect of Esculentoside A on experimental acute liver injury in mice. *PLoS One*. 2014;9(11):e113107.
87. Zhang H, Yu CH, Jiang YP, Peng C, He K, Tang JY, et al. Protective effects of polydatin from *Polygonum cuspidatum* against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *PLoS One*. 2012;7(9):e46574.

88. Marcon R, Bento AF, Dutra RC, Bicca MA, Leite DF, Calixto JB. Maresin 1, a proresolving lipid mediator derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids, exerts protective actions in murine models of colitis. *J Immunol.* 2013;191(8):4288-98.
89. Li R, Wang Y, Zhao E, Wu K, Li W, Shi L, et al. Maresin 1, a Proresolving Lipid Mediator, Mitigates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:9203716.
90. Francos-Quijorna I, Santos-Nogueira E, Gronert K, Sullivan AB, Kopp MA, Brommer B, et al. Maresin 1 Promotes Inflammatory Resolution, Neuroprotection, and Functional Neurological Recovery After Spinal Cord Injury. *J Neurosci.* 2017;37(48):11731-43.
91. Tang S, Gao C, Long Y, Huang W, Chen J, Fan F, et al. Maresin 1 Mitigates High Glucose-Induced Mouse Glomerular Mesangial Cell Injury by Inhibiting Inflammation and Fibrosis. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:2438247.
92. ALONSO FT, GARMENDIA ML, DE AGUIRRE M, SEARLE J. Análisis de la tendencia de la mortalidad por cirrosis hepática en Chile: Años 1990 a 2007. *Revista médica de Chile.* 2010;138:1253-8.
93. Korourian S, Hakkak R, Ronis MJ, Shelnut SR, Waldron J, Ingelman-Sundberg M, et al. Diet and risk of ethanol-induced hepatotoxicity: carbohydrate-fat relationships in rats. *Toxicol Sci.* 1999;47(1):110-7.
94. Stanger BZ. Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver. *Annu Rev Physiol.* 2015;77:179-200.
95. Rius B, Duran-Güell M, Flores-Costa R, López-Vicario C, Lopategi A, Alcaraz-Quiles J, et al. The specialized proresolving lipid mediator maresin 1 protects hepatocytes from lipotoxic and hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress. *FASEB J.* 2017;31(12):5384-98.
96. Laiglesia LM, Lorente-Cebrián S, Martínez-Fernández L, Sáinz N, Prieto-Hontoria PL, Burrell MA, et al. Maresin 1 mitigates liver steatosis in ob/ob and diet-induced obese mice. *Int J Obes (Lond).* 2018;42(3):572-9.
97. Ismail MH, Pinzani M. Reversal of hepatic fibrosis: pathophysiological basis of antifibrotic therapies. *Hepat Med.* 2011;3:69-80.
98. Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology.* 2002;35(1):62-73.
99. Başaran-Küçükgergin C, Bingül I, Tekkeşin MS, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Effects of carnosine, taurine, and betaine pretreatments on diethylnitrosamine-induced oxidative stress and tissue injury in rat liver. *Toxicol Ind Health.* 2016;32(8):1405-13.
100. Ikeda Y, Murakami A, Ohigashi H. Ursolic acid promotes the release of macrophage migration inhibitory factor via ERK2 activation in resting mouse macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(10):1497-505.
101. Selvaraj V, Nepal N, Rogers S, Manne ND, Arvapalli R, Rice KM, et al. Inhibition of MAP kinase/NF- κ B mediated signaling and attenuation of lipopolysaccharide induced severe sepsis by cerium oxide nanoparticles. *Biomaterials.* 2015;59:160-71.
102. Wang S, Liu C, Pan S, Miao Q, Xue J, Xun J, et al. Deferoxamine attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and protects against endotoxic shock in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;465(2):305-11.
103. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature.* 2014;510:92.
104. Schworer SA, Smirnova II, Kurbatova I, Bagina U, Churova M, Fowler T, et al. Toll-like receptor-mediated down-regulation of the deubiquitinase cylindromatosis (CYLD) protects macrophages from necroptosis in wild-derived mice. *J Biol Chem.* 2014;289(20):14422-33.
105. Kabakov AE, Gabai VL. Cell Death and Survival Assays. *Methods Mol Biol.* 2018;1709:107-27.

106. Agarwal R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(8):1051-9.
107. Kim TJ, Lim Y, Kim DW, Kwon JS, Son JH, Jin YR, et al. Epothilone D, a microtubule-stabilizing compound, inhibits neointimal hyperplasia after rat carotid artery injury by cell cycle arrest via regulation of G1-checkpoint proteins. *Vascul Pharmacol.* 2007;47(4):229-37.
108. Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ. TGF- β signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities. *Cell Signal.* 2013;25(1):264-8.
109. MadanKumar P, NaveenKumar P, Manikandan S, Devaraj H, NiranjaliDevaraj S. Morin ameliorates chemically induced liver fibrosis in vivo and inhibits stellate cell proliferation in vitro by suppressing Wnt/ β -catenin signaling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;277(2):210-20.
110. Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park CK, Xu ZZ, et al. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB J.* 2012;26(4):1755-65.
111. Dong L, Yu L, Bai C, Liu L, Long H, Shi L, et al. USP27-mediated Cyclin E stabilization drives cell cycle progression and hepatocellular tumorigenesis. *Oncogene.* 2018;37(20):2702-13.
112. Wang J, Yang T, Chen H, Li H, Zheng S. Oncogene RPA1 promotes proliferation of hepatocellular carcinoma via CDK4/Cyclin-D pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;498(3):424-30.
113. De Jesus Araújo L, Yamamoto De Almeida L, Santos Lima J, Martelli-Júnior H, Ferreti Bonan PR. Evaluation of MMP-1, MMP-10, TIMP-1, α -SMA and TGF- β 1 in angiofibromas of tuberous sclerosis. *Minerva Stomatol.* 2011;60(1-2):25-33.
114. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* 2018;127(2):175-86.