



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ANÁLISIS DEL PERFIL DE CITOQUINAS PRO Y ANTIINFLAMATORIAS EN
HIGADOS DE RATAS SOMETIDAS A FIBROSIS HEPÁTICA**

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

**AUTOR: TOMÁS LÓPEZ DÍAZ
PROFESORA GUÍA: DRA BQ. JESSICA ZÚÑIGA HERNÁNDEZ**

TALCA-CHILE

2022

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, 2023

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer profundamente y de corazón a todas aquellas personas que, de una u otra forma han hecho posible la realización de este trabajo, especialmente a:

Dra. Jéssica Zúñiga Hernández, por haberme seleccionado y dado la oportunidad junto con la confianza al permitirme formar parte de su grupo de investigación, y por su gran profesionalismo, dedicación, paciencia y apoyo incondicional en este año y medio. De no ser por su investigación no hubiera terminado la carrera, mi más sincero agradecimiento.

María José Zúñiga, por su apoyo, su gran disposición al momento de transmitir su conocimiento en conjunto con su profesionalismo y sobre todo por su incondicionalidad en todo momento.

Francisca Herrera Vielma, por su apoyo tanto en datos para esta investigación, como al momento de transmitir y compartir conocimientos.

El desarrollo de esta memoria se llevó a cabo en el laboratorio de Investigaciones Moleculares en la Universidad de Talca, donde me permitieron aprender las diferentes técnicas que tuvieron como fruto los resultados presentados en este trabajo. Por ello quisiera agradecer por abrirme sus puertas el tiempo que duró esta memoria. Y, gratitud infinita a mi familia, mis amigos Stephan y Benjamín, por el apoyo incondicional mutuo, consideración, amor y sobre todo comprensión.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Resumen	6
2. Introducción	7
3. Marco teórico	9
3.1 Generalidades	9
3.2 Componentes celulares más relevantes del Hígado	11
3.2.1 Hepatocitos	11
3.2.2 Células de Küpffer	12
3.2.3 Células estrelladas	13
3.3 Fisiopatología hepática	13
3.3.1 Hepatitis viral	13
3.3.2 Hepatitis alcohólica	14
3.3.3 Hígado graso no alcohólico	14
3.3.4 Fibrosis/cirrosis	15
3.4 Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga	18
3.4.1 Omega-3	19
3.4.1.1 Derivados antiinflamatorios Omega-3	21
3.4.1.2 Maresina-1 y su rol hepatoprotector	21
3.5 Implicancias biomédicas	23
4. Hipótesis	24
5. Objetivo general	24
5.1 Objetivo específico	24
6. Materiales y Métodos	25
6.1 Animales	25
6.2 Modelo de Fibrosis por dietilnitrosamina	25
6.3 Eutanasia	26
6.4 Evaluación de daño hepático	27
6.4.1 Medición de proteínas séricas	27
6.5 Diseño partidores	28
6.6 Aislamiento de ARN	28

6.7 Real Time PCR (qPCR)	29
6.8 Análisis estadístico	30
6.9 Financiamiento	30
7. Resultados	31
7.1 Curvas de crecimiento con relación a peso corporal	31
7.2 Índice hepático del estudio	32
7.3 Niveles de AST y ALT en cada grupo de ratas en estudio	33
7.4 Diferencias de expresión de citocinas pro y antiinflamatorias en relación a GAPDH en cada grupo de ratas en estudio	34
8. Discusión	36
9. Conclusión	42
10. Bibliografía	43

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Modelo lobulillar y anatomía hepática	10
Tabla 1. Características de los diferentes tipos de enfermedades hepáticas	16
Figura 2. Metabolización de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 y omega-3	19
Figura 3. Familias de mediadores de lípidos Pro-Resolutivos biosintetizado desde Ácidos Grasos Poliinsaturados (AA, EPA, DHA) y su actividad antiinflamatoria	22
Tabla 2. Números de animales y tratamientos por grupo de trabajo	26
Tabla 3. Algunas de las secuencias de nucleótidos de los cebadores propuesto para ser utilizado para RT-PCR en tiempo real	28
Figura 4. Promedio de crecimiento de masa corporal en cada grupo de ratas utilizadas en el experimento	31
Figura 5. Porcentaje de relación peso animal con peso de hígados en cada grupo de ratas del estudio	32
Figura 6. Efecto de MaR1 sobre los niveles séricos de (A) alanina aminotransferasa (ALT), (B) aspartato aminotransferasa (AST) después de la administración de DEN.	33
Figura 7. Cuantificación de los niveles de expresión de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-10 (C) y IL-4 (D) en modelo de fibrosis hepática enfrentada a MaR1.	35

1. RESUMEN

El hígado es un órgano que posee variadas funciones dentro del organismo con un intrincado sistema de reparación y regeneración, el cual consiste en la generación de nueva matriz extracelular por parte de las células estrelladas (en conjunto con otras líneas celulares del microambiente hepático), con la posterior regeneración de estas. Las alteraciones del funcionamiento y mantención de este proceso es muy común, lo cual deriva en varias patologías muy prevalentes en la población, como la fibrosis y posterior cirrosis hepática. Dentro de los estudios utilizados para evaluar los procesos de fibrosis hepática, se encuentra la inducción por dietilnitrosamina (DEN), modelo ampliamente usado mediante el cual se puede evaluar el efecto de diversos tratamientos anti-fibróticos, como es el caso de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), como omega 3 y omega 6. En el último tiempo se han descubierto varios derivados procedentes de estos PUFA, los cuales son capaces de modular tanto la respuesta inflamatoria como la generación matriz extracelular, por lo que son también denominados “Specific pro-resolving mediators” (SPM). Dentro de este grupo es posible encontrar a las maresinas (MaR), derivadas del ácido docosahexaenoico (DHA). 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 buscó evidenciar el rol de MaR1 sobre la fibrosis hepática inducida por DEN en modelo de ratas de la cepa Sprague-Dawley, en donde MaR1 debería proteger al tejido hepático frente a la generación de daño, restaurando el equilibrio inmunitario en el tejido hepático.

Palabras claves: Fibrosis hepática, citoquinas proinflamatorias, citoquinas antiinflamatorias, MaR1, qPCR tiempo real.

2. INTRODUCCIÓN

El hígado cumple funciones esenciales en nuestro organismo, tales como síntesis, almacenamiento, transformación, degradación y detoxificación de xenobióticos y compuestos endógenos. Es por lo anterior que un daño a nivel de este órgano tiene consecuencias perjudiciales a nivel sistémico. Sin embargo, el hígado tiene un mecanismo de respuesta ante estas noxas, 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 hepáticas, dentro de ellas encontramos la hepatitis crónica viral (HV)-B, HVC, la enfermedad hepática alcohólica (EHA) y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA)¹, las cuales pueden cursar con cirrosis hepática y/o también insuficiencia hepática. Estas patologías son un problema de salud pública que se traducen en una morbi-mortalidad significativa, alcanzando en Chile la tasa mortalidad por cirrosis hepática para el segundo periodo de 1990-2007 de 17 muertes por cada 100.000 habitantes². 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 tienen un desenlace fatal. La fibrosis se conoce como el daño crónico del tejido hepático causado por una acumulación gradual de matriz extracelular (MEC), la cual eventualmente puede avanzar y terminar completamente con la arquitectura del hígado, generando una patología llamada cirrosis³. Muchos estudios indican que estas terapias están enfocadas a reducir tanto la inflamación como la deposición de MEC, interfiriendo con la fibrogénesis o introduciendo 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 las cuales encontramos a los derivados alimenticios esenciales: ácidos grasos Omega-3 (ω -3) y Omega-6 (ω -6), siendo los derivados de ω -3 una alternativa interesante para combatir la fibrosis hepática.

En base a esto, el tema a abordar en esta memoria tiene relación con el estudio de lípidos mediadores de protección derivado de ω -3, como maresina-1 (MaR1), la cual tiene características de potencial hepatoprotector, tanto con acciones antiinflamatorias como pro-

resolutivas, inhibiendo infiltración celular de tipo linfocitaria al tejido hepático. Buscando estudiar el efecto de estos lípidos en la resolución de la fibrosis hepática, se indujo fibrosis en modelos de rata con el fin de otorgar un mayor conocimiento de las capacidades antiinflamatorias y anti fibróticas de MaR1, mediante la técnica de extracción de material genético (ARN) y qRT-PCR analizando la expresión relativa de citoquinas pro y antiinflamatorias en cuatro grupos de estudio.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades.

El hígado es un órgano blando que pesa alrededor de 1,4 a 1,6 kg en condiciones fisiológicas normales. Su función principal es filtrar la sangre que proviene del tracto digestivo antes de distribuirla hacia el resto del cuerpo, a través de una circulación portal vía la vena porta y luego la vena cava, retornando al corazón. Además, se encarga de sintetizar glucosa, proteínas plasmáticas y factores de la coagulación. Junto a lo anterior, degrada y elimina drogas y hormonas entre otras funciones⁴. Su ubicación anatómica está por debajo del diafragma y ocupa gran parte del hipocondrio derecho. Es el único órgano que posee doble irrigación, la que proviene de arteria hepática (+/- 300ml/min) y la procedente de la vena porta (+/-1.050 ml/min) y esta suministra cerca del 60-70% de oxígeno que el hígado necesita⁵.

El hígado está conformado estructuralmente por lobulillos que son su unidad funcional. Miden entre 0,8 y 2 mm de diámetro y existen alrededor de 80.000 lobulillos en el hígado. Cada lobulillo está organizado alrededor de una vena central que drena en venas hepáticas y luego en vena cava como se observa en la Figura 1⁶. Los conductos biliares terminales y las pequeñas ramas de la vena porta y de la arteria hepática se ubican en la periferia del lobulillos, cada placa hepática constituida por hepatocitos está separada por sinusoides que se extienden de la periferia hacia la vena central, permitiéndoles eliminar o liberar sustancias en la circulación. Estos hepatocitos son los encargados de desempeñar las funciones de formar y excretar bilis durante el metabolismo de la bilirrubina, regular la homeostasis de los carbohidratos, sintetizar lípidos y secretar lipoproteínas plasmáticas, controlar el metabolismo del colesterol, sintetizar urea, albumina sérica, factores de coagulación, enzimas transaminasas y varias otras proteínas, además de metabolizar o detoxificar fármacos y otras sustancias extrañas⁴. Los sinusoides están revestidos por las células de Kupffer, macrófagos residentes que se encargan de eliminar y fagocitar células sanguíneas viejas y defectuosas, liposomas, bacterias, parásitos, virus, glóbulos rojos envejecidos o dañados y plaquetas opsonizadas con IgG y/o complemento⁷. Por debajo de los hepatocitos está el “espacio de Disse” en donde se encuentran las células estrelladas hepáticas (HSC) de estirpe miofibroblástica encargadas de almacenar el 80% de la vitamina A, producir MEC, regular

la regeneración y función inmunoreguladora, además de funcionar como almacén de retinoides y esteroides. Las HSC se mantienen en estado G0 de la mitosis y dependiendo del ambiente, esta célula se puede transformar a fibroblasto, el cual puede producir colágeno y matriz extracelular⁸.

El hígado puede sufrir diversas agresiones metabólicas, tóxicas, microbianas, circulatorias y neoplásicas. Las principales enfermedades primarias son las hepatitis víricas, la esteatosis no alcohólica (ENA), hepatopatía alcohólica y carcinoma hepatocelular (CHC). También se pueden producir lesiones secundarias a algunas enfermedades como insuficiencia cardíaca, cáncer diseminado e infecciones extrahepáticas. El hígado, al requerir tan solo una pequeña parte de su parénquima para funcionar (20% aprox.), enmascara diversas lesiones leves que no se aprecian hasta que comienzan a alterar el flujo biliar, comprometiendo con rapidez la vida en sus pacientes, generalmente con patologías crónicas al nivel de los lobulillos⁹.

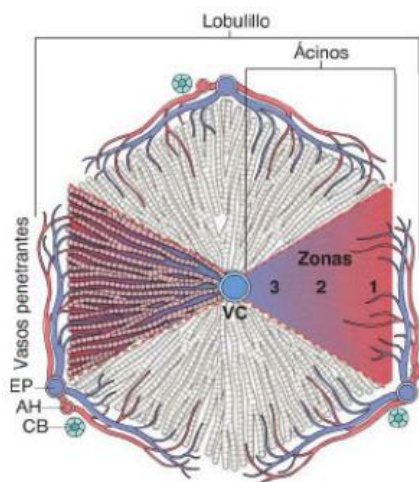


Figura 1. Modelo lobulillar, anatomía hepática. Modelo lobulillar, donde vena hepática terminal se localiza al centro, los espacios porta en la periferia (tríada: AH: Arteriola hepática- CB: conducto biliar- EP: vena porta), y en el acino, la zona III menos oxigenada y la zona I más oxigenada. Tomado de Patología estructural y funcional, Robbins y Cotran⁹.

Ya que el hígado es un órgano grande, se necesita realizar una cantidad significativa de daño en el tejido antes de que una persona experimente síntomas de enfermedad. Dentro de las enfermedades más relevantes, nos encontramos con la esteatosis generada por acumulación de grasa en el órgano, lo que conlleva a una fibrosis hepática, la cual puede desencadenar una cirrosis, fallo hepático o cáncer de hígado¹⁰.

La fibrosis hepática consiste en una disminución del flujo sanguíneo a través del hígado y una acumulación de tejido cicatricial, la que se manifiesta mediante una fatiga moderada, molestia abdominal, debilidad, náuseas e ictericia, entre otros. Esta patología genera una activación de las células estrelladas hepáticas, la cual va de la mano con una deposición excesiva de matriz extracelular¹¹. Es en esta situación fisiopatológica donde se enmarca el estudio de esta tesis.

3.2 Componentes celulares más relevantes del Hígado

3.2.1 Hepatocitos

Los hepatocitos son las células base del hígado y su membrana basolateral se enfrenta a la sangre sinusoidal, donde uno o más dominios apicales contribuyen a la formación de canalículos biliares, junto con los hepatocitos adyacentes. Esta polarización permite el flujo direccional de moléculas desde la sangre sinusoidal a la bilis canalicular y como tal, es crucial para la fisiología biliar normal¹². La principal función de los hepatocitos es metabolizar sustancias procedentes de la digestión. Esto es posible porque el hígado se encuentra irrigado por la vena porta, que recoge las moléculas resultantes de la digestión del intestino. Aparte de degradar sustancias digeridas, también tienen un papel importante en la detoxificación de moléculas potencialmente dañinas para el organismo, como el etanol (bebidas alcohólicas) por parte de los peroxisomas. Por otra parte, los hepatocitos sintetizan y secretan bilis, la cual es liberada en el tubo digestivo para ayudar en la digestión y eliminar sustancias liposolubles y el exceso de colesterol¹³. Estas células al funcionar de forma inadecuada sufren cambios degenerativos, dando origen a la esteatosis y colestasis, aunque estos procesos pueden ser reversibles. Cuando la lesión no es reversible, los hepatocitos mueren por dos mecanismos: necrosis o apoptosis¹⁴.

En la necrosis, los hepatocitos se hinchan por un defecto en la regulación osmótica derivado de la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, entrando líquido al interior, siguiéndole una tumefacción y rotura de la célula, siendo un proceso proinflamatorio de manera que estas células son marcadas por los macrófagos y predominan en las lesiones isquémicas/hipóxicas y constituye una parte significativa de la respuesta a estrés oxidativo. La apoptosis, en cambio, es una forma activa de muerte celular programada, provocando la retracción de hepatocitos, generando picnosis, cariorexix y fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos acidófilos⁹.

3.2.2 Células de Kupffer

Las células de Kupffer son macrófagos específicos del tejido hepático y son miembros importantes del sistema inmunitario innato, participan en la eliminación de antígenos extraños, complejos antígenos-anticuerpo y restos celulares sanguíneos¹⁵. Se sitúan sobre las células endoteliales y emiten prolongaciones citoplasmáticas al espacio de Disse subendotelial, de modo que les permiten estar en contacto directo con los hepatocitos y las HSC. La superficie celular de las células de Kupffer presenta numerosos *microvillis* o lamelipodios e invaginaciones en forma de líneas onduladas que parecen estar implicadas en la endocitosis. El citoplasma es rico en diferentes vesículas intracitoplasmáticas, presenta gran número de mitocondrias, un aparato de Golgi extenso, abundante retículo endoplasmático rugoso y un conjunto de diferentes estructuras vacuolares y cuerpos densos que varían en forma, diámetro y densidad que constituyen el desarrollado aparato lisosomal de la célula de Kupffer¹⁶. Se ha demostrado que la polarización de los macrófagos de las células de Kupffer activados alternativamente produce citoquinas con acción paracrina en el proceso de fibrosis hepática que luego activan a las HSC, secretando α -actina de músculo liso (α -SMA), promoviendo la síntesis de colágeno y acelerando el proceso de fibrosis, en la fibrosis/cirrosis hepática¹⁷.

3.2.3 Células estrelladas

Fue Karl Kupffer quien, en el año 1876, descubrió las HSC cuando intentaba buscar fibras nerviosas en el hígado utilizando la técnica de cloruro de oro¹⁸, logrando identificar un grupo de células que presentaban prolongaciones que entraban en contacto con la pared sinusoidal y con los hepatocitos, a las que llamó «Sternzellen» (células estrelladas). Estas HSC, se encargan de almacenar vitamina A, controlar la comunicación intercelular por medio de liberación de varios mediadores intercelulares¹⁹ y remodelar gran parte de la MEC presente en el hígado, mediante la producción de componentes colágenos y no colágenos de la MEC. Entre sus funciones encontramos: i) la síntesis de las metaloproteinasas de la MEC, las cuales son un grupo de enzimas capaces de catabolizar estos componentes²⁰ y ii) la síntesis de los inhibidores de las metaloproteinasas, que controlan la actividad catalítica de las metaloproteinasas, con el fin de que se encuentre una concentración estable de matriz intersticial. El propósito de las HSC es, por tanto, controlar la homeostasis tisular y mantener el equilibrio entre síntesis y degradación de los componentes de la MEC hepática²¹.

3.3 Fisiopatología hepática.

El hígado es vulnerable a una amplia variedad de agentes nocivos metabólicos, tóxicos, microbianos, circulatorios y neoplásicos. Las enfermedades más importantes del hígado son las hepatitis víricas, la hepatitis alcohólica, el HGNA y el CHC²².

3.3.1 Hepatitis viral

El término de hepatitis vírica se aplica a las infecciones hepáticas causadas por un grupo de virus conocidos como virus hepatotropos (VH) como son los VHA, B, C, entre otros, que tienen una afinidad particular por el hígado⁹.

El VHA es muy estable a temperatura ambiente y puede soportar pH bajo, secado y detergentes. Después de la ingestión de VHA por vía fecal-oral, el virus sobrevive al ambiente ácido del estómago y llega finalmente a través del torrente sanguíneo al hígado²³. Las manifestaciones clínicas de la infección por VHA van desde la infección asintomática, hasta la insuficiencia hepática aguda (IHA), pero no incluyen la progresión a hepatitis crónica²⁴.

El VHB, el VHC y el VHD utilizan varios mecanismos para cooptar las células infectadas que pueden conducir involuntariamente al desarrollo de CHC. Los mecanismos comúnmente utilizados entre los tres virus incluyen: (1) Inflamación hepática persistente y daño por estrés oxidativo inmunomediado por una infección viral crónica; (2) Daño por estrés oxidativo intracelular inducido por proteínas virales y (3) Desregulación de las vías de señalización celular por proteínas virales (por ejemplo, HBx, L-HDAg, entre otras)²⁵. El VHB es el único virus de ADN hepatotrópico que también utiliza la integración del ADN viral para inducir la inestabilidad del genoma, lo que puede conducir a la creación de productos génicos de fusión y a la expresión alterada de oncogenes o supresores de tumores. También se debe mencionar que el VHC facilita la reprogramación metabólica que conduce a la esteatosis, lo que ayuda a la progresión de la fibrosis y el CHC²⁶.

3.3.2 Hepatitis alcohólica

La enfermedad hepática asociada al alcohol (EHA) tiene un espectro de fenotipos hepáticos que son el resultado del consumo excesivo de alcohol agudo o crónico, en donde la hepatitis alcohólica (HA) es el fenotipo grave de enfermedades hepáticas derivadas del consumo de alcohol, caracterizado por inflamación hepática, progresión a cirrosis y una alta tasa de mortalidad. Su diagnóstico clínico se basa en un patrón específico de consumo de alcohol, y niveles de aminotransferasa y bilirrubina total, entre otros criterios de los cuales a pesar de niveles similares de consumo excesivo de alcohol, solo algunos individuos desarrollan HA, lo que sugiere una base genética para la predisposición y la gravedad de la HA, que hasta ahora no se conoce bien²⁷.

3.3.3 Hígado graso no alcohólico

La EHGNA se ha convertido gradualmente en una de las enfermedades hepáticas crónicas más comunes en el mundo. Según las estadísticas epidemiológicas, la prevalencia general de EHGNA en todo el mundo es del 24% y muestra una tendencia ascendente²⁸. La EHGNA es un síndrome clínico-patológico, caracterizado principalmente por la acumulación y degeneración grasa en el hígado, que es causada por algunos factores definidos de daño hepático distintos del alcohol²⁹. La causa principal de la EHGNA es la sobrealimentación, que provoca la expansión de los depósitos adiposos y la acumulación de grasa ectópica, provocando la infiltración de macrófagos en el compartimento de tejido adiposo visceral, la

cual crea un estado proinflamatorio que promueve la resistencia a la insulina. La lipólisis inadecuada en el contexto de la resistencia a la insulina, da lugar a un suministro ininterrumpido de ácidos grasos al hígado, que, junto con el aumento de la lipogénesis *de novo*, desborda su capacidad metabólica, generando un desequilibrio en el metabolismo de los lípidos que conduce a la formación de lípidos lipotóxicos que contribuyen al estrés celular (vía estrés oxidativo y estrés del retículo endoplásmico), la activando el complejo proteico intracelular denominado inflammasoma e induciendo muerte celular apoptótica, con la posterior estimulación de la inflamación, la regeneración de los tejidos y la fibrogénesis³⁰. Los macrófagos inflamatorios y profibrogénicos están implicados en la progresión de la fibrosis hepática y podrían tener también un papel en los procesos inflamatorios crónicos en otros tejidos³¹. En el examen histopatológico, la acumulación de triglicéridos (TG) en más del 5% de los hepatocitos se considera diagnóstico para EHGNA. Esta patología se puede revertir mediante la intervención farmacológica y el cambio de estilo de vida de los pacientes en una etapa temprana. Sin embargo, está la posibilidad de que en los pacientes con EHGNA que no reciben tratamiento a tiempo, pueden progresar a esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), luego alrededor del 10% de los pacientes desarrollarán fibrosis y cirrosis hepática y, finalmente, CHC³². En la Tabla 1 se puede observar un resumen de los distintos tipos de enfermedades hepáticas, las cuales impiden un óptimo funcionamiento del hígado o bien generan que este órgano se vuelva insuficiente a las demandas metabólicas.

3.3.4 Fibrosis/cirrosis

La fibrosis hepática es una enfermedad con alta morbilidad, siendo categorizada como la principal razón de la mortalidad por enfermedad hepática crónica. A menudo termina con enfermedades agresivas como ascitis, cirrosis y carcinoma hepatocelular³⁵. La fibrosis del hígado resulta de lesiones crónicas proinflamatorias que causan daño hepatocelular y desencadenando la regeneración parenquimal hepática distorsionada y la acumulación de tejidos fibrosos³⁶.

La fibrosis es un proceso de curación de heridas que se desregula cuando las agresiones repetidas dan como resultado una fibrinogénesis crónica patológica³⁸. Todas las líneas celulares del hígado sufren alteraciones en el fenotipo, debido a cambios en el microambiente en el espacio de Disse. La HSC son el principal impulsor de la fibrosis hepática seguida de

los fibroblastos portales y los fibrocitos derivados de la médula ósea. Las señales extracelulares de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo, como las células de Kupffer, los macrófagos extrahepáticos, las células NK, las células T y las células B, modulan la activación de las HSC, también conocida como “fase de inicio”³⁹.

Tabla 1: Características de los diferentes tipos de enfermedades hepáticas. Tomado y adaptado de Saleem A, et al. 2016³⁴.

Enfermedad	Agente	Síntomas	Periodo incubación	Método de transmisión	Test de diagnóstico
Hepatitis A	VHA Picornaviridae	Fiebre, dolor de cabeza, migraña e ictericia	15-50 días	vía fecal-oral	Confirmación por serología para anticuerpos IgM anti HVA y nexo epidemiológico
Hepatitis B	VHB Hepadnaviridae	Daño hepático severo, enfermedad crónica	3-6 meses	Ruta percutánea o permucosa	HBsAg, Anti-HBc- IgM
Hepatitis C	VHC Flaviridae	Igual que VHB, además cuadro más crónico	15-150 días	Principalmente por sangre infectada, además de contacto sexual	ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), VHC NAT (técnicas de amplificación de ácidos nucleicos) y PCR (reacción en cadena de la polimerasa)
Enfermedad Hepática alcohólica (EHA)	Consumo de alcohol	Generalmente asintomática Hepatomegalia, fiebre, pérdida de peso, mucosa oral ictericia, etc.	10 años	No reportado	Niveles séricos de AST y ALT, antecedentes consumo de alcohol, resonancia magnética/tomografía computacional y/o biopsia hepática
Hígado graso no alcohólico (EHGNA)	Sobrepeso, insulino resistencia, síndrome metabólico, etc.	Perdida del apetito, náuseas, ictericia, fatiga, dolor abdominal, etc.	5-10 años	No reportado	Ultrasonido hepático y/o biopsia hepática

En la lesión hepática temprana, las células endoteliales producen una variante de fibronectina que también estimula la activación de las HSC, a su vez los hepatocitos estimulan la activación a través de las peroxidasas lipídicas que conducen al estrés oxidativo y las células de Kupffer estimulan la síntesis de matriz, la proliferación celular y la liberación de retinoides por las HSC. Estas liberan quimiocinas y citocinas que reclutan y activan las células inmunitarias inflamatorias, lo que contribuye a la fase de perpetuación de la fibrogénesis. En esta fase, las HSC proliferan y dan lugar a contractilidad, fibrogénesis, quimiotaxis, degradación de la matriz, pérdida de retinoides y liberación de citocinas⁴⁰. Los mitógenos de células estrelladas, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la endotelina-1, la trombina, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), conducen a la proliferación. La endotelina-1, junto con la arginina-vasopresina, la adrenomedulina y los eicosanoides proinflamatorios, activan las HSC para aumentar las presiones portales y la resistencia, al contraer los sinusoides y el tejido hepático. El factor de crecimiento transformante B1 (TGFβ1) es el factor fibrinógeno principal y está regulado positivamente por los factores de transcripción Sp1 y Zf9. Otros factores involucrados en la fibrinogénesis incluyen Factor de necrosis tumoral (TNF), peróxidos de lípidos y acetaldehído⁴¹. La MEC, que está formada por moléculas como colágenos, glicoproteínas, proteoglicanos y glucosaminoglicanos, promueve aún más la activación de las HSC. Cuando el hígado se vuelve fibrótico, el colágeno intersticial aumenta de 3 a 8 veces, un concepto conocido como "capilarización", que causa la destrucción de las microvellosidades de los hepatocitos y las fenestraciones endoteliales. Como resultado, el transporte de solutos importantes a los hepatocitos se ve afectado, lo que conduce a una disfunción hepática³⁷. Las HSC son una fuente conocida de metaloproteinasa-2 (MMP-2) de matriz, las cuales responden a la remodelación de la MEC; sin embargo, sus reguladores no han sido completamente identificados. La activación y proliferación de las HSC pueden inhibirse e incluso revertirse⁴². Los mecanismos de reversión incluyen apoptosis, eliminación inmunitaria, senescencia y reversión a un estado inactivado. Estas vías son dianas prometedoras para nuevos agentes terapéuticos⁴³.

Debido a lo anterior es que en esta memoria se propone evaluar nuevos mecanismos farmacológicos que permitan revertir el daño hepático relativo a la fibrosis en un modelo animal.

3.4 Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

Los lípidos juegan un papel crucial en la integridad de la membrana celular, la señalización celular y el metabolismo. Una clase importante de lípidos son los ácidos grasos (AG) poliinsaturados (PUFA), que se caracterizan por tener más de un doble enlace en su estructura de carbono. Los PUFA se dividen en dos clases principales: ácidos grasos omega-3 (ω -3) y omega-6 (ω -6), dependiendo de si el primer doble enlace está en el tercer o sexto carbono respecto del grupo metilo terminal. Los PUFA pueden sintetizarse a partir de los AG esenciales: ácido linoleico (LA) y ácido alfa-linoleico (ALA), a través de una vía de biosíntesis que involucra desaturasas y elongasas de AG para dar lugar a PUFA de cadena larga (LC-PUFA, de 18-22 carbonos) como el ácido docosahexaenoico (DHA 22: 6n-3), el ácido eicosanopentanoico (EPA 20: 5n-3) y el ácido araquidónico (ARA 20: 4n-6)⁴⁴.

La síntesis de AG puede realizarse por vías anaeróbicas a través de las enzimas policétido sintasa, que solo están presentes en algunos microorganismos o por vías metabólicas aeróbicas, que son más universales, como ocurren en plantas, algas, hongos y animales. Consiste en pasos sucesivos de elongación (alargamiento de la cadena de carbono) y desaturación (inclusión de dobles enlaces en la cadena de carbono), reacciones controladas por enzimas elongasa y desaturasa (ver Figura 2)⁴⁵. Existen variaciones en el orden en el que ocurren los pasos de desaturación y alargamiento. Por tanto, la "vía metabólica 6" comienza con una delta-desaturación (Δ 6), seguida de un alargamiento de la cadena y desaturación de esta, para producir EPA cuando el sustrato inicial es ALA, o para producir ARA cuando el sustrato inicial es LA (ω -6). Por otro lado, el EPA se alarga a DPA (ácido docosapentaenoico, 22: 5n-3) que se desatura de nuevo en la posición 4 para producir finalmente DHA (Fig. 2) (ω -3). También existe la llamada "ruta de Sprecher", que describe la producción de DHA por desaturaciones consecutivas de Δ 6 y Δ 5 de ALA, para producir intermediarios metabólicos C24, que finalmente se acortan a DHA mediante un paso de β -oxidación que tiene lugar en los peroxisomas⁴⁶. Esta ruta ha sido caracterizada en mamíferos y peces y su producto final, DHA se sintetiza sin la intervención de la Δ 4-desaturasa. Finalmente, la "ruta alternativa 8" (Δ 8), típica en protistas y algas, comienza directamente con un paso de elongación de C18 a C20, seguido de desaturaciones en las posiciones 8 y 5, generando DGLA (ácido dihomo- γ -

linolénico, 20: 3n-6) y ARA, respectivamente, así como para finalmente, producir ETA (ácido eicosatetraenoico, 20: 4n-3) y EPA.⁴⁷

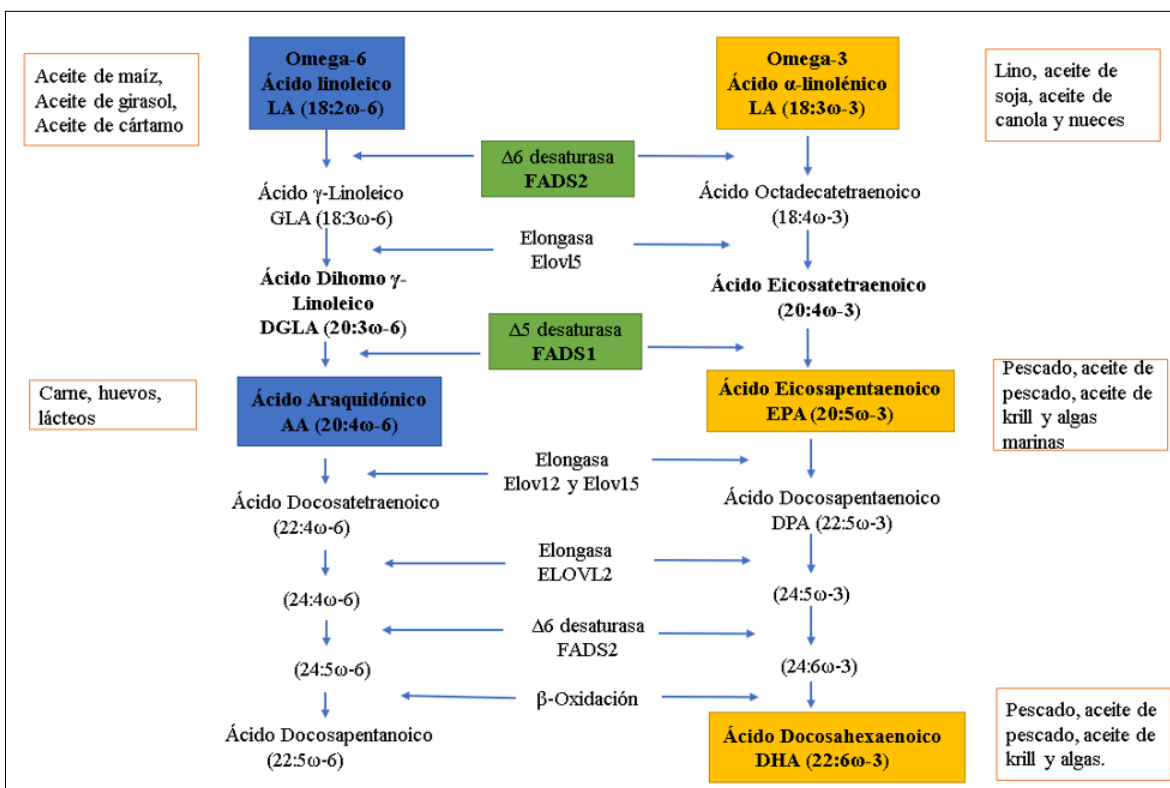


Figura 2. Metabolización de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 y omega-3. Vías de desaturación y elongación de los ácidos linoleico y alfa-linolénico. Tomado de Ácidos grasos omega-3 y enfermedad del hígado graso no alcohólico: evidencia de eficacia y mecanismo de acción.⁵⁰

3.4.1 Omega-3

Los PUFA ω -3 son AG de cadena larga caracterizados por la presencia de un doble enlace (C=C) en el tercer átomo de carbono del recuento de la cadena hidrocarboxílica del extremo metilo. El ALA es el AG más simple con una cadena hidrocarboxílica de 18 carbonos y tres dobles enlaces. El ALA es uno de los dos "PUFAs esenciales", es decir, no pueden ser sintetizados por animales, incluidos los humanos; por lo tanto, estos PUFAs deben obtenerse a través de la dieta.⁴⁸ Tanto el ALA como el LA se sintetizan en las plantas y, en consecuencia, se encuentran en numerosas semillas, frutos secos y aceites de semillas como

las semillas de lino y su aceite, aceite de soja, aceite de colza, nueces y aceite de girasol. Por lo general, las semillas de lino contienen entre un 45% y un 55% de AG como ALA, mientras que el aceite de girasol es muy rico en LA⁴⁹. Los ácidos EPA, DPA y DHA son funcionalmente los PUFA ω -3 altamente insaturados de cadena muy larga, más importantes (Fig. 3). Aunque estos AG de cadena muy larga se encuentran en una variedad de alimentos, el pescado (especialmente el pescado azul) y otros mariscos, son las fuentes biodisponibles más ricas en EPA, DPA y DHA.⁵⁰ El ALA es el precursor de la serie de PUFAs ω -3 de cadena larga y la ingesta diaria recomendada es de 1,6 g / día para hombres y 1,1 g / día para mujeres ($\geq 0,5\%$ de grasa total). En cuanto a EPA y DHA, una ingesta adecuada oscila entre 0,25 y 2 g / día (correspondiente a dos porciones de pescado a la semana, consumiendo al menos una harina de pescado graso). Con una dieta saludable, la proporción fisiológica entre los ácidos grasos omega-6 y omega-3 debe ser de 4/1.⁴⁸

Los eicosanoides (por ejemplo, prostaglandinas y leucotrienos) que se derivan del ácido araquidónico (ARA) y los PUFAs ω -6 asociados exhiben funciones proinflamatorias y procoagulatoras. Por el contrario, los eicosanoides, resolvinas y otros mediadores derivados de los ácidos grasos omega-3 como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA), apoyan a la resolución de la inflamación.⁵¹ Por lo tanto, el equilibrio entre los eicosanoides proinflamatorios y los pro-resolutivos, parece ser de vital importancia para la regulación y terminación apropiada de la respuesta inflamatoria.⁵²

La proporción de PUFAs ω -6/ ω -3 es un determinante importante de la salud y un cambio en el equilibrio hacia los PUFAs ω -3 conduce a una menor tasa de mortalidad en las enfermedades cardiovasculares. También se ha descrito un papel de los PUFA ω -3 en la mejora de la artritis reumatoide, el asma, así como la diabetes o el cáncer⁵³. En la enfermedad hepática, los PUFAs ω -3 y ω -6 pueden reducir la lipogénesis hepática, la inflamación y la fibrosis hepática⁵⁴.

En razón de lo antes expuesto, esta memoria experimental busca determinar qué pasa en el proceso de fibrosis hepática, al inhibir la activación y proliferación de estas HSCs lo cual puede ser un paso clave en el alivio del dolor y regeneración del tejido hepático, mediante la administración exógena de mediadores pro-resolutivos especializados (SMP) derivados de los ácidos grasos omega-3 y a la vez, regular la respuesta inflamatoria evitando un deterioro

mayor y la aparición de cirrosis o un CHC, logrando de esta manera obtener un tratamiento eficaz contra la fibrosis hepática.

3.4.1.1 Derivados antiinflamatorios de Omega-3

La síntesis de los SPM ocurre por una serie de reacciones de desaturación y elongación que tienen lugar principalmente en el hígado. La conversión de ácido ALA en EPA compite con la conversión del LA en AA, porque se utilizan las mismas enzimas. Se piensa que la $\Delta 6$ -desaturasa es la enzima limitante de la velocidad de esta vía. Las actividades de las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ -desaturasas están reguladas por el estado nutricional, las hormonas y mecanismos inhibitorios por el *feedback* de productos finales de las síntesis⁵⁵. Por lo tanto, existe una competencia entre ω -3 y ω -6 para las enzimas de desaturación, que prefieren ALA sobre LA, promoviendo la oxidación de LDL, la agregación plaquetaria, evitando la incorporación de PUFAs esenciales a la membrana de los fosfolípidos que favorecen las enfermedades crónicas. Los AG ω -3 tienen potentes efectos antiinflamatorios, suprimiendo la expresión de IL-1 β , TNF- α (citoquinas proinflamatorias)⁵³, también suprime parcialmente la acción y proliferación de los linfocitos T, además de interferir en las moléculas de adhesión relacionadas con la interacción leucocito- endotelio⁵⁶. Los SPM, con probada capacidad antiinflamatoria, corresponden a resolvinas de la serie E derivados del EPA. Como las resolvinas de la serie D derivadas del DHA, encontramos también a las protectinas y las maresinas (MaR) como se observa en la Figura 4⁵⁷. Los SPMs son reguladores potentes de la infiltración de neutrófilos, la producción de citoquinas, quimiocinas y la eliminación de neutrófilos apoptóticos por macrófagos. Todo esto promueve el retorno de la homeostasis tisular, siendo MaR1 estudiada por sus efectos como agentes pro-resolutivos en enfermedades crónicas⁵⁸.

3.4.1.2 Maresina-1 y su rol hepatoprotector

MaR1 es uno de los metabolitos destacados del DHA que muestra varias acciones antiinflamatorias fuertes. La MaR-1 se identificó por primera vez en los macrófagos humanos y se demostró que era un mediador lipídico activo en el proceso de resolución de la inflamación. Estudios posteriores han demostrado que los macrófagos humanos producen MaR1 mediada por la 14-lipoxilación del DHA y la hidrólisis enzimática a partir de la 13S,14S-epoximaresina. En cuanto a su acción antiinflamatoria, se ha descrito que MaR1 suprime la migración de neutrófilos y la producción de citoquinas mediante la activación de

células T CD8+, células T helper (Th1) CD4+ y células Th17⁵⁹, provocando la inhibición significativa de la producción de varias citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β y TNF- α , y promoviendo la expresión de citoquinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-10⁶⁰, además de participar en la actividad homeostática en modelos tales como lesión pulmonar aguda, colitis y la regeneración de tejido⁶¹. MaR1 en lesiones hepáticas agudas mejora la evolución de dicha lesión en un modelo de isquemia/reperfusión (IR); mitiga la lesión hepática aguda inducida por tetracloruro de carbono (CCL₄); atenúa la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) en ratones obesos; inhibe la progresión de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) inducida por una dieta alta en grasas⁶². Hoy en día existe una escasa evidencia bibliográfica y experimental que demuestre la participación de MaR1 en un modelo *in vivo* de fibrosis hepática, dando una amplia posibilidad de investigar este derivado de PUFA ω -3 en modelos animales con marcados índices fibróticos, con el fin de evidenciar su rol hepatoprotector y antiinflamatorio, generando una potencial opción terapéutica a pacientes con fibrosis hepática.

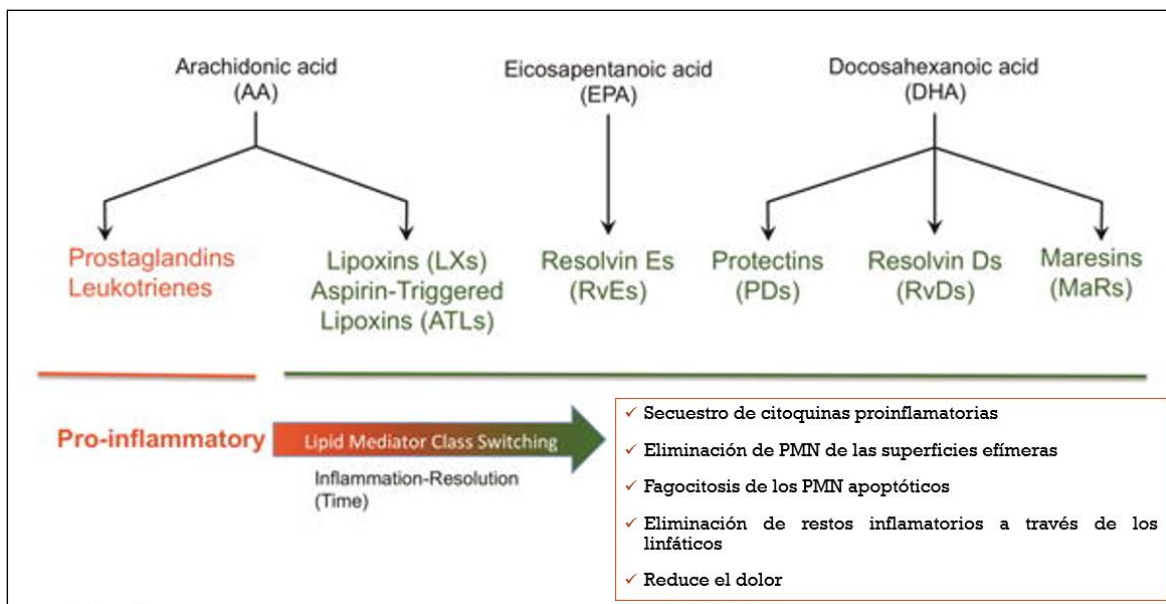


Figura 3. Familias de mediadores de lípidos Pro-Resolutivos biosintetizados desde Ácidos Grasos Poliinsaturados (AA, EPA, DHA) y su actividad antiinflamatoria. Tomado de Protectinas y maresinas: Nuevas familias de mediadores pro-resolución en la inflamación aguda y el metaboloma bioactivo de resolución⁵⁷.

3.5 Implicancias biomédicas del estudio

La fibrosis hepática es un problema de salud pública que se traduce en morbilidad y mortalidad significativa. Alrededor del mundo, muchas personas sufren de cirrosis asociada principalmente al gran índice de obesidad, consumo de alcohol, hepatitis virales y la EHGNA. Con toda la evidencia aportada y con la convicción que las enfermedades crónicas del hígado seguirán aumentando con el paso del tiempo, se ha propuesto estudiar la acción de un derivado del PUFA ω -3 sobre un modelo animal con fibrosis inducida por DEN, lo que tendría un efecto inhibitorio y pro-resolutivo de la fibrosis, ya que con los datos que se obtendrán en esta investigación, se hará un aporte a la ciencia del estudio de la fisiopatología hepática, 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:

Maresina-1, un derivado de ácidos grasos omega-3, es un agente regulador de la inflamación y promueve la resolución de la fibrosis hepática inducida por dietilnitrosamina (DEN) en modelo de ratas cepa Sprague-Dawley.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

Determinar los niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias presentes en tejido hepático de ratas sometidas a fibrosis química por DEN y tratadas farmacológicamente con el agente pro-resolutivo MaR-1 en modelo murino.

5.2 Objetivos específicos:

1. Evaluar el grado de protección conferido por MaR1 frente al daño hepático inducido por DEN sobre el crecimiento, índice hepático y niveles séricos de ALT y AST.
2. Caracterizar el perfil de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β presentes en tejido hepático de ratas sometidas a fibrosis química por DEN y tratados con MaR-1 mediante técnica qRT-PCR.
3. Caracterizar el perfil de citoquinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 presentes en tejido hepático de ratas sometidas a fibrosis química por DEN y tratados con MaR-1 mediante técnica qRT-PCR.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales

Las ratas macho cepa Sprague-Dawley (90-120 g) fueron obtenidas desde el Bioterio central, ICBM de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los animales fueron criados y mantenidos en el Bioterio de la Universidad de Talca, en una jaula con un máximo de 3 ejemplares. Fueron alojadas en una habitación con temperatura controlada con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, con aire acondicionado a 25 °C, con 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 fuese la adecuada y se masaron a todos los animales a lo menos una vez a la semana, para asegurar un adecuado crecimiento y generar los ajustes de dosis necesarios mientras duró el tratamiento.

6.2 Modelo de fibrosis por dietilnitrosamina (DEN)

La fibrosis hepática fue inducida mediante la inyección intraperitoneal (*i.p*) de dietilnitrosamina (DEN) a una dosis de 50 mg/Kg peso corporal (diluida con NaCl 0,15 M). Las inyecciones se administraron dos veces por semana durante un periodo de 4 semanas (28 días) y luego una vez por semana para las siguientes 8 semanas, según el modelo de hepatofibrosis inducida por DEN previamente descrita⁶³.

En la semana 4 postratamiento con DEN, se comenzó la administración de MaR1 a los grupos correspondientes (las primeras cuatro semanas fueron para garantizar que se establezca la fibrosis). MaR1 (Cat N° 10878, Caimán Chemical, Ann Arbor, MI, EE. UU.) se administró *i.p* una vez al día durante 8 semanas (4 ng/g de peso corporal de MaR1, los valores se probaron previamente en nuestro Laboratorio⁶⁴, y están en concordancia con Qu⁶⁵). Para el propósito de este estudio, a los animales se les asignó al azar a uno de los siguientes grupos: (ver Tabla 2): i) NaCl 0,15M + etanol 0,025% en NaCl 0,9% (vehículo de mar1) (control); ii) Den + Vehículo Mar1 (grupo DEN); iii) 0.15 M NaCl + MAR1 (grupo MaR1); iv) Den + Mar1 (grupo MaR1-DEN).

Tabla 2. Números de animales y tratamientos por grupo de trabajo.

Grupos	Vehículo DEN (NaCl 0,9%)	DEN (50mg/Kg)	Vehículo MaR1 (0,025% etanol en 0,9% NaCl)	MaR1 (4ng/g)	Número animales
I (control)					5
II (daño)					5
III (control droga)					5
IV (estudio droga)					5

6.3 Eutanasia

Al cabo de 8 semanas, los animales fueron anestesiados vía *i.p* con una mezcla de anestésicos-sedantes con (1 ml / kg) de clorhidrato de zolazepam (25 mg / ml) y clorhidrato de tiletamina (25 mg / ml) (Zoletil 50 TM; Virbac S/A, Carros, Francia). Se verificó inconciencia mediante detección de reflejo pedal. Posteriormente, se ubicó 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 cardíaca 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 le administró un refuerzo de la anestesia (20 ± 25% de la dosis original) para asegurar que el animal no sufriera durante el proceso de extracción de la muestra. La sangre extraída por punción cardíaca se depositó en un tubo sin anticoagulante y se dejó en reposo por lo menos 24 horas con la finalidad de que sedimentara por gravedad y luego se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, se extrajo el suero y fue almacenada a -20 °C. Una vez finalizada la extracción de sangre, se procedió a retirar los hígados. Los hígados se enjuagaron en solución salina fisiológica y se determinó su peso en fresco para el cálculo del índice hepático (índice hepático = [peso hepático / peso corporal] x 100%)⁶². Posterior a la medición del índice hepático, el tejido se congeló a -80°C hasta la experimentación. El número de animal por grupo experimental fue de 5(N = 5).

El suero fue utilizado para la medición de transaminasas, lo que permitió valorar el daño hepático (ensayo realizado por la tesista de Doctorado Francisca Herrera, a quien se le agradecen los resultados).

Todas las ratas recibieron atención humanitaria de conformidad con las directrices de la Universidad de Talca, los procedimientos de animales y protocolos cumplieron con la 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 N°2020-04-A de la universidad de Talca.

6.4 Evaluación de daño hepático

La medición de actividad de transaminasas hepáticas se realizó según el inserto del fabricante (VALTEK diagnostics, Santiago, Chile). Esta técnica consiste en una determinación cuantitativa colorimétrica de transaminasa glutámico-oxálica (GOT) en donde L-Aspartato reacciona con α -cetoglutarato en presencia de ASAT formándose Oxaloacetato y Glutamato, donde el Oxaloacetato producido es reducido por la enzima MDH con la consiguiente oxidación de NADH a NAD⁺. Se midió también la transaminasa glutámico-pirúvica (GTP), en donde L-alanina en presencia de esta transaminasa forma Piruvato y Glutamato, por lo que el Piruvato producido es reducido por la enzima LDH con la consiguiente oxidación de NADH a NAD⁺ y ambas actividades de transaminasas se midió determinando la disminución de la absorbancia a 340 nm en la medida que NADH se oxidó a NAD⁺ por el método de Reitman- Frankel.

La medición de índice hepático se realizó al momento previo de la eutanasia, donde se recolectó el dato de peso de las ratas y el posterior a este evento, se extrajo el tejido hepático y se pesó en la balanza recopilando, los datos para cuantificar la relación peso rata/ hígado de los distintos grupos.

6.4.1 Medición de proteínas séricas

Se medieron los niveles séricos de; transaminasa glutámica oxalacética (AST) y transaminasa glutámico piruvato (ALT) mediante kit de diagnóstico específico (Valtek[®], Chile).

6.5 Diseño de Partidores

Tabla 3. Algunas de las secuencias de nucleótidos de los cebadores propuestos para ser utilizados para RT-PCR en tiempo real.

Genes	Primers	
TNF- α	F	TCTCATTCCCTGCTCGTGG
	R	TGTCACTCGAGTTTTGAGAAG
IL-1 β	F	ATCTCGACAAGAGCTTCAGG
	R	GGAACATCACACACTAGCAG
IL-4	F	TCACGTCCTGACTGTAGAGAG
	R	TGCCGTAAGGACGTCTGGTA
IL-10	F	TTACCTGGTAGAAAGTGATGC
	R	CCTTTGTCTTGGAGCTTATT

Para generar un primer, se recomienda entrar a NCBI y buscar en “nucleótido”, donde escribe el nombre del gen y la especie que busca en este caso de *Rattus norvegicus*, si lo encuentran se clickea donde dice FASTA y luego “pick primers” donde se identificaron los siguientes requisitos: de 8 a 22 Nucleótidos; Tm óptimo (57°C aprox); que no genere dímeros, ya que estos interfieren en la qPCR de forma que no se expresa una curva exponencial; GC% bajo, ya que un porcentaje alto puede afectar a la eficacia de la PCR debido a la tendencia de estas plantillas a plegarse en estructuras secundarias complejas y que no tenga amplicones, que puedan generar horquillas.

6.6 Aislamiento de ARN

La técnica utilizada en el laboratorio para aislar ARN fue la del método del Trizol, un solvente basado en el isotocianato de guanidina fenólico que, al homogenizarse con la muestra de hígado a estudiar, rompe la célula y solubiliza RNA y DNA. Posteriormente se adicionó cloroformo, el cual separó el homogenizado en líquido acuoso (ARN) y en una capa orgánica inferior (ADN y proteínas). Luego, se llevó a otro tubo la fase acuosa y el ARN se precipitó de la fase acuosa con Isopropanol, incubándolo en hielo para que no se degradara. Se removió el sobrenadante y se le agregó etanol 75%, se aplicó vórtex y se centrifugó a 7500 RPM por

15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet de ARN durante 5 minutos a 55°C, luego se resuspendió el pellet de ARN con 60 µl de agua DEPC y se incubó en calor seco a 55°C durante 15 minutos. Luego se procedió a cuantificar en el equipo de Nanodrop, el cual mide la concentración de ARN y además mide si hay contaminación de proteínas o si hay solventes que interfieran en la calidad del producto (ARN a 260 nm; proteínas 280nm; solventes a 230 nm). A las muestras óptimas (Relación de absorbancia a 260/280 cercana a 2) se les realiza una corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1 % con la muestra y buffers de carga, con el fin de evaluar la calidad del ARN (usando SAFE VIEW como sistema de marcaje).

El ARN total se aisló del hígado congelado de 20-30 mg utilizando RNAqueous®-4pcr Kit (Ambion, Thermo Scientific). Después de la determinación de la concentración de ARN total (absorbancia a 260 nm de ARN 1 µg), se agregó transcriptasa inversa para formar el ADNc respectivo.

6.7 Real Time PCR (qPCR)

Para el PCR cuantitativo en tiempo real, se utilizaron cebadores específicos de genes para TNF- α , IL 1 β , IL-4, IL-10. Se realizó la amplificación cuantitativa, utilizando el Brilliant II SYBR Green qPCR Mastermix (Stratagene, Agilent Technologies, EE. UU.) acoplado a un sistema qPCR Mx3000P (Stratagene). Los cebadores (Fermelo Biotec, RM, Chile) fueron los mostrados en la Tabla 3. Las muestras se amplificaron en triplicado, utilizando GAPDH como *housekeeping*. El protocolo de amplificación fue: 95°C durante 10 min, y luego 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 57°C durante 20 s y 72°C durante 20 s. La disociación posterior a la amplificación defusión, se hizo a temperaturas de 55 a 95°C. El umbral de ciclo (CT) fue calculado automáticamente por el software qPCR de Agilent. La expresión relativa del pliegue se calculó utilizando el método $2^{\Delta\Delta CT}$, después de normalizar el ARN de 18S.

6.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm SD para los 5 animales por grupo. La importancia estadística de las diferencias entre dos o más grupos fue determinada por la prueba de una vía de ANOVA y Newman-Keuls. Cuando fue apropiado, se utilizó la prueba t de Student para comparar solo dos grupos. Un valor de $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Para fines estadísticos, se utilizó el software Graphpad Prism versión 9 (Graphpad, San Diego, CA, EE. UU.).

6.9 Financiamiento

Esta memoria fue financiada a través del proyecto Fondecyt Iniciación N° 11200258, cuya investigadora responsable es la Dra. Bq. Jessica Zúñiga Hernández.

7. RESULTADOS

7.1 Curvas de crecimiento con relación al peso corporal.

Se analizó el promedio de masa corporal de los distintos grupos del estudio cada semana, con un total de recolección de 9 semanas de datos. Al final del estudio, no se observan diferencias significativas entre cada uno de los grupos de estudio y todos los grupos presentan un peso (crecimiento) similar al observado para el grupo control. La gráfica de este resultado se muestra en la figura 4.

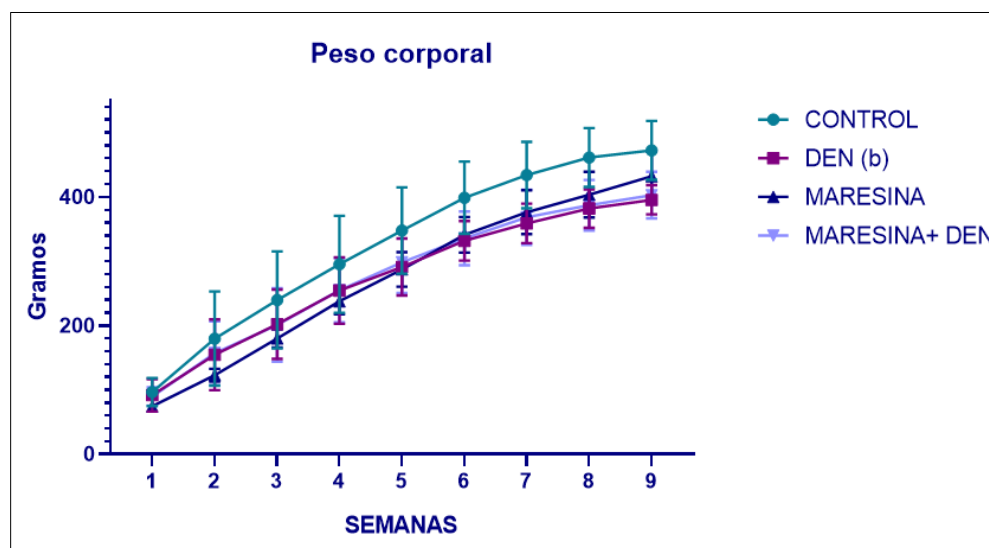


Figura 4. Promedio de crecimiento de masa corporal en cada grupo de ratas utilizadas en el experimento. Las diferencias significativas entre grupos (Control, DEN, Maresina y DEN+ MaR1) determinadas por las pruebas One-way ANOVA seguida del test de Newman-Keuls, y la significancia entre grupos ($p < 0,05$) fue determinada mediante el test-t Student. Todos los puntos representan la media \pm desviación estándar para 5 animales por grupo.

7.2 Índice hepático

Se analizó el porcentaje de relación entre el peso animal frente al peso de los hígados, lo que es conocido como *índice hepático*. Este índice fue determinado para cada grupo de ratas del estudio al momento de realizar la eutanasia, en donde luego se realizó un promedio de los índices de cada grupo y se puede observar que no existen diferencias significativas entre cada uno de los grupos de estudio. Sin embargo, se puede observar que el grupo DEN presenta un aumento del tejido hepático (mayor índice hepático) en relación a los demás grupos experimentales (Control, MaR1 y DEN + MaR1). Ver figura 5.

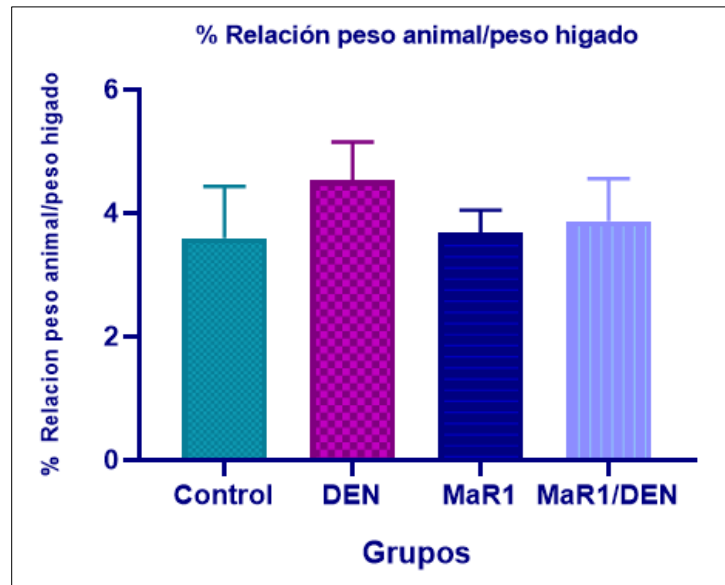


Figura 5. Porcentaje de relación peso animal con peso de hígados en cada grupo de ratas del estudio. Las diferencias significativas entre grupos (Control, DEN, Maresina y DEN+ MaR1) determinadas por las pruebas One-way ANOVA seguida del test de Newman-Keuls, y la significancia entre grupos ($p < 0,05$) fue determinada mediante el test-t Student. Todas las columnas representan el promedio \pm desviación estándar para 5 animales por grupo.

7.3 Niveles de AST y ALT en cada grupo de ratas en estudio.

En la figura 6A y 6B se observan los niveles de transaminasas ALT y AST, las cuales presentan un aumento significativo en el grupo de daño (DEN) comparado con los controles. Además, es posible observar una disminución estadísticamente significativa en el grupo MAR1-DEN, si comparamos el grupo daño (DEN), grupo b contra d.

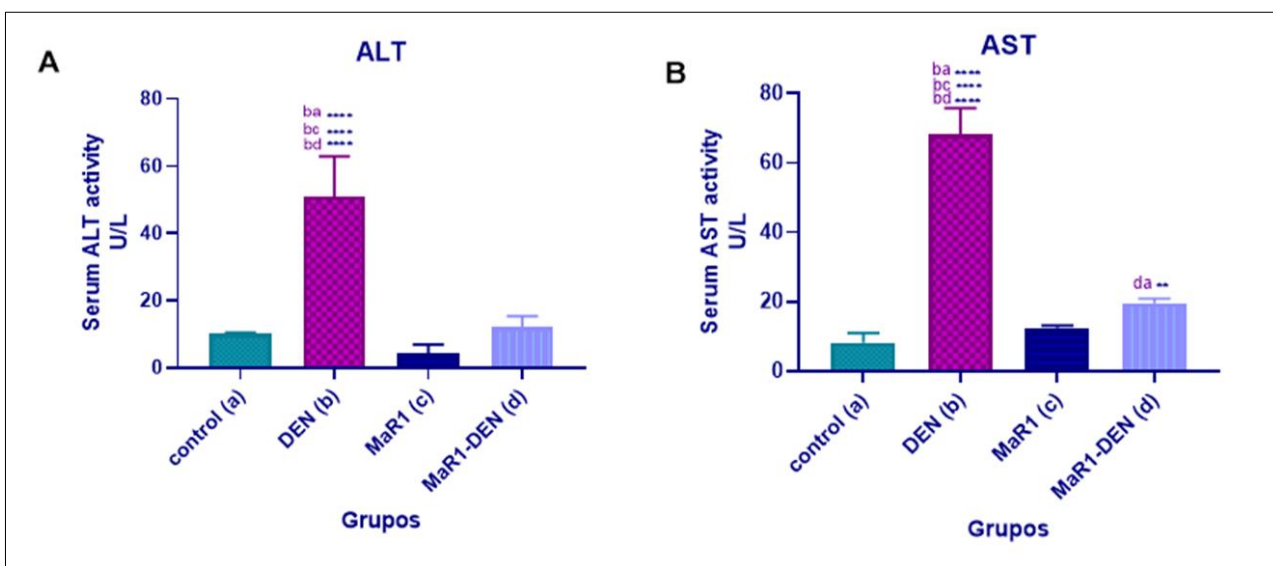


Figura 6. Efecto de Mar1 sobre los niveles séricos de (A) alanina aminotransferasa (ALT), (B) aspartato aminotransferasa (AST) después de la administración de DEN. Los datos se expresan como media \pm SD de 5 animales por grupo experimental. El * significa $p < 0,05$.

7.4 Diferencias de expresión citocinas pro y antiinflamatorias en relación con GAPDH en cada grupo de ratas en estudio.

Se analizaron los niveles de expresión cuantitativas para las citoquinas proinflamatorias *TNF- α* e *IL-1 β* (Figura 7A y B), utilizando como control la *GAPDH*, por lo tanto, todo fue normalizado con relación a *GAPDH*. En ambos niveles de expresión de las citoquinas proinflamatorias (*TNF- α* e *IL-1 β*) no se observan diferencias significativas en los grupos de daño frente al grupo tratamiento, (Figura 7) Lo que sí se ve a simple vista es un incremento en la expresión de *TNF- α* en el grupo de daño frente a los demás grupos, pero no lo suficientemente incrementado como para observar diferencias estadísticamente significativas. Además, en *TNF- α* es posible observar que el grupo c (MaR1) presenta una distribución muy amplia de sus datos, lo que impide hacer un buen análisis estadístico, debido a una desviación estándar muy elevada,

Se analizaron también los niveles de expresiones cuantitativas para los genes de las citoquinas antiinflamatorias *IL-10* e *IL-4* b (Figura 7C y D), utilizando como control el gen *GAPDH*. En ninguno de los niveles transcripcionales de los genes de las citoquinas analizadas se observan diferencias significativas en los grupos tratamiento frente al grupo de daño.

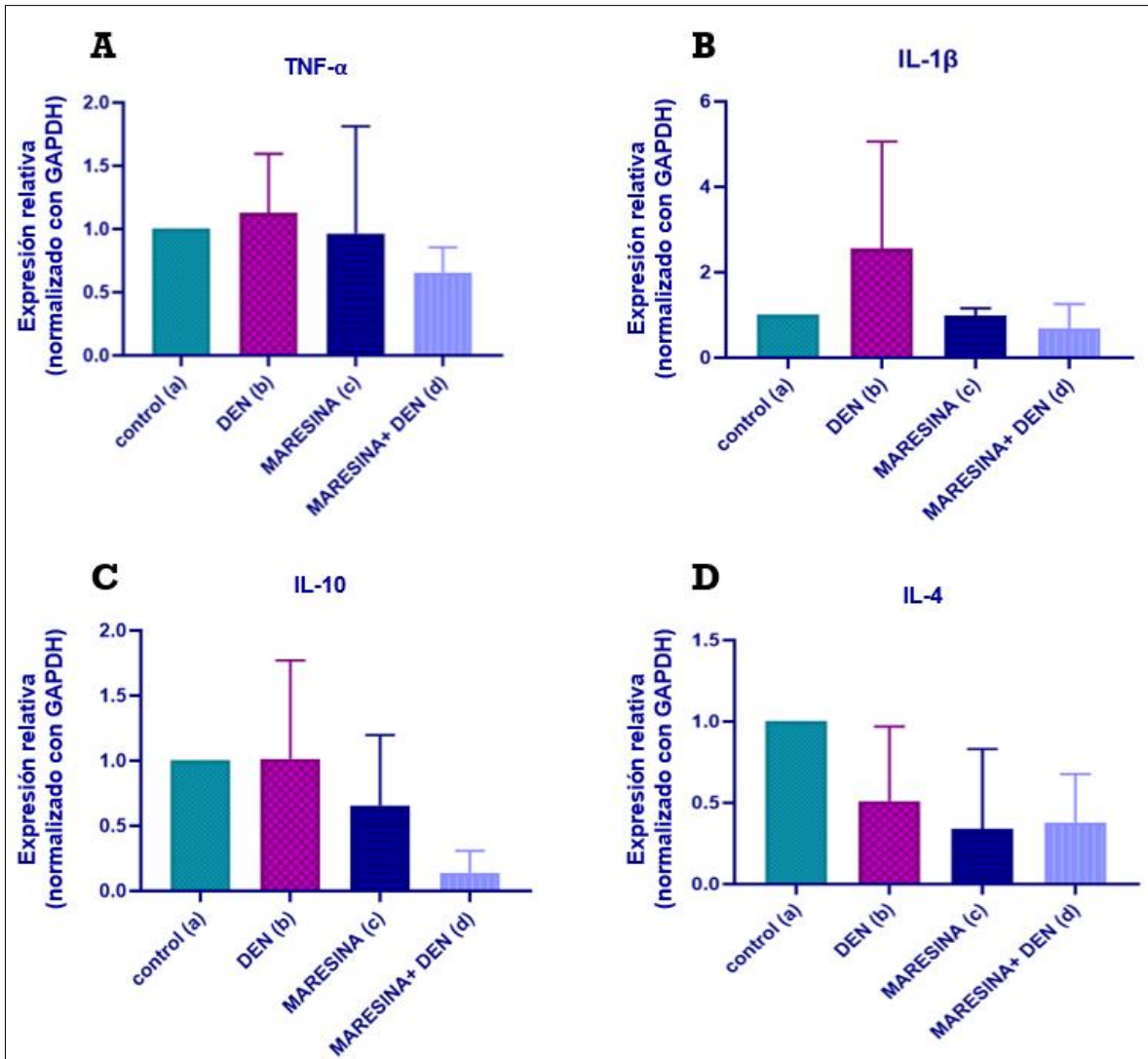


Figura 7. Cuantificación de los niveles de expresión de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-10 (C) y IL-4 (D) en modelo de fibrosis hepática enfrentada a MaR1. Las diferencias significativas entre grupos (Control, DEN y DEN+ MaR1) determinadas por las pruebas ANOVA unifactorial seguida del test de Newman-Keuls, y la significancia entre grupos ($p < 0,05$) fue determinada mediante el test-t Student. Todas las columnas representan el promedio \pm desviación estándar para 5 animales por grupo.

8. DISCUSIÓN

La fibrosis hepática es un campo de gran interés clínico, pues su aparición es clave en la progresión de las hepatopatías crónicas. La fibrosis consiste en el depósito progresivo de colágeno y de otras proteínas de MEC que se observa en la mayoría de las enfermedades hepáticas crónicas. La aparición de fibrosis avanzada es un prerrequisito para el desarrollo de cirrosis, que además incluye nódulos de regeneración y alteraciones en la microcirculación hepática⁶⁶. Hoy en día, solo existe un tratamiento disponible que consiste en el trasplante hepático. Sin embargo, este método no siempre es posible debido a la limitada disponibilidad de órganos y la presencia de comorbilidades que coexisten en el órgano del donante.

En las últimas décadas se han realizado importantes avances en el conocimiento de la historia natural y patogenia de la fibrosis hepática, definiendo los factores que regulan la progresión de la fibrosis en diferentes tipos de hepatopatías crónicas, así como las bases celulares y moleculares responsables del acúmulo de colágeno en el hígado fibrótico. En los años 90 se realizaron prácticas en pacientes y en modelos experimentales, demostrando que la fibrosis hepática avanzada es un proceso hasta cierto punto reversible, estimulando el estudio de potenciales tratamientos antifibróticos. Hoy en día, la práctica terapéutica más eficaz para una disminución del progreso de la fibrosis hepática es la supresión total del agente causal. Sin embargo, se han desarrollado nuevas alternativas no invasivas en este campo, dando lugar a la identificación en modelos experimentales de diversos agentes con capacidad antifibrótica. En la actualidad, aún son escasos los estudios clínicos que prueben que las terapias analizadas sean eficaces y seguras, por lo que el valor de los estudios para sugerirlo como tratamiento es todavía bajo⁶⁷. En el contexto de nuevas opciones terapéuticas, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto antiinflamatorio y pro-resolutivo de MaR1 en tejido hepático en un modelo de fibrosis hepática inducida por DEN en ratas de cepa Sprague-Dawley. Las ratas fueron elegidas por ser animales ampliamente empleados como biomodelos, dada la semejanza con el modelo humano. Junto a lo anterior, es destacable que estas pueden crecer en un gran tamaño, obteniendo una mayor dimensión de sus órganos, pensando en la extracción adecuada de muestra para los ensayos correspondientes. Por otro lado, tienen un buen comportamiento y sencillo manejo, facilitando el trabajo al administrar los tratamientos intraperitoneales. A demás, es necesario que el animal no presente

agresividad, reduciendo los daños asociados a la manipulación de estos, como también los factores relacionados a estrés⁶⁸. Los rangos normales de referencia son una herramienta indispensable para la experimentación animal, permitiendo evaluar el estado higiénico sanitario de los animales, a su vez ayudan a establecer diferencias en el comportamiento de los parámetros de la fisiología animal durante los experimentos. Por otro lado, el modelo animal elegido es de suma importancia para comprender la patogénesis de la fibrosis hepática y la cirrosis, debiendo simular de la mejor manera posible estas hepatopatías. La administración de DEN induce daño hepático en ratas, imitando la progresión de la fibrosis hepática y cirrosis en humanos. En el modelo DEN el daño hepático y la necrosis ocurren en las áreas centrilobulares y periportales, con posterior formación de septos fibróticos centroportales. Por ende, este modelo es primordial para estudiar la progresión de la fibrosis hepática con bajas concentraciones de DEN. Los efectos tras la aplicación de una dosis semanal de 50 mg/kg de animal por 28 días son, la activación de HSC, células de Kúpffer, células sinusoidales, entre otras, produciendo la expresión de citoquinas proinflamatorias e infiltrado de células inflamatorias. Características que adquieren importancia en el análisis de las muestras.

Junto a lo antes descrito, es posible observar que la masa de las ratas se ve asociado al tamaño de sus vísceras y la relación entre ambas se conoce como *índice hepático*, el cual ayuda a verificar el resultado del modelo empleado, aunque según lo entregado en la Figura 5, no se presentaron diferencias significativas entre los grupos respecto al control, sin embargo se puede acotar que el grupo daño presentó un aumento de este índice, lo cual puede ser debido a alzas en la expresión de colágeno, y/o de la respuesta inflamatoria. En relación con el colágeno, este provoca que las fibras se retracten, provocando que los lóbulos y el órgano disminuyan su tamaño, deducción la cual podría ser respaldada con otros estudios como el análisis histológico del hígado, en donde al generarse inflamación, se debería observar un aumento de tejido fibrótico de posible paso a cirrosis. Por lo que, en este ensayo, la administración de MaR1 junto a DEN, no produjo mejoras significativas en relación al grupo tratado con DEN.

Uno de los objetivos específicos de esta investigación fue la medición bioquímica del daño hepático a través de la determinación de las transaminasas en las muestras sanguíneas. Las transaminasas son enzimas que se encuentran principalmente en el hígado, pero también en eritrocitos, células del corazón, tejido muscular y otros órganos, tales como páncreas y los riñones. La elevación de transaminasas en sangre es un proceso muy inespecífico que puede ocurrir en casi todas las enfermedades hepáticas y en numerosas extrahepáticas⁶⁹. Son enzimas hepáticas excretadas normalmente al torrente sanguíneo, pero su aumento anormal se debe principalmente a la presencia de hepatocitos dañados. El valor predictivo de la relación AST/ALT se ha validado en la enfermedad hepática no alcohólica, hepatitis viral crónica, colangitis esclerosante primaria y cirrosis biliar primaria y al hacer un diagnóstico en pacientes con hepatitis C con abuso de alcohol. Además, la ALT y la AST también pueden elevarse, aunque en menor medida, por problemas musculares, renales y cardíacos⁷⁰. Para el diagnóstico de fibrosis no se ha asignado aún un valor clínico, solo se estudian sumadas a otros parámetros como marcadores multicomponentes, siendo APRI uno de ellos. APRI considera valores de ASAT-recuento de plaquetas para el diagnóstico de fibrosis con una sensibilidad del:89% y especificidad del:75%. Otro parámetro es FIBROMAX, que considera variables como la edad del paciente, recuento de plaquetas, índice de protrombina, AST, γ 2-macroglobulina, presión arterial y nitrógeno ureico en sangre. FIBROMAX es capaz de describir la cantidad de fibrosis hepática en valores porcentuales de tejido fibroso dentro del hígado, con una sensibilidad del 81% y especificidad del 84%⁷⁰.

En humanos, los valores de referencia para transaminasas son menores a <40UI/L, aunque estos pueden variar, dependiendo del laboratorio. En las ratas *Sprague-Dawley* se han realizado estudios con el objetivo de encontrar rangos de referencia. Según el estudio de Goñi, los valores de referencia corresponden a 65-250 UI/L (AST) y 25-80UI/L (ALT). Estos también varían, dependiendo del sexo y la semana de edad⁷¹. Según las mediciones realizadas para ALT, se produce un aumento significativo al comparar el grupo control con el grupo daño, por lo que esto indicaría que la enzima ALT se eleva en un modelo de fibrosis hepática. Además, al comparar el grupo de daño frente al grupo de tratamiento, también existe una disminución significativa por parte de este último, lo que podría indicar que MaR1 tendría un efecto sobre la disminución de la transaminasa ALT, sugiriendo un potencial efecto hepatoprotector. Con respecto a la enzima AST ocurre un caso semejante, donde existe un

incremento estadísticamente significativo al comparar el grupo control con el grupo de daño, por lo que la enzima AST se eleva en fibrosis y se confirma además al comparar el grupo control con el grupo estudio (droga protectora), en donde existe un incremento estadísticamente significativo por parte de este último, por lo que se podría afirmar que MaR1 tendría un efecto protector sobre la liberación de estas enzimas al torrente sanguíneo por parte de los hepatocitos dañados. Datos semejantes son mostrados en los resultados reportados por Li R y cols. en un modelo de fibrosis hepática inducida por CCl₄ en el cual MaR1 disminuye el nivel de ALT y AST en suero. Los autores encontraron que las actividades séricas de ALT y AST estaban elevadas 24 h después de la administración de CCl₄ en comparación con las del grupo control y el tratamiento con MaR1 0,3 y 1,0 µg/animal disminuyó las actividades de ALT y AST, en comparación con los del grupo tratado con CCl₄⁷².

Debido a los distintos efectos que provocan virus, parásitos, drogas, compuestos químicos, entre otros las técnicas diagnósticas se han tenido que ir expandiendo, siendo la qPCR en tiempo real una herramienta muy útil en el estudio de las citoquinas que se expresan en modelos de fibrosis inducidos por DEN en muestras de tejido hepático, en contraposición a los análisis de ELISA en suero (que no necesariamente representa la expresión de la respuesta a nivel del hígado). Pese a ser invasiva durante el proceso previo, la elección de la técnica a emplear es fundamental para encontrar respuesta a la fisiopatología en duda. Dentro de los cambios que puede sufrir el parénquima hepático durante una injuria, se encuentran esteatosis, fibrosis, inflamación, necrosis, entre otras. Es por esto por lo que la metodología empleada en la muestra debe ser minuciosa y específica, que permita analizar los elementos claves para un estudio acabado. Un ejemplo de esto es el análisis de las citoquinas antiinflamatorias como lo son IL-4, la cual tiene su origen en los linfocitos T activados y actúa preferentemente promoviendo la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B. IL-4 interviene de forma decisiva en la inducción de las células Th2 que regulan la inmunidad humoral y junto a IL-10 es producida por los linfocitos T de tipo Th2. IL-10 tiene capacidad de inhibir la síntesis de interferones (IFN) y de IL-2 por parte de los linfocitos T, siendo la principal citocina antiinflamatoria, función que ejerce a través de la inhibición de la síntesis de IL-1β, IL-6 y TNF-α por parte de los macrófagos⁷³. Es por esto que se esperaba obtener resultados elevados en los qPCR tiempo real, con un aumento significativo en el grupo MaR1, indicando una resolución de la inflamación y fibrosis, situación que no

fue posible determinar bajo nuestro análisis por qPCR. Por otro lado, se encuentran las citoquinas proinflamatorias, como lo son TNF- α la cual su expresión en un hígado sano es muy baja y sus funciones fisiológicas son relativamente pocas en comparación con su papel y su nivel de expresión frente a la fibrosis, demostrando la existencia de un importante sistema de regulación de su producción⁷⁴. Al ser liberadas, estas promueven la expresión de toda una variedad de factores tales como moléculas de adhesión, anafilotoxinas del sistema del complemento y quimioquinas tanto de los hepatocitos como HSC, facilitando la entrada de macrófagos y linfocitos a las zonas afectadas, promoviendo su adhesión y su activación, que vendrá a su vez asociada a la liberación de diferentes factores proinflamatorios como la caspasa-1 activada por el inflamasoma, lo que promoverá el procesamiento del precursor IL-1 β , promoviendo su activación, desencadenando una degradación de la MEC, facilitando la penetración de las células inmunitarias⁷⁵. Por lo tanto, se esperaba de estas dos citoquinas, un aumento significativo de su transcripción en el grupo daño frente al grupo control en este estudio.

Como se pudo observar en la figura 7A, los resultados obtenidos de transcripción de *TNF α* normalizado con *GAPDH* sugieren un cambio, el cual, si bien no fue significativo, se observó un poco más elevado en el grupo daño (DEN) frente a los demás grupos, generando el mismo efecto esperado por parte de la expresión de *IL-1 β* , Figura 7B. El que no se obtenga una diferencia significativa se puede deber a un error en la metodología, ya que se presentó además el desafío de generar una estandarización del método tanto de extracción de ARN, como de la programación y preparación de las concentraciones para generar los productos de qPCR en tiempo real. Para evitar lo anterior, es recomendable realizar ensayos con un número mayor de muestras para mejorar la fuerza estadística de nuestros resultados.

Por otro lado, los resultados que se hubieran esperado mediante la administración de MaR1, serían que el grupo estudio mostrara una disminución significativa al compararlo con un grupo daño, esto sería un indicador que MaR1 evitaría el cambio de fenotipo de HSC a una célula productora de colágeno como el miofibroblasto, como lo sería para las citoquinas *IL-10* e *IL-4* (Figura 7C y D) en donde debería observar un aumento en las transcripción relativa de estas, en los grupo MaR1 frente al grupo de daño y grupo control, pero en los cuales no se generaron resultados con diferencia significativa. Debido a que no se observaron

diferencias entre los grupos, sería óptimo analizar si a nivel sérico, la expresión de estos péptidos es posible observar el mismo patrón visto en nuestros estudios (mediante ELISA).

En resumen, los resultados obtenidos en esta memoria podrían contribuir a futuras investigaciones el beneficio del estudio de las enfermedades hepáticas, ya que MaR1 protegió frente a la liberación de transaminasas. A pesar de no obtener más resultados positivos, la literatura establece suficiente evidencia para pensar de que MaR1 puede jugar un papel contra la lesión hepática crónica mediante la reducción de la fibrosis, restablecimiento de la arquitectura, prevención del infiltrado inflamatorio de células polimorfonucleares y en la liberación de citoquinas (*IL-1 β* , *TFN- α*), así como también, en el aumento de la muerte celular mediante apoptosis de células dañadas y disminución de la división celular inducida por el daño en un modelo murino de fibrosis hepática, aumentando la expresión de citoquinas *IL-10* e *IL-4*.

9. CONCLUSIONES

1. El modelo de fibrosis hepática inducido por la administración de DEN presenta respuesta protectora *in vitro* a lo menos parcial, luego de la administración de MaR1.
2. La administración de MaR1 muestra un potencial efecto protector luego del daño inducido por DEN, al disminuir la liberación de transaminasas.
3. No se pudo comprobar el efecto MaR1 sobre las citoquinas proinflamatorias mediante la técnica qPCR real time, aunque sí una tendencia hacia la disminución de los niveles de TNF- α e IL-1 β en el grupo tratado con MaR1.
4. No se pudo comprobar el efecto MaR1 sobre las citoquinas antiinflamatorias mediante la técnica qPCR real time, debido a la alta dispersión de los datos, por lo que se recomienda hacer más repeticiones en futuros estudios, así como contrastar con niveles séricos de estas citoquinas por ELISA.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Camarena Grande, C. Hepatitis crónica. *Rev. Chil. pediatría* 73, 176–180 (2002).
2. Alonso, F. T., Garmendia, M. L. & de Aguirre, M. Análisis de la tendencia de la mortalidad por cirrosis hepática en Chile: Años 1990 a 2007. *Rev. Med. Chil.* 138, 1253–1258 (2010).
3. Rokusz A, Veres D, Szucs A, Bygyik E, Mozes M. La reacción ductal se correlaciona con la fibrogénesis pero no contribuye a la regeneración del hígado en modelos experimentales de fibrosis. *PLoS One.* 2017;12(4):e0176518
4. Hall JE. Guyton y Hall. *Tratado de Fisiología Medica.* 13th ed. Elsevier; 2014
5. Porth. *Fisiopatología Salud-enfermedad: un enfoque conceptual* 7ma edición. (2006).
6. Krishna M. Anatomía microscópica del hígado. *Clinica enfermedades hepáticas (Hoboken).* 2014 Enero 13;2(5):109-112. doi: 10.1002/cld.287.
7. Fierro A. Púrpuras. Trombocitopenia inmune primaria. *Pediatr Integral* 399–412 <https://www.pediatriaintegral.es/numeros-anteriores/publicacion-2012-06/purpuras-trombocitopenia-inmune-primaria/> (2012).
8. Sarem, M., Znaidak, R., Macías, M. & Rey, R. Células hepáticas estrella: su papel en condiciones normales y patológicas. *Gastroenterol. Hepatol.* 29, 93–101 (2006).
9. Kumar, V. Abbas, A. Aster, J. ; Robbins Cotran *Patología Estructural y Funcional* 9a_Ed_booksmedicos.org.pdf. 298–303 (2015).
10. Vera M., Nieto N. Células estrelladas hepáticas y hepatopatía alcohólica. *Rev. esp. enferm. dig.* 2006; 98(9): 674-684. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113001082006000900005&lng=es
11. Tholey, D. Estructura y función del hígado - Trastornos hepáticos y biliares - Manual MSD versión para profesionales. Manual MSD <https://www.msmanuals.com/es-cl/professional/trastornos-hepaticos-y-biliares/aproximacion-al-paciente-con-hepatopatas/estructura-y-funcion-del-higado>.

12. Slim CL, Lázaro-Diéguez F, Bijlard M, Toussaint MJ, de Bruin A, Du Q, Müsch A, van Ijzendoorn SC. PAR1B induce la herencia asimétrica de los dominios de la membrana plasma a través de la orientación mitótica dependiente de LGN en el proliferación de hepatocitos. *PLoS Biol.* 2013 Dec;11(12):e1001739. doi: 10.1371/journal.pbio.1001739. Epub 2013 Dec 17. Errata en: *PLoS Biol.* 2014 Jan;12(1). doi:10.1371/annotation/aacd66b6-d706-4f59-a79a-5d55f83d17ca. PMID: 24358023; PMCID: PMC3866089.
13. Tipos celulares. Hepatocito. Atlas de Histología Vegetal y Animal. <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/hepatocito.php>.
14. López Rocío. Algoritmos útiles para el diagnóstico histopatológico de la enfermedad hepática con base en los patrones de daño hepático. *Educ. Contin. hepatopatología* (2016).
15. Decker K. Productos biológicamente activos de macrófagos hepáticos estimulados (células de Kupffer). *Eur J Biochem* [Internet]. 1990;192(2):245–61. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033>.
16. Claria, J. & Titos, E. La célula de Kupffer *Gastroenterología y Hepatología*. <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-la-celula-kupffer-13059356>.
17. Zhang X, Yuan S, Zhang X, Zhang T, Meng C, Zhuang K. ANGPTL4 regula la expresión de CD163 y la polarización de las células Kupffer inducida por la cirrosis a través de la vía TLR4/NF- κ B. *Exp Cell Res* [Internet]. 2021;405(2):112706. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112706>
18. Wake K. Karl Wilhelm Kupffer y sus contribuciones a la hepatología moderna. *Comp Hepatol.* 2004 Enero 14;3 Suppl 1(Suppl 1):S2. doi: 10.1186/1476-5926-2-S1-S2.

19. Solís Herruzo, J. Factores involucrados en la fibrogénesis hepática | Gastroenterología y Hepatología. <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-factores-involucrados-fibrogenesis-hepatica-9819>.
20. Friedman, S. L. Regulación molecular de la fibrosis hepática, una respuesta celular integrada a la lesión tisular. *Diario de química biológica* vol. 275 2247–2250 (2000). DOI: 10.1074/jbc.275.4.2247. PMID: 10644669.
21. Sarem, M., Znaidak, R., Macías, M. & Rey, R. Células hepáticas estrella: su papel en condiciones normales y patológicas. *Gastroenterol. Hepatol.* 29, 93–101 (2006).
23. Kumar, V. Abbas, A. Aster, J.; Patología estructural y funcional 8va edición. (2010).
24. Cuthbert, J. A. Hepatitis A: Antigua y Nueva. *Microbiología clínica Revisión* vol. 14 38–58 (2001). doi: 10.1128/CMR.14.1.38-58.2001. Errata en: *Clínica Microbiológica Rev* 2001 Julio;14(3):642. PMID: 11148002; PMCID: PMC88961.
25. Shin EC, Jeong SH. Historia natural, manifestaciones clínicas y patogénesis de hepatitis A. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 Sep 4;8(9):a031708. doi: 10.1101/cshperspect.a031708. PMID: 29440324; PMCID: PMC6120688.
26. Galán F, Fernández C, Rodríguez M. Infecciones víricas. *Medicina (Madrid)*. 2014 Febrero;11(49):2885-2892. doi: 10.1016/S0304-5412(14)70711-5.
27. D'souza, S., Lau, K. C. K., Coffin, C. S. & Patel, T. R. Mecanismos moleculares de la hepatitis viral indujeron el carcinoma hepatocelular. *Diario Mundial de Gastroenterología* vol. 26 5759–5783 (2020). DOI: 10.3748/wjg.v26.i38.5759
28. Beaudoin, J. J., Liang, T., Tang, Q., Banini, B. Papel de las variantes del gen candidato en la modulación del riesgo y la severidad de la hepatitis alcohólica. *Alcohol. Investig. clínica y Exp.* 45, 45 (2021). <https://doi.org/10.1111/acer.14581>
29. Caballeria L, Torán P. “Epidemia de esteatosis hepática: un análisis desde la atención primaria”. *Aten Primaria.* 2019 Nov;51(9):525-526. doi: 10.1016/j.aprim.2019.09.002. PMID: 31718777; PMCID: PMC6945131.
30. Goh, G. B. B. & McCullough, A. J. La historia natural de hígado graso no alcohólico.

- Enfermedades y ciencias digestivas. vol. 61 1226–1233 (2016). DOI: 10.1007/s10620-016-4095-4. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27003142; PMCID: PMC7789914.
31. Velasco M. Implicación de los biomarcadores moleculares de inflamación endotelial y de disfunción endocrino metabólica en la clasificación patogénica de los pacientes con Síndrome Metabólico [Internet]. [Bilbao]: Universidad del País Vasco; 2016. Disponible en: https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/24767/TESIS_CARRASCAL_VELASCO_MARIA%20TERESA.pdf?sequence=2&isAllowed=n
 32. Lefere S, Tacke F. Macrófagos en la obesidad y la enfermedad del hígado graso no alcohólico: diafonía con el metabolismo. *JHEP Rep* 2019; 1: 30-43.
 33. Zhou, H. Ma, C., Wang, C., Gong, L. Avances de la investigación en el uso del monómero de la medicina tradicional china para el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico, *Revista Europea de Farmacología* vol. 898 173976 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173976>
 34. Saleem, A. Fruqan, M. Fahd, M., Saleem, M. Tendencias actuales en el tratamiento de la hepatitis C: intervenciones para evitar efectos adversos y aumentar la eficacia de los fármacos anti-VHC. *EXCLI J.* 15, 578 (2016). doi: 10.17179 / excl2016-582
 35. Alsahhar, J. S. & Elwir, S. Epidemiología y historia natural de la enfermedad hepática crónica. en *El paciente cirrótico crítico: evaluación y gestión.* 1–9 (Springer International Publishing, 2019). doi:10.1007/978-3-030-24490-3_1.
 36. Hako R, Kristian P, Jarčuška P, Haková I, Hockicková I, Schréter I, Janičko M. Evaluación no invasiva de la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis B o C crónica por imágenes de resonancia magnética mejorada en contraste. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2019 Apr 1;2019:3024630. doi: 10.1155/2019/3024630. PMID: 31058108; PMCID: PMC6463673.
 37. Shipley, L. C., Axley, P. D. & Singal, A. K. Fibrosis del hígado: una actualización clínica. *Rev. médica Eur. Hepatol.* 7 (1), 105–117 (2019).

<https://www.emjreviews.com/hepatology/article/liver-fibrosis-a-clinical-update/>

38. Gandhi, C. R. Activación de células estrella hepática y señales pro-fibrogénicas. *Revista de Hepatología* vol. 67 1104–1105 (2017). DOI: 10.1016/j.jhep.2017.06.001. Epub 2017 Sep 20. PMID: 28939135; PMCID: PMC5679016.
39. Tsuchida, T. & Friedman, S. L. Mecanismos de activación de células estrella hepática. *La naturaleza revisa la gastroenterología y la hepatología*. vol. 14 397–411 (2017). doi: 10.1038/nrgastro.2017.38. Epub 2017 May 10. PMID: 28487545.
40. Li, D. & Friedman, S. L. Fibrogénesis del hígado y el papel de las células hepáticas de estelar: nuevas ideas y perspectivas de terapia. *Revista de Gastroenterología y Hepatología (Australia)* vol. 14 618–633 (1999). doi: 10.1046/j.1440-1746.1999.01928.x. PMID: 10440206.
41. Mera C., Roa A., Ramírez S. Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación. *Rev. Cienc. Salud [Internet]*. 2007 Junio [citado 25 de abril de 2022] ; 5(1): 67-89. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732007000100007&lng=en.
42. Huang, Y., Deng, X. & Liang, J. Modulación de células estelares hepáticas y reversibilidad de la fibrosis hepática. *Investigación de células experimentales* vol. 352 420–426 (2017). doi: 10.1016/j.yexcr.2017.02.038. Epub 2017 Feb 24. PMID: 28238836.
43. Skowronska-Krawczyk, D. & Chao, D. L. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y degeneración macular relacionada con la edad. *Avances en experimentos de medicina y biología* vol. 1185 39–43 (2019). doi: 10.1007/978-3-030-27378-1_7. PMID: 31884586; PMCID: PMC7526619.
44. Sayanova, O. V. & Napier, J. A. Ácido eicosapentaenoico: rutas biosintéticas y potencial de síntesis en plantas transgénicas. *Phytochemistry* 65, 147–158 (2004). doi: 10.1016/j.phytochem.2003.10.017. PMID: 14732274.

45. Zárate, R., Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A. & Rodríguez, C. Significado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en salud humana. *Med. clínica y traduccional*. 6, (2017). doi: 10.1186/s40169-017-0153-6. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28752333; PMCID: PMC5532176.
46. Venegas-Calcrón, M., Beaudoin, F., Sayanova, O. & Napier, J. A. Los genes cotranscritos para la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en el protozoo *Perkinsus marinus* incluyen una FAE1 3-cetoacil coenzima A sintasa similar a una planta. *J. Biol. Chem.* 282, 2996–3003 (2007). DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.M607051200>
47. Calder, P. C. Los ácidos grasos n-3 de cadena muy larga y la salud humana: realidad, ficción y el futuro. en *Proceedings of the Nutrition Society* vol. 77 52–72 (Cambridge University Press, 2018). DOI: <https://doi.org/10.1017/S0029665117003950>
48. Morales J., Valenzuela R., González D., González M., Tapia G., Sanhueza J. Nuevas fuentes dietarias de ácido alfa-linolénico: una visión crítica. *Rev. chil. nutr.* [Internet]. 2012 Sep [citado 25 de abril de 2022]; 39(3): 79-87. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182012000300012&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000300012>.
49. Scorletti, E. & Byrne, C. D. Ácidos grasos omega-3 y enfermedad del hígado graso no alcohólico: evidencia de eficacia y mecanismo de acción. *Aspectos moleculares de medicina* vol. 64 135–146 (2018). doi: 10.1016/j.mam.2018.03.001. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29544992.
50. Dennis, E. A. & Norris, P. C. Tormenta de eicosanoides en infección e inflamación. *Naturaleza Reseñas de Inmunología* vol. 15 511–523 (2015). doi: 10.1038/nri3859.
51. Fullerton, J. N. & Gilroy, D. W. Resolución de la inflamación: una nueva frontera terapéutica. *Naturaleza Reseñas sobre el descubrimiento de fármacos* vol. 15 551–567 (2016). doi: 10.1038/nrd.2016.39. Epub 2016 Mar 29. PMID: 27020098.
52. Valenzuela R., Tapia G., González M., Valenzuela A. ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 (EPA Y DHA) Y SU APLICACIÓN EN DIVERSAS SITUACIONES CLÍNICAS.

- Rev. chil. nutr. [Internet]. 2011 Sep [citado 19 de abril de 2022] ; 38(3): 356-367. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182011000300011&lng=es.
53. Schwarzkopf, K., Queck, A., Thomas, D., Angioni, C., Cai C, Freygang, Y., Rüschenbaum, S., Geisslinger, G., Zeuzem, S., Welsch, C. Los niveles plasmáticos de ácidos grasos omega-3 y -6 no están asociados con la inflamación sistémica asociada a la cirrosis hepática. *PLoS One*. 2019 Jan 31;14(1):e0211537. doi: 10.1371/journal.pone.0211537. PMID: 30703151; PMCID: PMC6355116.
 54. Sanz A., Marí A., García K., García M. Propuesta de perfil de ácidos grasos omega 3 en nutrición enteral. *Nutr. Hosp.* [Internet]. 2012 Dic [citado 25 de abril de 2022] ; 27(6): 1782-1802. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000600004&lng=es.
 55. Macías C. Moléculas de adhesión: Importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 2006 Agosto [citado 25 de abril de 2022] ; 22(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892006000200003&lng=es.
 56. Serhan, C. N., Dalli, J., Colas, R. A., Winkler, J. W., & Chiang, N. (2015). Protectinas y maresinas: Nuevas familias de mediadores pro-resolución en la inflamación aguda y el metaboloma bioactivo de resolución. *Bioquímica y biofísica acta*, 1851(4), 397-413. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.08.006>
 57. Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF. Maresinas: Nuevos mediadores de los macrófagos con potentes acciones antiinflamatorias y prorrresolutivas. *J Exp Med*. 2009 Jan 16;206(1):15-23
 58. Saito-Sasaki N, Sawada Y, Nakamura M. Maresina-1 y Enfermedades inflamatorias. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 25;23(3):1367. doi: 10.3390/ijms23031367. PMID: 35163291; PMCID: PMC8835953.
 59. Li R, Wang Y, Zhao E, Wu K, Li W, Shi L. Maresin 1, a Proresolving Lipid Mediator,

Mitigates Carbon Tetrachloride-induced Liver Injury in Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:9203716

60. Deng B, Wang C-W, Arnardottir HH, Li Y, Cheng C-YC, Dalli J. (2014) Biosíntesis de la maresina e identificación de la maresina 2, un nuevo mediador antiinflamatorio y prorresolutivo de los macrófagos humanos. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102362>
61. Guo, Y., Xu, C. & Fang, Y. La actividad alta CYP2E1 agrava la hepatofibrosis al limitar la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M2. *Mol. Carcinog.* 58, 1481–1491 (2019). doi: 10.1002/mc.23029. Epub 2019 May 22. PMID: 31116889.
62. Han Y-H, Shin K-O, Kim J-Y. Un circuito autorregulador maresina 1/ROR α /12-lipoxigenasa previene la inflamación y la progresión de la esteatohepatitis no alcohólica. *J Clin Invest.* 2019;129(4):1684-1698. doi:10.1172/JCI124219
63. Soto G, Rodríguez MJ, Fuentealba R, Treuer AV, Castillo I, González DR, Zúñiga-Hernández J. Maresina 1, un mediador proresolutivo lipídico, mejora la lesión por reperfusión por isquemia hepática y estimula la proliferación de hepatocitos en ratas Sprague-Dawley. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares.* 2020; 21 (2): 540. <https://doi.org/10.3390/ijms21020540>
64. Sakaguchi, T. Kono, Y., Itaba, N., Morimoto, M. Isomoto, H., Shiota, G. Identificación de un nuevo compuesto de pequeña molécula desactivador de las células estrelladas hepáticas fibrogénicas. *Yonago Acta Med.* 63, 79 (2020). Doi: 10.33160 / yam.2020.02.013
65. Chiurchiù V, Leuti A, Dalli J, Jacobsson A, Battistini L, Maccarrone M, Serhan CN. Los mediadores lipídicos pro-resolución resolvina D1, resolvina D2 y maresina 1 son críticos en la modulación de las respuestas de las células T. *Sci Transl Med.* 2016 Aug 24;8(353):353ra111. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf7483. PMID: 27559094; PMCID: PMC5149396.
66. Rodes J, O. El libro de texto de hepatología: de la ciencia básica a la práctica clínica. 3rd ed. (2007).

67. Domínguez, M., Colmenero, J. & Bataller, R. Tratamiento de la fibrosis hepática. *Gastroenterol. Hepatol.* 32, 627–632 (2009).
68. Brower, M., Grace, M., Kotz, C. M. & Koya, V. Análisis comparativo de las características de crecimiento de ratas Sprague Dawley obtenidas de diferentes fuentes.. *Lab. Anim. Res.* 31, 166–173 (2015).
69. Mori T., Beilin L., Ácidos grasos omega-3 e inflamación. Informes actuales sobre aterosclerosis. 2004; 6(6):461-7.
70. Alvarado S., Castro L., Histología del hígado de ratas tratadas con una infusión de hojas de higuera (*Ficus Carica*): Reporte de caso. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias.* 2010;51:099-103
71. Goñi L., Blanco D., Peña A., Ronda M., González B., Arteaga M. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, CENP: SPRD. *REDVET Revista Electrónica de Veterinaria.* 2011;12(11)
72. Li R., Wang Y, Zhao E, Wu K, Li W., Shi L. La maresina 1, un mediador lipídico prerresolutivo, mitiga la lesión hepática inducida por el tetracloruro de carbono en ratones. *Medicina oxidativa y longevidad celular.* 2016;2016:13
73. Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. M. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Medicina Integral*, 39(2), 63–71. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-estructura-funcion-citocinas-13026682>
74. Sheng J, Zhang B, Chen Y, Yu F. La capsaicina atenúa la fibrosis hepática al dirigirse a la señalización Notch para inhibir la secreción de TNF- α de los macrófagos M1. *Inmunofarmacología Inmunotoxicología.* 2020 Diciembre;42(6):556-563. doi: 10.1080/08923973.2020.
75. Kamo N, Ke B, Ghaffari AA, Shen XD, Busuttil RW, Cheng G, Kupiec-Weglinski JW. La señalización ASC/caspasa-1/IL-1 β desencadena respuestas inflamatorias promoviendo la inducción de HMGB1 en la lesión por isquemia/reperfusión hepática. *Hepatología.* 2013 Jul;58(1):351-62. doi: 10.1002/hep.26320

