



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**EQUILIBRIO DE APOPTOSIS Y PROLIFERACIÓN EN EL HÍGADO
FIBRÓTICO POST-HEPATECTOMÍA PARCIAL AL 70% EN HÍGADO
DE RATA.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

EDUARDO GÓMEZ CORTÉS

DIRECTOR DE TESIS

DR. JUAN ANTONIO SUÁREZ CUENCA



Ciudad Universitaria, Ciudad de México, año 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PRESIDENTE: Profesor: JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

VOCAL: Profesor: GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA

SECRETARIO: Profesor: JUAN ANTONIO SUAREZ CUENCA

1er. SUPLENTE: Profesor: CAROLINA GUZMAN ARRIAGA

2° SUPLENTE: Profesor: CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: EL TEMA DE TESIS PRESENTE SE DESARROLLÓ EN LAS INSTALACIONES DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE METABOLISMO EN EL CENTRO MÉDICO NACIONAL “20 DE NOVIEMBRE” EN COLABORACIÓN CON EL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR DE LA UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. JUAN ANTONIO SUAREZ CUENCA

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. REBECA PEREZ CABEZA DE VACA

SUSTENTANTE:

EDUARDO GOMEZ CORTES

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO BAJO LA SUPERVISIÓN DEL DR. JUAN ANTONIO SUÁREZ CUENCA EN EL LABORATORIO DE METABOLISMO E INVESTIGACIÓN CLÍNICA EN LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL “20 DE NOVIEMBRE” ISSSTE.

SE REALIZÓ CON LA COLABORACIÓN DE LA MAESTRA EN CIENCIAS REBECA PEREZ CABEZA DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ÍNDICE	PÁGINA
I. RESUMEN	4
II. ABREVIATURAS	5
III. INTRODUCCIÓN	6
IV. ANTECEDENTES	7
4.1. Generalidades estructurales del hígado	7
4.2. Constitución celular del hígado	8
4.3. Desarrollo del tejido hepático y recambio celular	8
4.4. El daño hepático y la variedad de respuestas en el hígado	10
4.5. La reversión de la fibrosis y la hepatectomía parcial en la regeneración hepática.	12
4.6. Marcadores antiapoptóticos, proliferativos y de estrés oxidante relacionados con la regeneración del tejido hepático.	15
4.7. La hepatectomía parcial estimula la reversión de la fibrosis y su actividad proliferativa.	19
V. HIPÓTESIS	22
VI. OBJETIVOS	23
VII. MATERIALES	24
VIII. METODO EXPERIMENTAL	26
IX. RESULTADOS	31
9.1 Inmunohistoquímica de Bcl-2 en el parénquima	31
9.1.1 Morfología y detección de Bcl-2 en el parénquima del hígado normal e hígado con hepatectomía parcial en condiciones normales.	32
9.1.2 Morfología y detección de Bcl-2 en el parénquima del hígado fibrótico y en el parénquima del hígado fibrótico en regeneración.	32
9.1.3 Distribución e intensidad de Bcl-2 en el parénquima.	33
9.2 Inmunohistoquímica de Bcl-2 en la vena porta.	35
9.2.1 Morfología y detección de Bcl-2 en la vena porta del hígado normal e hígado con hepatectomía parcial en condiciones normales.	36
9.2.2 Morfología y detección de Bcl-2 en la vena porta del hígado fibrótico y en el hígado fibrótico en regeneración.	36
9.2.3 Distribución e intensidad de Bcl-2 en la vena porta.	38
9.3 Inmunohistoquímica de Bcl-2 en la vena central.	40
9.3.1 Morfología y detección de Bcl-2 en la vena central del hígado normal e hígado con hepatectomía parcial en condiciones normales.	41
9.3.2 Morfología y detección de Bcl-2 en la vena central del hígado fibrótico y en el hígado fibrótico en regeneración.	41
9.3.3 Distribución e intensidad de Bcl-2 en la vena central	42
9.4 Distribución e intensidad total de Bcl-2	44
9.5 Inmunohistoquímica del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en el parénquima.	46
9.5.1 Morfología y detección de PCNA en el parénquima del hígado normal e hígado con hepatectomía parcial en condiciones normales.	47
9.5.2 Morfología y detección de PCNA en el parénquima del hígado fibrótico en el hígado fibrótico en regeneración.	47

9.5.3	Distribución e intensidad de PCNA en parénquima.	48
9.6	Inmunohistoquímica de PCNA en la vena porta.	50
9.6.1	Morfología y detección de PCNA en la vena porta del hígado normal e hígado con hepatectomía parcial en condiciones normales.	51
9.6.2	Morfología y detección de PCNA en la vena porta del hígado fibrótico y en el hígado fibrótico en regeneración.	51
9.6.3	Distribución e intensidad de PCNA en la vena porta.	52
9.7	Inmunohistoquímica de PCNA en la vena central.	54
9.7.1	Morfología y detección de PCNA en la vena central del hígado normal e hígado con hepatectomía parcial en condiciones normales.	55
9.7.2	Morfología y detección de PCNA en la vena central del hígado fibrótico y en el hígado fibrótico en regeneración.	55
9.7.3	Distribución e intensidad de PCNA en la vena central.	56
9.8	Distribución e intensidad total de PCNA	58
9.9	Inmunohistoquímica de P22 en el parénquima.	60
9.9.1	Morfología y detección de P22 en el parénquima del hígado normal e hígado con hepatectomía parcial en condiciones normales.	61
9.9.2	Morfología y detección de P22 en el parénquima del hígado fibrótico e hígado fibrótico en regeneración.	61
9.9.3	Distribución e intensidad de P22 en el parénquima	62
9.10	Inmunohistoquímica de P22 en la vena porta	64
9.10.1	Morfología y detección de P22 en la vena porta del hígado normal e hígado con hepatectomía parcial en condiciones normales.	65
9.10.2	Morfología y detección de P22 en la vena porta del hígado fibrótico e hígado fibrótico en regeneración.	65
9.10.3	Distribución e intensidad de P22 en vena porta.	66
9.11	Inmunohistoquímica de P22 en la vena central	68
9.11.1	Morfología y detección de P22 en la vena central del hígado normal e hígado con hepatectomía parcial en condiciones normales.	69
9.11.2	Morfología y detección de P22 en la vena central del hígado fibrótico y en el hígado fibrótico en regeneración.	69
9.11.3	Distribución e intensidad de P22 en vena central.	70
9.12	Distribución e intensidad total de P22 en vena central	72
X.	DISCUSIÓN	74
XI.	CONCLUSIÓN	83
XII.	BIBLIOGRAFÍA	84

I. RESUMEN

La fibrosis es una característica crónica que tiene el hígado ante un daño prolongado y es el cuadro previo al desarrollo de enfermedades de alto riesgo como la cirrosis y el hepatocarcinoma. La fibrosis consiste en una deposición de matriz extracelular (MEC) que junto con la modificación de la arquitectura hepática tienen repercusiones en la capacidad proliferativa de los hepatocitos. Por otro lado el hígado fibrótico y cirrótico puede regenerarse después de una hepatectomía parcial al 70% (HP) con la cual se modifica el desarrollo de la fibrosis estimulando la regeneración del hígado y recuperando la arquitectura hepática funcional. La reversión de la fibrosis comprende un papel importante en la homeostasis del hígado y las respuestas que se originan a partir de esta remodelación estimulan los mecanismos de supervivencia, proliferación y muerte celular de los hepatocitos. El presente trabajo se enfoca en estudiar los marcadores de apoptosis, proliferación y estrés oxidante en el equilibrio de la proliferación y la apoptosis de los hepatocitos durante la remodelación de la matriz extracelular en el hígado fibrótico. Para lograr este objetivo se realizó un estudio histológico e inmunohistoquímico en hígados de rata Wistar que fueron tratadas con un suero porcino por vía intraperitoneal (IP) por 9 semanas, las cuales posteriormente fueron sometidas a una hepatectomía parcial al 70% y/o controles falsamente operados, seguido de una evaluación periódica de 1, 3, 7 y 30 días. Se realizó el análisis histológico e inmunohistoquímico de un marcador antiapoptótico de Bcl-2, un antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y un marcador de estrés oxidante de P22. De acuerdo a los marcadores se cuantificaron sus distribuciones e intensidad en diferentes estructuras que conforman al lobulillo hepático: El parénquima general, la vena porta y la vena central.

Se encontró que el hígado realiza dos fases en su proceso de regeneración conforme avanza la remodelación de la fibrosis, en la primera se estimula la proliferación de hepatocitos y otra en la que se regula el estímulo regenerativo. Durante los primeros 3 días post hepatectomía se observa que Bcl-2 en el hígado fibrótico en regeneración se encuentra en un 80% del tejido con una intensidad baja, asociado con una intensidad alta de PCNA y de P22, seguidos por la reducción de las fibras de colágeno en la estructura, la cual es imperceptible en el parénquima hepático. Por otro lado en las zonas perivasculares se observaron fibras de colágeno remanentes durante el proceso completo de regeneración. Se encontró que el tiempo en el que los hepatocitos responden a la hepatectomía parcial tiene una duración de 5 a 7 días y que a partir de este intervalo de tiempo la intensidad de Bcl-2 alcanza los niveles normales junto con una expresión de PCNA invariable durante la segunda fase pero menor que el nivel de expresión en la primera fase en vena porta y parénquima, pero en vena central la respuesta es rezagada manteniendo una intensidad elevada después de los 3 días post-hepatectomía, sin embargo el estrés oxidante tiende a disminuir conforme avanza la regeneración lo suficiente para equilibrar la proliferación y por lo tanto estabilizar la regeneración del hígado. La observación histológica describe que el estrés oxidante de la hepatectomía parcial estimula la regeneración iniciando con los hepatocitos periportales, y que este efecto se va distribuyendo hasta llegar a los hepatocitos de la vena central y que la remodelación de la MEC participa en la regulación durante la fase de terminación.

II. ABREVIATURAS

<p>ADN: Ácido desoxirribonucleico</p> <p>Akt= conocida como por sus siglas en inglés PKB es la proteína cinasa B</p> <p>CDK= Ciclina D cinasa</p> <p>Cyp2E1: Citocromo 2E1</p> <p>DAB: Diaminobencidina</p> <p>ERO: Especies reactivas de oxígeno</p> <p>HCV: Virus de la Hepatitis C</p> <p>HGF: Factor de crecimiento hepatocitario</p> <p>HP: Hepatectomía parcial</p> <p>HSC: Célula estelar hepática.</p> <p>IL-6: Interleucina 6</p> <p>IFN-γ: Interferón gamma</p> <p>JNK: c-Jun N-Terminal cinasa</p> <p>KC: Célula de Kupffer</p> <p>LPS: Lipopolisacáridos</p> <p>MEC : Matriz extracelular</p> <p>MMP : Metaloproteinasas</p> <p>NADH : Di nucleótido de adenina nicotinamida</p> <p>NF-κB: Factor nuclear κB</p> <p>NO: Óxido nítrico</p> <p>NOX: NADH oxidasa</p> <p>Nrf2: Factor nuclear 2</p> <p>PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos.</p> <p>PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferación Celular.</p> <p>PKC: Proteína cinasa C</p> <p>α- SMA: Actina de musculo liso α</p> <p>TIMPs: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas.</p> <p>TGF-β: Factor de crecimiento transformante.</p> <p>TNF-α: Factor de necrosis tumoral</p> <p>TK: Timina cinasa</p>	<p>PKC: Proteína cinasa C</p> <p>α- SMA: Actina de musculo liso α</p>
--	---

III. INTRODUCCIÓN

El hígado es uno de los órganos del organismo que realiza una diversidad de funciones vitales indispensables para el aprovechamiento, protección y homeostasis del cuerpo. Dado a sus múltiples funciones, su tejido adquiere características distintivas en comparación con los otros órganos, siendo uno de los tejidos con un ambiente celular variable pero estructuralmente organizado. El tejido hepático reúne distintas poblaciones celulares siendo los hepatocitos la entidad celular principal de su arquitectura, acompañadas a estas células se encuentran células endoteliales, macrófagos y otros que permiten la protección de la estructura hepática.

El hígado mantiene todas estas poblaciones en un equilibrio definido por las diferentes respuestas que tiene frente a todas las sustancias que ingresan a él, por lo cual intervienen funciones metabólicas e inmunológicas que alteran continuamente la estabilidad del tejido, pero gracias a la gran cantidad de alternativas que tiene este órgano para poder compensarlas tiene una gran capacidad regenerativa. Siempre que el hígado recibe un daño agudo puede activar mecanismos de curación manteniendo la integridad del hígado, siendo la respuesta más común la síntesis de fibras de colágeno en el punto de daño, pero el hígado puede llegar a alterarse progresivamente con daños prolongados provocando alteraciones crónicas que pueden impedir a este órgano reparar todas las zonas deterioradas concibiendo una patología grave como la cirrosis o el hepatocarcinoma, representando un riesgo para la vida de un paciente..

La fibrosis hepática es un proceso previo al desarrollo de la cirrosis generado por la activación de células estelares hepáticas (o por sus siglas en inglés HSCs), actualmente son un blanco que hoy en día tiene interés farmacéutico para tratar las enfermedades hepáticas. Sin embargo una de las opciones más frecuentes para regenerar el hígado es la remoción quirúrgica de una porción del tejido (hepatectomía parcial), lo suficientemente adecuado para que el hígado se regenere. De esta manera se ha visto que los procesos metabólicos como el estrés oxidante interviene con el restablecimiento de la homeostasis hepática, por lo que representa una sincronización entre las actividades de remodelamiento de la fibrosis y el desarrollo de los nuevos hepatocitos en el tejido.

El presente trabajo hace una exploración histológica de los mecanismos involucrados en la regeneración del hígado fibrótico y el equilibrio entre la proliferación, la apoptosis y el estrés oxidante durante el proceso.

IV. ANTECEDENTES

4.1 Generalidades estructurales del hígado

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo; posee un peso de 1.5 kg correspondiendo al 2% del peso corporal de un adulto. En las ratas Wistar maduras con un peso de 250g a 400g suele tener un peso de 9g correspondiendo del 3 al 4% del peso total del modelo animal.

La estructura anatómica del hígado en humanos está distribuida en un lóbulo derecho e izquierdo (1) mientras que en ratas se encuentra constituida por 4 lóbulos (2). En ambas especies el hígado se encuentra envuelto en una capa de tejido conectivo llamado **cápsula de Glisson**, el cual ingresa a través de un hilio común para dar lugar a los tabiques por los cuales corren los conductos biliares, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios intrahepáticos. Los tabiques dividen a cada lóbulo en cientos de lobulillos hepáticos, que se distinguen por ser estructuras cilíndricas parecidas a poliedros de 8 caras. Desde un corte transversal se observan estructuras hexagonales unidas que están conectadas por cada uno de sus vértices. Entre cada vértice se encuentran los espacios de Kiernan conteniendo al menos un conducto biliar, un vaso sanguíneo, un vaso linfático y fibras nerviosas (3)

El lobulillo hepático se constituye alrededor de una vena central, y además de ella se extienden radialmente las trabéculas de Remark formadas por los hepatocitos o células del tejido hepático localizados en torno de dicha organización. A través de las trabéculas de Remark se distinguen canalículos biliares diminutos entre las células adyacentes que drenan a los conductos biliares; estos discurren por los tabiques fibrosos que separan los lobulillos hepáticos.

El hígado se encuentra comunicado con el intestino a través de la vena porta, la cual se bifurca en diversas vénulas portales en el interior del hígado con el fin de ingresar la sangre venosa a un espacio permeable denominado **sinusoide hepático** apoyado por otro espacio reticular muy angosto denominado **espacio de Disse**, a través del cual se va irrigando la sangre y todo su contenido hacia el parénquima hepático para llegar a la vena central (Figura 4.1).

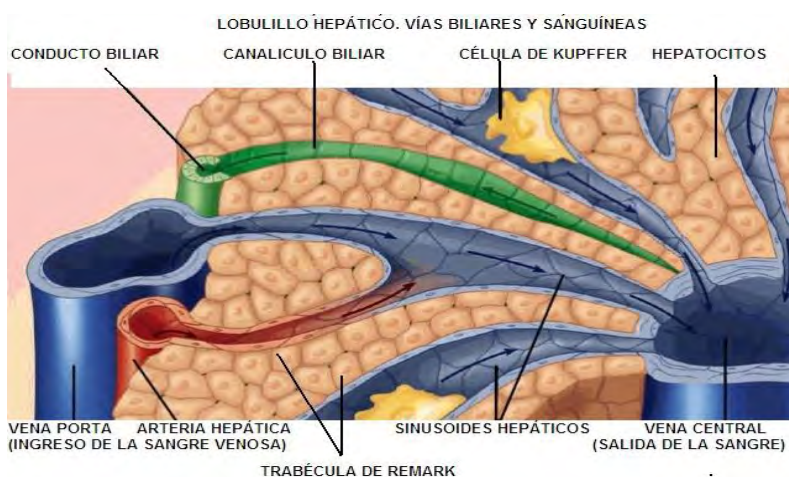


Figura 4.1 Lobulillo hepático y su circulación: la sangre ingresa desde la vena y arteria hepática irrigando por los sinusoides, el material se filtra a través del sinusoide y se absorbe por los hepatocitos. La sangre desemboca en la vena central (3)

4.2 Constitución celular del hígado

Dentro de la estructura sinusoidal no sólo se localiza un tapiz de hepatocitos, también existen otros tipos de células que trabajan en el microambiente del hígado para conferirle al mismo defensa, mantenimiento metabólico, señalización e integridad ante cambios crónicos y agudos a los que el tejido se ve expuesto.

Las actividades inmunológicas se ven controladas por poblaciones celulares especializadas comenzando por las **células de Pit** las cuales son un tipo de células *natural killer* (NK) capaces de actuar en la eliminación de células infectadas por virus o células tumorales (4). Las células Pit colaboran con las células de Kupffer, macrófagos residentes de la luz de los espacios sinusoidales (5). A diferencia de las células de Pit, las células de Kupffer comprenden un porcentaje mayor dentro de la población de células adheridas en el endotelio (6) por lo que son las primeras células en contacto con las bacterias, endotoxinas y otros derivados microbianos que provienen de la barrera intestinal y que son transportados vía portal (7).

Otras células que permanecen adheridas en el endotelio, son las células estelares hepáticas, que son consideradas como las células de Ito (en su forma quiescente) resguardando compuestos como vitamina A y otros lípidos; sin embargo suelen modificarse a un fenotipo fibroso transformándose en miofibroblastos capaces de sintetizar sustancias de naturaleza polisacárida y además proteínas fibrosas como el colágeno, es decir, componentes precursores de la matriz extracelular (MEC) (8).

Finalmente las células que proporcionan las funciones metabólicas y esenciales del hígado son los hepatocitos, cuya morfología indica que son células epiteliales poligonales con uno o más núcleos centrales y se encuentran acomodadas en placas gruesas celulares, a menudo se pueden observar hepatocitos poliploides y binucleados, principal característica que muestra la continuidad de sus ciclos celulares y desarrollo. La coordinación de sus ciclos celulares es la clave del recambio celular con el fin de mantener la homeostasis hepática (9)

4.3 Desarrollo del tejido hepático y recambio celular

El desarrollo y mantenimiento del tejido hepático comprende un tiempo determinado para poder conservar su viabilidad. Los hepatocitos como cualquier otro de tipo de células establecen un ciclo celular el cual puede responder a todas las demandas del tejido, por ejemplo: es capaz de modificar su crecimiento como respuesta a las demandas fisiológicas alteradas, tal como ocurre en el embarazo, lactancia o hiperfagia o crecimiento aditivo. Por otro lado también crece para compensar la pérdida de tejido hepático, lo que se considera como el crecimiento regenerativo (10). Mientras que el ciclo celular de los hepatocitos normalmente progresa cada 36- 48 horas, algunos hepatocitos al terminar su proliferación comienzan a preparar una segunda fase de crecimiento o G1, es decir que los hepatocitos permanecen hasta 8 horas (11) en esta fase trayendo consigo una proliferación continua aumentando su nivel de ploidía y obteniéndose hepatocitos binucleados (12).

Generalmente la poliploidia de células hepáticas se considera como indicador terminal de diferenciación y senescencia, también para señalar una pérdida progresiva de la pluripotencialidad y una disminución marcada de la replicación. En adultos la poliploidia es diferencialmente regulada sobre la pérdida de masa y daño hepático.

Mientras que en el ciclo normal el pico de proliferación se expresa dentro de las primeras 36 a 48 horas, en el hígado en regeneración el tiempo se reduce de 24 horas a 35 horas (13). Este efecto también puede ser distinto entre diferentes especies, por ejemplo, el hígado regenerante de la rata tiene su pico aproximadamente a las 24 horas (14) (15), en el ratón a las 48 horas (16) y en el cerdo a las primeras 72 horas (17). En el caso particular de los hígados humanos no se ha establecido totalmente un estudio de hepatectomía parcial del 70%, pero en diversos estudios clínicos se presume que el proceso regenerativo comienza tras las 24 horas continuando con una progresión apreciable de la regeneración durante 3 semanas después de una resección lobular hepática derecha (el lóbulo más extenso) al 80% y finalizando la regeneración de dicha porción después de los 6 meses de estudio (18).

Dentro de los factores de crecimiento conocidos que participan en la estimulación de la proliferación hepática se tiene el Factor de Crecimiento de Hepatocitos por sus siglas en inglés conocido como HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) que dirige la proliferación, supervivencia y la morfogénesis. El HGF tiene propiedades antioxidantes ya que se ha probado anteriormente en modelos animales afectados por la administración de etanol y se ha descrito que a nivel transcripcional regula componentes el sistema microsomal de oxidación, que representa el primer frente de defensa, mientras que el segundo nivel de protección es concebido por la expresión de proteínas antioxidantes y vías que promueven la supervivencia de los hepatocitos como la vía de Akt/NF- κ B que es la vía principal de proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-x y Mcl-1 junto con la activación concomitante de enzimas antioxidantes como la Catalasa, la Superóxido Dismutasa y la Gamma glutatión oxidasa gracias a las rutas de PKC o Nrf2 (19)

Por lo tanto, la reparación del tejido es un mecanismo altamente regulado por una red compleja de señales coordinadas, lo que implica por un lado que el microambiente responda para defenderse del daño a través de las células de Kupffer y por otro lado implica su regeneración con la participación de mecanismos que mantienen el balance regenerativo de los hepatocitos y de la reparación estructural que involucra a la células estelares hepáticas (HSC). Como consecuencia de todas estas actividades se tiene la secreción paracrina del HGF antes mencionado para controlar la apoptosis y prevalecer la supervivencia de los hepatocitos. Gracias a esto el HGF se ha propuesto como factor pronóstico del daño hepático ya que en sujetos con cirrosis se ha visto un aumento de su concentración en suero y más aún en hepatocarcinoma e infecciones por hepatitis C, además que presenta una correlación directa con marcadores conocidos para pruebas de daño hepático rutinarios (20)

4.4 El daño hepático y la variedad de respuestas en el hígado

Los estímulos como el estrés oxidante por parte de los xenobióticos, fármacos, agentes patógenos, los mecanismos metabólicos que con el tiempo van desarrollándose y las interacciones que tiene con diferentes sustancias contenidas en la sangre portal pueden alterar su funcionamiento involucrando respuestas sobre el control de la supervivencia, la inflamación y la proliferación del órgano. Cuando estos factores conducen alteraciones crónicas o excesivas se puede generar un espectro de anormalidades hepáticas partiendo desde tumefacciones grasas (esteatosis), acumulación de células grasas acompañadas de inflamación (esteatohepatitis) hasta la formación de cicatrices (fibrosis) que culminan con la destrucción de la estructura normal del hígado (cirrosis), y en un 80% de los casos desarrollándose a hepatocarcinoma.

Una de las causas comunes de daño hepático crónico es el consumo habitual y excesivo de alcohol, generando así una serie de patologías características importantes como la acumulación de moléculas de grasa en el tejido, acompañadas por la migración de células relacionadas con la inflamación lo cual juega un papel clave en el desarrollo y progresión de enfermedades hepáticas alcohólicas (21) (22)

Hoy en día se ha dado interés por las alteraciones de la pared intestinal como factor importante en el daño hepático y dentro de esta visión se ha determinado que en varios modelos experimentales (donde se modifica la barrera intestinal) se tiene como resultado una translocación de bacterias gram-negativas a la circulación portal induciendo la liberación de una gran cantidad de citocinas y otros mediadores activos pro-inflamatorios como el Factor de Necrosis Tumoral (denominado por sus siglas en inglés como TNF-alfa) debido a la activación de las células de Kupffer que responden a las endotoxinas o lipopolisacáridos provenientes de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. La interacción de estos factores en el tejido hepático promueven diversas respuestas fisiológicas que incluyen un conjunto de respuestas de fase aguda: hiperlipidemia, formación de radicales libres, fibrogénesis y colestasis (23)

En otros modelos experimentales de inducción de daño hepático por ingesta de alcohol se presentan cambios en los mecanismos de estrés oxidativo donde la expresión continua y elevada de CYP2E1 caracteriza el daño hepático en la hepatitis alcohólica. El daño hepático también se observa en alteraciones metabólicas como la diabetes y obesidad al presentarse cambios en los mecanismos de estrés oxidativo durante la hepatitis no alcohólica (24) iniciando por la generación de esteatosis y esteatohepatitis correlacionándose con la actividad de NADPH oxidasa, estimulando la síntesis de ácidos grasos y su oxidación.

En el caso del daño hepático generado por infecciones virales como el virus de la hepatitis C (o por sus siglas en inglés HCV) se han reportado eventos de acortamiento telomérico en hepatocitos. Los telómeros cortos inducen una senescencia en la replicación, un estado caracterizado por el arresto del crecimiento celular en la fase G1 (25). Considerando que los factores virales de este tipo de infecciones pueden participar tanto en las vías que promueven la replicación como en las que provocan el arresto de células en el estado de senescencia (26,27,28,29 y 30), lo que implica que a pesar de la presencia de marcadores de proliferación durante el cuadro de hepatitis crónica, la

actividad mitótica es escasa o ausente; por lo tanto a grandes rasgos la regeneración del tejido se ve impedida al tiempo que la infección viral aprovecha los mecanismos de replicación celular pero impide que los hepatocitos realicen su división celular y consecuentemente no realicen el recambio normal celular en el tejido (31), es por eso que a la hepatitis C se le considera como uno de los eventos patológicos más difíciles e irreversibles donde la regeneración se ve comprometida.

El daño inducido por fármacos y xenobióticos mimetiza todos los patrones observados en enfermedades hepáticas como la hepatitis aguda y necrosis cuyos efectos son reversibles y dependientes de la dosis administrada, ya sea directamente por el fármaco o indirectamente por sus metabolitos. Un caso común de daño hepático es el acetaminofén que es gracias a que sus metabolitos secundarios son hepatotóxicos, pero a diferencia del acetaminofén, la mayoría de los fármacos conducen un daño hepático dependiendo de las dosis administradas, es por eso que los daños se clasifican en categorías metabólicas e inmunológicas (32)

En el caso de los medicamentos, no siempre un xenobiótico pretende un daño hepático, otros medicamentos pueden beneficiar la regeneración o evitar cambios nocivos en el tejido hepático. A continuación presentamos algunos ejemplos de fármacos con efectos importantes en el daño y la regeneración hepática (Tabla 1).

Tabla 4.1 Fármacos que influyen en la homeostasis hepática

PRINCIPIOS ACTIVOS INVOLUCRADOS EN EL DAÑO HEPÁTICO		PRINCIPIOS ACTIVOS COADYUVANTES DE LA REGENERACIÓN Y HOMEOSTASIS HEPÁTICA	
Acetaminofén (33)	Cirrosis hepática	Ácido cafeínico (38)	Antioxidante: Inhibición de lipooxigenasa
Casprofungina (34)	Insuficiencia hepática Reducción de hemoglobina	Captopril (38)	Reducción de síntesis de hidroxiprolina
Pioglitazona (35)	Citotoxicidad	Curcumina (38)	Efectos antioxidantes
Sitagliptina (36)	Enfermedad de Child-Pugh clases A o B	Ditiocarbamato de pirrilidona (38)	Efecto antioxidante Inhibe la liberación de citocinas pro-inflamatorias
Metildopa (37)	Hepatitis y Cirrosis	Enoxaparina (39)	Previene la trombosis portal hepática

Evidentemente cuando hay un daño en el hígado sus causas pueden ser por varios factores que tienen que ser evaluados para ir descartándolos y otorgar un diagnóstico certero de la patología. Las pruebas más eficientes hasta hoy recurren a una evaluación histológica ya que pueden demostrar el estado y homeostasis del tejido en cuestión, principalmente contemplando los cambios en la morfología tisular y celular, al mismo tiempo incluyen la detección de marcadores que pueden describir la progresión de un daño crónico o el desequilibrio celular del tejido.

En principio se tiene una variedad de técnicas de tinción, un ejemplo para realizar un análisis morfológico y morfométrico del hígado es la técnica de tinción con tricrómico de Masson, en el cual es posible contrastar las estructuras de los distintos componentes de un tejido como núcleos, citoplasmas y tejido conjuntivo; en especial se distinguen las bandas de fibrosis de color azul del resto del tejido (40). La técnica es muy útil para determinar el grado de daño que ha recibido el hígado debido al desarrollo de bandas de fibrosis presentes.

Otro método para evaluar las respuestas del tejido hepático que se están llevando a cabo a nivel tisular y celular es la técnica de inmunohistoquímica que se basa en las propiedades antigénicas de las proteínas tisulares, y su detección por medio de anticuerpos marcados. En esta técnica se forma un complejo antígeno-anticuerpo que se conjuga con marcadores especiales, además este complejo se une a un anticuerpo secundario que tiene acoplada la enzima peroxidasa, la cual realiza una reacción óxido-reducción con la adición de diaminobencidina (DAB) y el peróxido de hidrógeno, produciendo un depósito marrón localizado en el tejido y que puede ser observado a través del microscopio óptico (3). Esta técnica tiene la ventaja de demostrar la distribución del marcador en distintos segmentos de la muestra y la intensidad de su expresión en diversas estructuras tisulares, así como también presentar diferencias de expresión de acuerdo al estado celular del tejido. A su vez una de las aplicaciones más comunes de la inmunohistoquímica es la detección de marcadores para el diagnóstico de cáncer.

Debido a las referencias anteriores en el presente trabajo de tesis se investiga la participación de diversos marcadores que pueden relacionar las actividades proliferativas y protectoras frente a la expresión de marcadores de estrés oxidante.

4.5 La reversión de la fibrosis y la hepatectomía parcial en la regeneración hepática.

Los componentes fibróticos de la matriz extracelular interactúan con las células hepáticas, por ejemplo las metaloproteinasas de matriz (MMPs), citocinas, y factores de crecimiento sostenidos en un balance enzimático importante en el mantenimiento de la homeostasis, morfología y función hepática (41). Sin embargo se sabe que hay respuestas inadecuadas que pueden ocurrir durante el daño crónico, resultando en la deposición excesiva de matriz extracelular (MEC) y la formación de cicatrices fibrosas, incluso progresando a una fibrosis avanzada (cirrosis) y el riesgo para hepatocarcinoma.

La acumulación de proteínas de matriz extracelular es un proceso dinámico reversible (42) ya que el recambio de los componentes de la matriz extracelular depende del balance enzimático entre las metaloproteinasas que degradan las bandas de colágeno y sus inhibidores tisulares específicos (TIMPs). Cuando hay un daño crónico hay menor remoción de fibras de colágeno, pero cuando se aplica una estimulación regenerativa se revierte el cuadro fibrótico degradando las bandas de colágeno y manteniendo la integridad original del tejido.

Dentro del campo de la investigación clínica, la técnica de hepatectomía parcial es un método de estimulación de regeneración hepática frecuente, ya que se puede tener un índice de regeneración en el análisis histológico, y observar el cambio anatómico y la ganancia de la masa orgánica de los modelos experimentales que se estén procesando. La técnica consiste en la remoción de un 70% de la masa hepática evitando las hemorragias internas. Se ha comprobado que con esta técnica el hígado libera diversos factores que estimulan la proliferación de los hepatocitos como el HGF, desencadenando cascadas que involucran a la vía de NF-kB. Posteriormente induce la reversión de la proliferación de células estelares hepáticas, principales fuentes productoras de matriz extracelular.

En un estudio sobre la aceleración de la reversión de la fibrosis hepática inducida por hepatectomía parcial en ratas (42) se indujo fibrosis con la administración de un suero porcino y se evaluaron parámetros como la ganancia de masa hepática, la actividad de tiamidinacinasasa (TK) en la fracción citosólicas y la estimulación del índice mitótico con microscopio óptico. En este trabajo citado se encontró que los hígados fibróticos recuperan el 80% de la masa original dentro de los 30 días después de la hepatectomía parcial comparada con grupos sanos. Además la síntesis de ADN determinada por la actividad de la timidina cinasa permanece elevada a los 3 días después de la hepatectomía parcial en los grupos sanos. Por el contrario los animales cirróticos muestran una cantidad menor de la actividad enzimática en comparación de los grupos sanos, al igual que sucede con el índice mitótico en el hígado fibrótico.

Las observaciones histológicas de este trabajo determinaron que las células estelares hepáticas se encontraban en su mayoría alrededor de las zonas perivasculares y distribuidas dentro de los septos fibróticos en el parénquima. Después de haberse suspendido la administración del suero porcino a los 3 días en los hígados del control fibrótico se pudo observar una rápida disminución de la expresión de alfa-SMA, el cual es un marcador de la proliferación de las células estelares hepáticas, a pesar de la persistencia de la banda fibrótica. Después de 7 días de la hepatectomía se fue observó una menor distribución de células estelares hepáticas así como de su proliferación. Finalmente a los 30 días tanto los grupos control como los grupos fibróticos en regeneración, es decir a los que se les indujo la hepatectomía parcial, presentaron una menor cantidad de depósitos de matriz extracelular en el parénquima y en las áreas perivasculares.

La evidencia de que la hepatectomía parcial estimula la resolución de la fibrosis inducida implica revisar los mecanismos que se involucran en el progreso de la regeneración durante la reversión de la fibrosis por la hepatectomía parcial y las condiciones en las cuales los hepatocitos comienzan a trabajar para iniciar la reconstrucción del tejido. Se ha postulado que durante la regeneración hepática la oxidación mitocondrial de prolina es restaurada, lo cual involucra el estado redox de NAD/NADH durante la regulación de la síntesis de colágeno y su degradación en el hígado fibrótico, indicando que la función mitocondrial se preserva en animales cirróticos y es susceptible a la estimulación por hepatectomía parcial. Por otro lado se ha pensado que la liberación de aniones superóxido generados por las células fagocíticas como las células de Kupffer pueden dirigir el microambiente a un estado de proliferación donde los hepatocitos aceleran su reproducción; Incluso se piensa que los hepatocitos tienen un mecanismo equilibrado entre la muerte celular y la proliferación ya que se tiene buen conocimiento de que el estrés oxidante puede cambiar el curso del microambiente

La vía de NF- κ B es un mecanismo determinante para conducir a los hepatocitos a la apoptosis y/o carcinoma o protegerlos asegurando su estabilidad gracias al comportamiento del estrés oxidante. Las células endoteliales que residen en los sinusoides hepáticos tienen un papel importante en el estado oxidante del ambiente sinusoidal, ellas controlan la perfusión de las especies reactivas de oxígeno sobre todo el óxido nítrico (o por sus siglas en inglés NO)-producto principal de la enzima óxido nítrico sintetasa- el cual tiene un papel protector y a la vez tóxico en las células. El NO puede actuar reaccionando directamente con diversas macromoléculas,

complejos metálicos y radicales libres o interactuando con iones superóxido (O_2^-)-producto principal de la NADH oxidasa-para generar intermediarios tales como trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) y peroxinitrito ($ONOO^-$). A Bajas concentraciones los intermediarios de nitrógeno participan en la reducción de necrosis hepática inhibiendo la generación de OH^- así como la inhibición del inicio o propagación de la lipoperoxidación reaccionando rápidamente con otros intermediarios. También se conoce su participación en el bloqueo de la apoptosis por medio de la remoción de factores de crecimiento o por la S-nitrosilación de varios miembros de la familia de las caspasas, incluyendo la caspasa 3 y 8. Por otro lado altas concentraciones de NO y por consiguiente aumentos en la cantidad de intermediarios reactivos conduce a la ruptura de cadenas de ADN e inducción de la lipoperoxidación (43, 44)

Los mediadores inflamatorios (IL-6 y $TNF-\alpha$), que participan en las vías que activan la muerte celular de los hepatocitos, como la vía JNK (45) pueden ser la fuente de la acumulación de EROs y esto lleva a una respuesta prolongada de la vía JNK teniendo como consecuencia un cuadro carcinogénico (46).

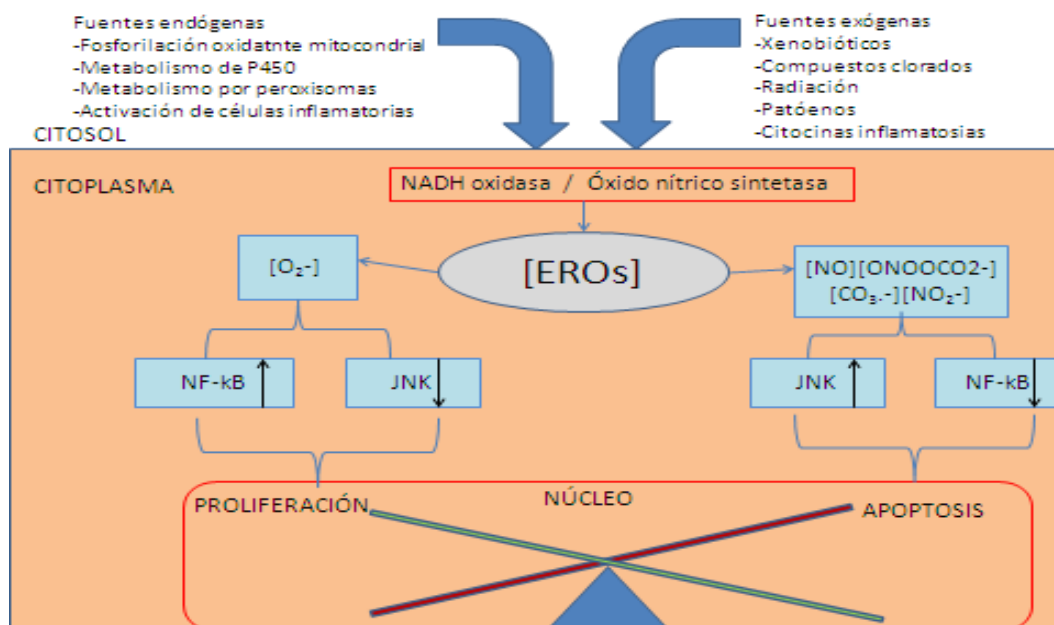


Figura 4.2. Influencia del estrés oxidante sobre la proliferación y muerte celular (apoptosis). NADH promueve la producción del radical superóxido (O_2^-) que ayuda a la activación de los factores de transcripción de la vía NF-kB y controlando la activación de la vía de JNK. La Óxido nítrico sintetasa es inducible por $TNF-\alpha$ y citocinas inflamatorias cuyos productos se relacionan con el daño celular y la activación de la apoptosis.

4.6 Marcadores antiapoptóticos, proliferativos y de estrés oxidante relacionados con la regeneración del tejido hepático.

4.6.1 Marcador antiapoptótico Bcl-2

Los miembros de la familia Bcl-2 son un grupo de proteínas que controlan la formación del complejo apoptosoma constituido por procaspasas determinadas para activar el mecanismo de apoptosis o muerte celular. Los miembros antiapoptóticos de esta familia secuestran proteínas del proteosoma y evitan la liberación de moléculas apoptogénicas de organelos como la mitocondria, algunos de estos miembros son Bcl-2, Bcl-x, A1 entre otros. Por otro lado esta familia tiene miembros proapoptóticos pertenecientes a la subfamilia Bax, Bad y Bak. Ambas subfamilias de Bcl2 presentan segmentos hidrofóbicos que las anclan con las membranas del retículo endoplásmico y la envoltura nuclear, así como en la membrana externa de la mitocondria orientados en el lado citosólico de cada una de estas estructuras subcelulares (47). Por lo tanto Bcl-2 se localiza principalmente en citoplasma.

Hay mucha evidencia de que la presencia de Bcl-2 en la mitocondria regula la homeostasis e integridad celular. Cuando Bcl-2 se sobre-expresa, se evitan los disturbios mitocondriales asociados a la apoptosis, como los cambios de pH, cambios de permeabilidad de la membrana y la ruptura de la integridad de la membrana externa. Por lo tanto las proteínas de Bcl-2 tienen como una de sus funciones principales la prolongación de supervivencia de las células bloqueando la apoptosis, y puede expresarse por células progenitoras en diversos tejidos que se regeneran así mismos, además también se expresa mucho en células tumorales en algunos neoplasmas extra hepáticos (48).

Algunas causas por las que Bcl-2 bloquea la muerte celular son: el efecto de fármacos quimioterapéuticos, radiación gamma y UV, infecciones virales, y lipoperoxidación. Mientras que Bcl-2 no bloquea la muerte celular en eventos como la lisis mediada por complemento, células T citolíticas y la acción del péptido β amiloide, así como también frente al daño celular por factores de inflamación principalmente por TNF- α . (49)

En cuanto al patrón de expresión tisular de Bcl-2 este se restringe a tejidos que requieren tiempos largos de sobrevivencia, pero en tejidos en constate regeneración es pronunciada su expresión. Se ha estudiado cómo el efecto protector de Bcl-2 y sus homólogos antiapoptóticos actúan durante la regeneración hepática tanto Bcl-2 como Bcl-X tienden a sincronizarse durante el periodo regenerativo. Se ha visto que los miembros antiapoptóticos declinan su expresión a nivel molecular apenas entrando a la fase G1. En un modelo experimental en ratas donde se pretendía determinar la expresión de Bcl-2 y sus homólogos durante la regeneración (50) se encontró que esta respuesta de protección regula indirectamente la cinética de la progresión del ciclo celular en la transición de G1 a S sobre todo por la sobrecarga energética metabólica generada por una resección hepática o hepatectomía parcial, aunque las actividades bioquímicas de dicha regulación siguen por determinarse. También es posible que lo miembros antiapoptóticos actúen protegiendo a los hepatocitos remanentes del estrés oxidante, por lo que promueven un efecto antioxidante en estas células y no en las células que se están regenerando.

4.6.2 Marcador de Proliferación: El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

El antígeno nuclear de proliferación celular (o por sus siglas en inglés PCNA) es una proteína auxiliar para la progresión de la DNA polimerasa δ , ya que en conjunto con PCNA dirige la síntesis de la cadena de DNA (51) fungiendo como marcador en la replicación celular. PCNA parece acompañar a otras moléculas, las cuales están involucradas en diversas vías metabólicas, incluyendo el procesamiento de los fragmentos de Okazaki, la reparación del ADN, metilación del DNA, remodelamiento de la cromatina y principalmente la regulación del ciclo celular (52). Esto promueve la idea de que PCNA funciona como soporte del complejo de replicación de la horquilla de replicación y también como molécula reclutadora de las diversas proteínas involucradas en el inicio para la formación del complejo de replicación. Además en conjunto con PCNA el proceso de replicación tiene una alta procesividad así como también una síntesis continua del ADN (53). La proteína se encuentra en diversas concentraciones dentro de la célula a través del ciclo celular y principalmente en grandes cantidades durante la fase S. Generalmente en inmunohistoquímica la proteína únicamente se localiza en el núcleo celular. A pesar de que PCNA es una proteína indispensable durante la replicación celular, es independiente de la ADN polimerasa, por este hecho PCNA puede expresarse en periodos anteriores a la fase S en una intensidad y concentración distinta.

PCNA es una proteína que interactúa con una gran variedad de proteínas que pueden dirigirla a un control general del ciclo celular, su unión a moléculas específicas no sólo ayuda a llevar a cabo los mecanismos de replicación y reparación del DNA, sino que su regulación contribuye de forma importante al arresto de células para que no continúen a la fase S. En este caso se ha determinado que PCNA tiene interacciones con complejos de CDK's durante la replicación y que debido a esto contribuye a la proliferación (54). Por otro lado hay una competitividad entre las proteínas que interactúan con PCNA para iniciar la replicación y las proteínas que se unen a ella para bloquear dicha interacción. La unión de p21, principal proteína para la senescencia, diferenciación y arresto celular, detiene la proliferación celular uniéndose a PCNA para que sea interrumpida la formación del complejo de replicación, lo cual conduce a la célula a un estado de senescencia y dirigirla a la apoptosis (55)

Otros estudios refieren a PCNA no sólo como indicador de la proliferación sino que sus señales pueden introducir información sobre la respuesta de PCNA en hepatocitos como un criterio que depende de la intensidad y distribución del marcador en cada una de las fases del ciclo celular (51)(Figura 4.3). Por ejemplo cualitativamente describen que una célula esta en G0 cuando no hay un marcaje con PCNA en su núcleo, en cambio una célula en fase G1 muestra una intensidad tenue y posteriormente en la fase S se percibe una intensidad de color muy intensa. Al contrario cuando una célula está en fase G2 y M la tinción es difusa y puede localizarse un poco en citoplasma.

CRITERIO DE INTENSIDAD DE PCNA EN EL CICLO CELULAR		
FASE	PATRÓN DE RESPUESTA	TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA
G ₀	Sin tinción en núcleo	
G ₁	Tinción dispersa tendiendo a uniformidad. Tenue coloración marrón.	
S	Tinción uniforme en el núcleo. Coloración marrón oscuro.	
G ₂	Tinción difusa en núcleo y parte del citoplasma. Coloración marrón oscuro.	
M	Tinción totalmente difusa en núcleo y citoplasma. Coloración marrón tenue.	

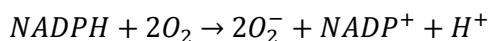
Figura 4.3 Criterio de fases del ciclo celular relacionado con la reacción inmunohistoquímica de PCNA (51)

4.6.3 Marcador de estrés oxidante p22

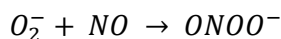
La generación fisiológica de especies reactivas de oxígeno puede ser el producto de otras reacciones biológicas. La generación de ERO ocurre con la mitocondria, peroxisomas y el citocromo P-450. Sin embargo la NADPH oxidasa fagocítica fue la primer enzima identificada como ejemplo de un sistema generador de ERO para poder realizar el estallido respiratorio en la eliminación de agentes patógenos gracias al reconocimiento de los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (conocidos por sus siglas en inglés como PAMPs).

P22 es una subunidad proteínica esencial en el ensamblaje del complejo de la NADPH oxidasa, enzima abundante en las células de Kupffer y en otras células polimorfonucleares. La enzima comienza por liberar una gran cantidad de radicales, que son convertidos rápidamente en peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y ácido hipocloroso (Ecuación 4.1) para la realización del estallido respiratorio. Se ha estudiado que la liberación del radical superóxido es una de las principales señales que pueden activar la vía de NF-κB al igual que su intervención en la vía de PKC, se piensa que estas dos vías pueden conducir a la estimulación de la proliferación del microambiente hepático (52). Al estrés oxidante se le asocia con el riesgo de carcinogénesis ya que la actividad de la NADPH oxidasa aumenta gracias a los mecanismos pro-inflamatorios, fibróticos y cirróticos agravando la genotoxicidad y citotoxicidad de los hepatocitos involucrando la presencia de EROs cómo los peroxinitritos (Ecuación 4.2) (53)

(Ec. 1) Reacción de NAPH oxidasa



(Ec.2) Formación de peroxinitritos



En el presente trabajo proponemos que si el estrés oxidante se ve aumentado en procesos reversibles como la fibrosis hepática, este mecanismo podría cambiar y regularse en la aceleración de la regeneración hepática.

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) tienen diversos efectos en relación con diferentes especies, concentraciones y tipos celulares. Las EROs tienden a ser compartimentalizadas en la célula y formar un gradiente de concentración que se origina desde de sus distintos sitios de generación (56). El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) puede difundirse a través de la membrana plasmática y a través de las células; sin embargo, el ión superóxido se difunde pobremente a través de las membranas plasmáticas (57). Altas concentraciones de EROs pueden ser citotóxicas, mientras que bajas concentraciones de EROs pueden servir como mensajeros secundarios durante las respuestas a la variedad de estímulos que el tejido presente. Una concentración moderada de H₂O₂ tiene efectos mitóticos y puede mimetizar la función de factores de crecimiento (58). Considerando los efectos de las ERO en las células estelares hepáticas, se han reportado resultados contradictorios induciendo propiedades mitóticas y apoptóticas. Los niveles no tóxicos de EROs o productos de lipoperoxidación estimulan la activación, proliferación, y producción de colágeno de las estelares hepáticas, pero altas concentraciones de EROs induce la muerte celular de las HSCs. La expresión de diversas isoformas de la NADPH oxidasa se ve incrementada en pacientes con fibrosis pulmonar, cardíaca y hepática. Sobre todo, las EROs mediadas por NADPH oxidasa son requeridas para modelos animales experimentales de fibrosis en varios órganos. En las HSCs, la NADPH oxidasa controla las respuestas fibróticas en respuesta a diversos agonistas, incluyendo Angiotensina II, Factor de Crecimiento Plaquetario, leptina y TGF-β, fagocitosis y cuerpos apoptóticos; Además en su estructura expresa componentes reguladores como p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, NOXO1, NOXA1, y Rac1 que mantienen las reacciones de la NADPH oxidasa (59). No solo es la activación de HSCs lo que promueve el estrés oxidante en el tejido, el resto de las células que componen el microambiente hepático controlan el desarrollo de la fibrosis hepática, ya que las NADPH oxidasas y sus isoformas se encuentran distribuidas en diferentes tipos celulares.

Las células de Kupffer expresan principalmente la NOX2 cuyos componentes reguladores incluyen a la subunidad p22^{phox} y tienen como componentes agonistas a diversos factores (como por ejemplo IFN-γ, Angiotensina II, y LPS) que promueven la fibrosis hepática por estimular la activación y diferenciación de las HSCs en miofibroblastos y la subsecuente apoptosis de los hepatocitos los cuales en el transcurso de la fibrosis son reemplazados por las células estelares activadas causando un daño hepático severo. Por otro lado las EROs resultantes (como el superóxido y peróxido de hidrogeno) sintetizadas por las NOX de KC y de células endoteliales

participan llevando a cabo la apoptosis o muerte celular, o acelerando la proliferación de células a causa de daños en el ADN y mutaciones (60).

4.7 LA HEPATOTOMÍA PARCIAL ESTIMULA LA REVERSIÓN DE LA FIBROSIS Y SU ACTIVIDAD PROLIFERATIVA.

El modelo en el que se fundamenta este estudio señala que el hígado puede recuperar su composición tisular al realizar una hepatectomía parcial al 70% asegurando que revierte la fibrosis inducida por la exposición crónica a un suero porcino (61)

El modelo de regeneración hepática tuvo como principal objetivo determinar si la respuesta regenerativa inducida por hepatectomía parcial del hígado fibrótico es apropiada para restaurar la matriz extracelular a sus características normales, restableciendo el balance entre la síntesis de matriz extracelular y su degradación, así como también explorar el rol putativo de las células estelares hepáticas en la modulación de estos procesos y la influencia de la remodelación en los mecanismos de proliferación, proponiendo que a lo largo que avanza la remodelación de la MEC se permite un mayor desarrollo de la actividad regenerativa (42)

El estudio de grupos sanos y fibróticos de ratas Wistar en donde a cada grupo se le practicó una hepatectomía parcial a diferentes tiempos (hasta un máximo de 30 días) comparados con grupos controles sanos y fibróticos sin hepatectomía parcial obtuvo datos como la ganancia de masa hepática, índice mitótico y la actividad de timidina cinasa para describir la progresión que tiene el tejido para regenerarse. Además datos como la determinación del contenido de colágeno y la inmunohistoquímica de α -SMA determinaron la proliferación de las HSCs. Finalmente durante el estudio se consiguió determinar la actividad dinámica de la fibrosis analizando la actividad de las Metaloproteinasas de matriz y sus inhibidores tisulares

Dentro de la morfología del tejido fibrótico, hay un incremento de fibras de colágeno, sobre todo demuestra mayor concentración en el grupo de la rata fibrótica sin hepatectomía. En cambio las alteraciones resultantes en las muestras de los grupos con hepatectomía parcial revelan una reducción del área del estroma quedando al final fibras de colágeno tipo I en los espacios perivasculares sin dividir todo el parénquima

Dentro de las modificaciones inducidas por el suero y la hepatectomía se comprobó que hay una reversión del tejido fibrótico desde un 20% hasta un 80%, y por lo tanto el grado de fibrosis disminuye su gravedad (62). Correlacionando estos datos con cantidades de prolina libre (precursor de colágeno) en las ratas control con hepatectomía se determinó un aumento de esta cantidad sugiriendo que no se lleva a cabo la síntesis de hidroxiprolina para incorporar las bandas fibróticas. La hepatectomía por lo tanto interrumpe este mecanismo demorando la oxidación de prolina paulatinamente hasta alcanzar un pico máximo a los 30 días de estudio.

La oxidación mitocondrial de prolina se va modificando al principio del proceso regenerante (disminución) y va restaurándose en los hígados fibróticos, lo cual concuerda con la intervención de la función mitocondrial y el estado redox de NAD/NADH en la regulación de la síntesis de

colágena y su rompimiento en el hígado cirrótico (63,64) indicando que la función mitocondrial sigue estando preservada en los animales cirróticos y que es susceptible a la estimulación por la hepatectomía parcial, así como ocurre en el hígado normal de la rata (65).

Se ha observado en otras investigaciones que la regeneración del hígado remanente en la presencia de cirrosis es insuficiente aún con la hepatectomía parcial. Varias propiedades han sido aclamadas por involucrase en la capacidad regenerativa disminuida mostrada en el hígado cirrótico. Por ejemplo, la lipoperoxidación inducida por la hepatectomía parcial en una resección masiva del hígado cirrótico puede que inhiba la activación de la respiración mitocondrial, decreciendo el estatus de energía (66); Sin embargo la conservación de las funciones mitocondriales sugiere que hay una recuperación o mantenimiento del estado energético por parte del estado redox de NAD/NADH, por lo que los mecanismos de las NOX mantienen la respiración mitocondrial, acelerando en poblaciones particulares de hepatocitos el ciclo celular y a su vez los mecanismos regenerativos del tejido. Esto se asocia a las observaciones de que marcadores como PCNA muestren un mínimo de señales en ciertas localizaciones del tejido hepático, proponiendo que aunque éste se encuentre en un estado cirrótico puede tener una capacidad variable para ejecutar la proliferación celular y tener las posibilidades de regenerarse (67).

Por otra parte la expresión de ARNm colágena α -1 desciende después de discontinuar la administración del suero porcino, pero la hepatectomía parcial parece acelerar el descenso de la expresión de los transcritos de colágena tipo I, por lo tanto la hepatectomía parcial reduce la síntesis de colágeno en la ratas cirróticas, pero incrementa ligeramente después de los 30 días post hepatectomía.

En cuanto a la degradación de matriz extracelular, al comienzo de la fibrosis la actividad de la colagenasa permanece sin modificación significativa, pero poco después de la hepatectomía parcial, el balance favorece la actividad colagenolítica persistiendo en niveles elevados de gelatinasas (principalmente pro-MMP-9 y MMP-2), y una baja expresión de inhibidores tisulares, favoreciendo la resolución de la fibrosis.

El análisis inmunohistoquímico y morfométrico por la tinción de Masson indica que las HSCs del hígado fibróticos después del tercer día de suspensión del suero dejan de proliferar y se distribuyen en las zonas perivasculares sin la degradación del septo fibrótico, y que el hígado fibrótico en regeneración aumenta la degradación de la matriz extracelular pero tiene una expresión mínima

La regeneración afecta a la matriz extracelular a través de los mecanismos que incluyen síntesis de colágena aumentada, activación de urocinasa, plasmina, y MMPs. En este contexto, está bien documentado que el balance MMP/TIMP es un determinante para el cambio de matriz extracelular y deposición de colágena (68). La expresión aumentada de MMPs Y TIMPs en el inicio de la fibrosis hepática juega un rol mayor en el remodelamiento dinámico de la matriz extracelular (69).

Durante la estimulación regenerativa inducida por hepatectomía parcial, el papel de las HSCs cambia durante el proceso regenerativo gracias a la hepatectomía parcial (70). De hecho, el estímulo para la activación puede que surja a partir de una lipoperoxidación controlada que ocurre durante la regeneración hepática (71,72), mientras que una disminución en el número de HSCs puede ocurrir ya sea por la reversión hacia un fenotipo quiescente o por la apoptosis, así como también las interacciones con las células de Kupffer que son mediadas por varias citocinas y factores de crecimiento (73). Apegados a que las HSCs detienen su desarrollo y proliferación gracias a la hepatectomía aún queda por mencionar los mecanismos que promueven el mantenimiento del nuevo tejido, es aquí cuando entra la proliferación de los hepatocitos.

Midiendo marcadores como la actividad timina cinasa (TK) en relación con la síntesis de DNA, se presenta un aumento máximo en su actividad en las primeras 24 horas y manteniéndose elevada hasta después de los 3 días post hepatectomía tanto en los controles positivos (Sano + HP) y en los fibróticos con hepatectomía (Fibrótico + HP). Lo cual coincide en que después de este pico los hepatocitos se están preparando para dividirse y así incrementar la masa del tejido hepático, después de las 72 horas, el hígado alcanza hasta el 80% de masa recuperada (Figura 4.4)

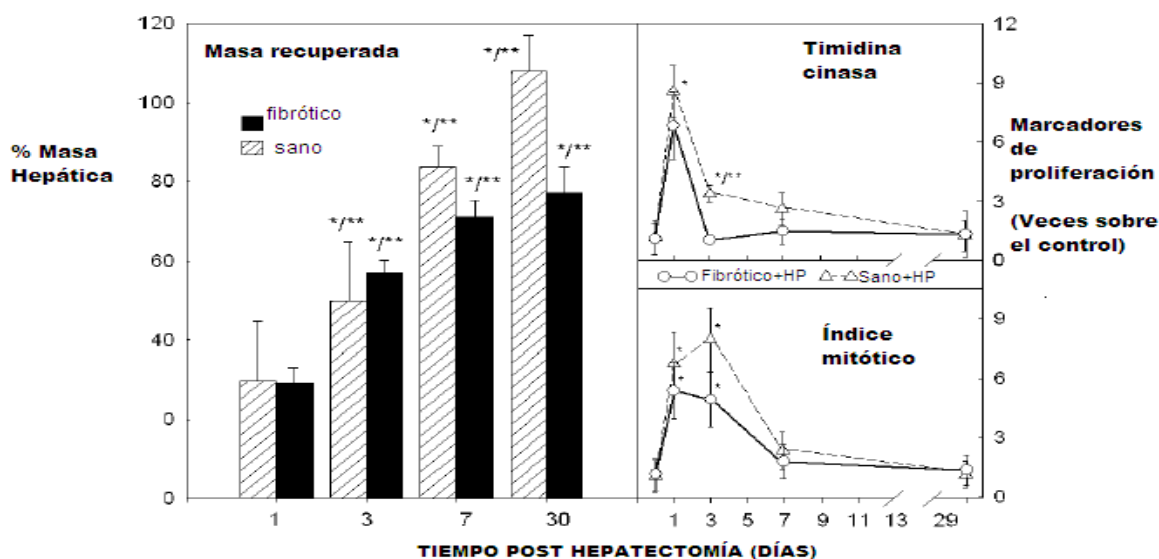


Figura 4.4. Regeneración celular inducida por hepatectomía parcial en el hígado fibrótico. Comparación de la recuperación de masa hepática después de la hepatectomía (panel izquierdo) y la actividad de timidina cinasa (panel derecho) e índice mitótico (panel derecho inferior) (52)

Los resultados del modelo citado indican que el tejido fibrótico reduce los depósitos de matriz extracelular o fibrosis y que la regulación de la MEC influye en las actividades proliferativas de los hepatocitos gracias a la hepatectomía parcial al 70%, por lo que la homeostasis del hígado es un proceso coordinado que requiere de eventos como la supervivencia, la proliferación de los hepatocitos, y los cambios del microambiente proporcionados por las funciones mitocondriales preservadas, es decir, el estrés oxidante durante la remodelación de la MEC.

Basado en los antecedentes mencionados, en este trabajo se propone la siguiente hipótesis.

V. HIPÓTESIS

En la fase temprana de la regeneración del hígado fibrótico existe un equilibrio adaptativo caracterizado por el incremento de PCNA y P22 junto a la disminución de Bcl-2, mientras que en la fase tardía, el equilibrio se caracteriza por recuperación de Bcl-2.

VI. OBJETIVOS

- 1.- Estudiar el modelo de regeneración hepática por la hepatectomía parcial.
- 2.- Caracterizar el equilibrio entre regeneración y apoptosis en el hígado fibróticos en regeneración
- 3.- Caracterizar por inmunohistoquímica la localización de Bcl-2 (marcador anti apoptótica), PCNA (marcador de proliferación) y P22 (marcador de estrés oxidante) en las diferentes estructuras del tejido hepático.
- 4.- Cuantificación de la respuesta de Bcl-2, PCNA y P22
- 5.- Comparar la respuesta de Bcl-2 y PCNA con la respuesta de P22.

VII. MATERIALES

7.1 Animales:

- 1) Ratas Wistar macho, con un peso inicial de 100- a 120 g, los cuales tuvieron acceso libre a agua y comida en un ciclo 12:12 horas luz: oscuridad. Los animales fueron administrados con suero porcino (3.5 ml/kg de peso corporal) vía intraperitoneal (IP) previamente tratado con calor y esterilizado por filtración (Millipore Corp^R., Bedford, MA) dos veces por semana durante 9 semanas (81,82). El grupo de ratas control fue administrado con solución salina. Posteriormente los animales cirróticos y sanos (control) fueron sometidos a una hepatectomía del 70% de acuerdo al método de Higgins y Anderson (45). Los animales se operaron en ayunas y fueron sacrificados con una sobredosis pentobarbital sódico a diferentes tiempos de cirugía, siguiendo las regulaciones federales para el cuidado y experimentación animal (Ministerio de Agricultura, SAGARPA, México)

7.2 Reactivos y Materiales

7.2.1 Fijación y obtención de muestras

- 1) Formaldehído al 8%
- 2) Portaobjetos de 76 x 26 mm DELTALAB, pre-tratados con recubrimiento de Poli-L lisina 1:10 (SIGMA).
- 3) Tamaño de cortes: grosor de 0.5 mm con micrótomo y embebidos en parafina
- 4) Pluma con punta de diamante para la identificación de laminillas

7.2.2 Desparafinación

- 1) Para retirar la capa de parafina con la cual los cortes están embebidos, se utilizó un microondas ACER a alta potencia por un tiempo máximo de un minuto y medio hasta observar que la parafina se encuentre en forma de gotas.

7.2.3. Deshidratación/Rehidratación

- 1) Alcohol etílico absoluto o al 100% (SIGMA-ALDRICH).
- 2) Alcohol etílico al 90% (SIGMA-ALDRICH).
- 3) Alcohol etílico al 70% (SIGMA-ALDRICH).
- 4) Alcohol etílico al 50% (SIGMA-ALDRICH).
- 5) Xilol (SIGMA-ALDRICH).
- 6) Agua bidestilada
- 7) Tren de alcoholes

7.2.4. Recuperación de Anticuerpos

- 1) Citrato trisódico deshidratado pH 6.0 (COSMOPOLITA): para preparar 1 litro de Buffer se disuelven 2.94 g de citrato trisódico en 1 L de agua destilada y llevar a pH 6.0 con HCl 0.1 N
- 2) Agua bidestilada
- 3) Microondas

7.2.5 Bloqueo, Incubación y Revelado

En el presente trabajo se utilizó el kit DAKO^R K4011 para inmunohistoquímica el cual incluye:

- 1) Marcador hidrofóbico DAKO pen (S2002)
- 2) Peróxido de hidrógeno al 0.03% que contiene azida sódica
- 3) Polímero marcado-HRP Anti-Rabbit en tampón Tris-HCl que contiene una proteína estabilizadora y un agente antimicrobiano.
- 4) Solución tampón sustrato a pH 7.5, que contiene peróxido de hidrógeno (DAB+SUBSTRATE)
- 5) Solución cromógeno líquido de 3-3'-diaminobenzidina (DAB+CHROMOGEN)
- 6) TBST 1X: Para preparar un litro se disuelven 2.42g de trizma base (SIGMA^R) y 8.0g NaCl (SIGMA^R) en 1L de agua con agitación y llevar a pH 7.6 con HCl 0.1 N. Se le adiciona a la solución 1 mL de Tween 20 al 0.1% (SIGMA)

Se utilizó un buffer para la dilución de anticuerpos (Dako Antibody Diluent S0809) de Tris-HCl que contiene una proteína estabilizadora y 0.015 mol/L de azida sódica.

7.2.6. Anticuerpos

Anticuerpos primarios

- 1) BCL-2 (Santa cruz, (N-19): SC-492) (1:100)
- 2) PCNA (Santa cruz, (FL-195): SC-7907) (1:100)
- 3) P22 (Santa cruz, (FL-195): SC-2078)(1:100)
- 4) Anticuerpo secundario Polímero marcado-HRP Anti-Rabbit (DAKO^R K4011) (1:100)

7.2.7 Observaciones y obtención de micrografías

La obtención de las imágenes se llevó a cabo con el microscopio de campo claro del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICB) e Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, así como también en la Universidad Panamericana (UP). La cuantificación de las muestras se llevó a cabo con el programa Image Pro Plus^R del Instituto de fisiología celular.

VIII. MODELO EXPERIMENTAL

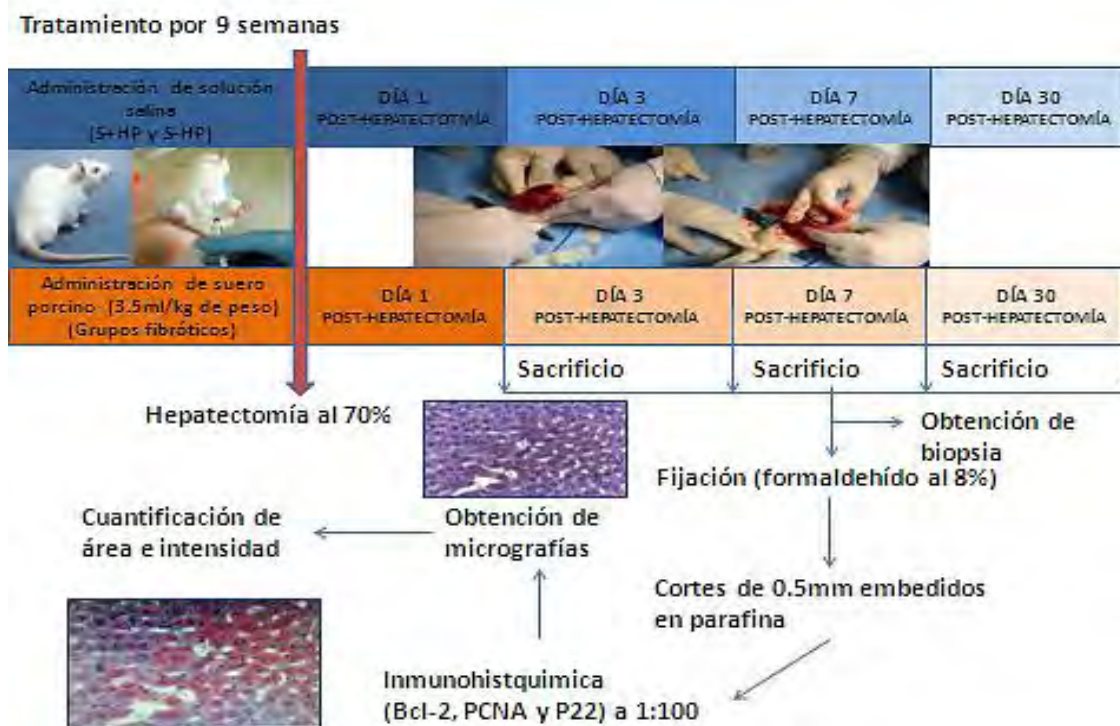


Figura 8.1. Esquema del modelo experimental de hepatectomía y análisis de marcadores antiapoptóticos, de proliferación y estrés oxidante.

Los modelos experimentales fueron 48 ratas macho Wistar del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con peso entre 100-120g, con libre acceso a agua y comida en un ciclo 12:12 luz: oscuridad. Se separan en 4 grupos (Tabla 8.1)

Tabla 8.1 Nomenclatura de los grupos de estudio.

Clave del grupo	Nombre del grupo
S-HP	Hígado en condiciones normales
S+HP	Hígado sano en regeneración
FB-HP	Hígado fibrótico
FB+HP	Hígado fibrótico en regeneración

Las ratas de los grupos fibróticos son tratados con una administración intraperitoneal (IP) de suero porcino a una dosis de 3.5 ml/kg peso, pre-tratada con calor y esterilizada por filtración logrando una cantidad proteínica de 58 mg/mL (50). El suero se administra 2 veces a la semana durante 9 semanas, mientras que las ratas Control son administradas con solución salina de forma paralela a las ratas fibróticas. Posteriormente a la administración del suero porcino, tanto en las ratas control o sanas como en las ratas fibróticas se realiza una resección o hepatectomía al 70% del tamaño del hígado, de acuerdo al método de Higgins y Anderson (45) con un día de ayuno antes del procedimiento quirúrgico.

Posteriormente se obtienen muestras agrupadas en 1 día post hepatectomía, 3 días post hepatectomía, 7 días post hepatectomía y 30 días post hepatectomía para cada grupo sano y fibrótico. Los animales de los grupos sin hepatectomía fueron sometidos a una laparotomía (cirugía de exploración)

Las biopsias obtenidas se colocan en Histocassettes y se conservan en formaldehído al 8%.

Los cortes se fijan y se colocan en portaobjetos pre tratados con poli-L lisina 1:10, y con cuidado se cubren en parafina.

De las biopsias recolectadas se obtiene cortes de 0.5 mm de cada uno de los animales de los diferentes grupos y tiempos.

A continuación se procede a la preparación de los cortes para la técnica de inmunohistoquímica.

8.1 Técnica de Inmunohistoquímica.

8.1.1. Rehidratación

- 1) Calentar laminillas en microondas a toda potencia por 1 a 2 minutos (o hasta observar el escurrimiento de la parafina)
- 2) Colocar las laminillas en un rack de portaobjetos y sumergirlos por 10 min en Xilol
- 3) Después del Xilol, colocar las laminillas en alcohol absoluto durante 10 min
- 4) Colocar el rack en alcohol etílico al 100% o absoluto por 10 min
- 5) Colocar el rack en alcohol etílico al 90% por 5 min
- 6) Colocar el rack en alcohol etílico al 70% por 5 min
- 7) Colocar el rack en alcohol etílico al 50% por 5 min
- 8) Colocar el rack en agua destilada por 10 min

8.1.2. Recuperación de Antígenos

- 1) Colocar el rack de laminillas en un buffer de Citrato de sodio a pH=6, calentando por 8 minutos en el microondas o hasta llegar a ebullición.
- 2) Las laminillas se dejan reposar y enfriar aproximadamente de 30 min a 1 hora.

8.1.3. Incubación de anticuerpo primario

- 1) Lavar las laminillas con una piseta con TBST 1X (aproximadamente 5 veces)
- 2) Secar con una gasa alrededor del tejido sin tocarlo y sin deshidratarlo
- 3) Delimitar los cortes con un marcador hidrofóbico DAKO para evitar la permeación del TBST 1X fuera del tejido, evitando que el tejido se seque rápidamente.
- 4) Realizar bloqueo de peroxidasas recubriendo el tejido delimitado con peróxido de hidrógeno H₂O₂ al 0.03% por 5 minutos en cada laminilla.
- 5) Lavar las laminillas 5 veces con TBST 1X dejando hidratado el tejido.
- 6) Colocar las laminillas en una cámara de incubación o recipiente con fondo plano
- 7) Aplicar 100 µL (o más en caso de tejidos muy grandes) de cada concentración de anticuerpo (previamente estandarizado) sobre los tejidos, y cuidando que no se permée del área delimitada.
- 8) Humedecer la cámara o recipiente plano con TBST 1X
- 9) Cerrar la cámara de incubación o tapar con plástico adherente el recipiente.
- 10) Colocar la cámara o recipiente de fondo plano a una temperatura de 4°C durante toda la noche.

8.1.4. Incubación de anticuerpo secundario

- 1) Retirar el excedente de anticuerpo primario con la micropipeta y depositar el residuo en un vaso de precipitados con hipoclorito de sodio.
- 2) Lavar las laminillas con TBST 1X cinco veces y secar alrededor del tejido.

- 3) Aplicar el mismo volumen de anticuerpo secundario conjugado con HRP que de anticuerpo primario en cada tejido.
- 4) Se colocan las laminillas en la cámara o recipiente de fondo plano humedecido con TBST 1X
- 5) Tapar la cámara o recipiente
- 6) Dejar reposar por 30 min a temperatura ambiente.

Una vez finalizado el tiempo de incubación de anticuerpo secundario, se continuó retirando el excedente de anticuerpo secundario y se siguieron lavando los cortes 5 veces con TBST 1X.

8.1.5. Revelado y contraste

- 1) Retirar el exceso de anticuerpo secundario con la micropipeta, colocándolo en un vaso de precipitados con hipoclorito de sodio.
- 2) Lavar laminillas con TBST 1X 5 veces y secar alrededor del tejido.
- 3) Adicionar 100µL (o más en caso de tejidos muy grandes) de Diaminobencidina (DAB) previamente diluido en su buffer de acuerdo a las especificaciones del Kit.
- 4) Retirar el exceso de DAB de la laminilla y fue depositado en un contenedor identificado para su posterior neutralización y desecho.
- 5) Lavar cada laminilla 5 veces y secar alrededor del tejido.
- 6) Se verificó con microscopio óptico la respuesta y la localización de la señal para asegurar que la reacción haya sido positiva.
- 7) Adicionar 1 gota (o lo suficiente para cubrir el tejido) de hematoxilina por un lapso de 1 minuto.
- 8) Enjuagar las laminillas en un vaso coplin con agua caliente
- 9) Enjuagar las laminillas en un vaso coplin con agua a temperatura ambiente para retirar todo el exceso de hematoxilina.

8.1.6. Montaje de las muestras

Para el montaje de los cortes se deshidrataron los cortes con el tren de alcoholes en donde se sumerge cada rack de laminillas.

- 1) Agua destilada por 2 minutos y con agitación.
- 2) Agua destilada por 2 minutos y con agitación.
- 3) Alcohol al 50% por 2 minutos y con agitación.
- 4) Alcohol al 50% por 2 minutos y con agitación.
- 5) Alcohol al 70% por 2 minutos y con agitación.
- 6) Alcohol al 70% por 2 minutos y con agitación.
- 7) Alcohol al 90% por 2 minutos y con agitación.
- 8) Alcohol al 90% por 2 minutos y con agitación.
- 9) Alcohol al 100% por 3 minutos y con agitación.
- 10) Xilol por 3 minutos y con agitación.

- 11) Aplicar de 1 a 2 gotas (de acuerdo al tamaño del tejido) de medio de montaje (Biogenex HK219-15)
- 12) Colocar con cuidado un cubre objetos de acuerdo al tamaño del corte.
- 13) Dejar secar la laminilla.

8.1.7. Obtención y análisis de las imágenes inmunohistoquímicas

- 1) Observar en el microscopio de campo claro (Nikon Optiphot-2 con cámara integrada Nikon Coolpix 4300 de 4 mega pixeles).
- 2) Observar las imágenes en un aumento de 40x.
- 3) Obtener fotos de 5 campos de parénquima, triadas portales y vasos sanguíneos.

8.1.8. Análisis de las imágenes

- 1) Realizar la normalización de las fotos con el Picture Manager de Microsoft.
- 2) Las imágenes procesadas en el Picture Manager se someten a un programa de cuantificación de imagen con Image Pro Plus^R para obtener las áreas de respuesta correspondientes y las intensidades de las respuestas en un rango estandarizado de (Pixel máximo: 387488, Pixel mínimo: 1222368)
- 3) Los datos de porcentaje de área obtenidos por la cuantificación de pixeles en la imagen se asocia con la respuesta de los marcadores a nivel tisular.
- 4) Los datos de intensidad obtenidos por la cuantificación de pixeles en la imagen se asocia con el nivel de expresión de los marcadores a nivel celular.
- 5) La diferencia estadística se analizó con el método de χ^2 para los datos de porcentaje de área y t-student para los datos de intensidad de los marcadores con una significancia del 0.05%. Además el análisis de los efectos se realizó por el método de ANOVA multifactorial con una significancia del 0.05%.

A continuación se presentan las micrografías representativas de las inmunohistoquímicas obtenidas por el microscopio óptico, incluyendo las áreas e intensidades cuantificadas para cada marcador estudiado.

IX. RESULTADOS.

9.1 Inmunohistoquímica de Bcl-2 en parénquima

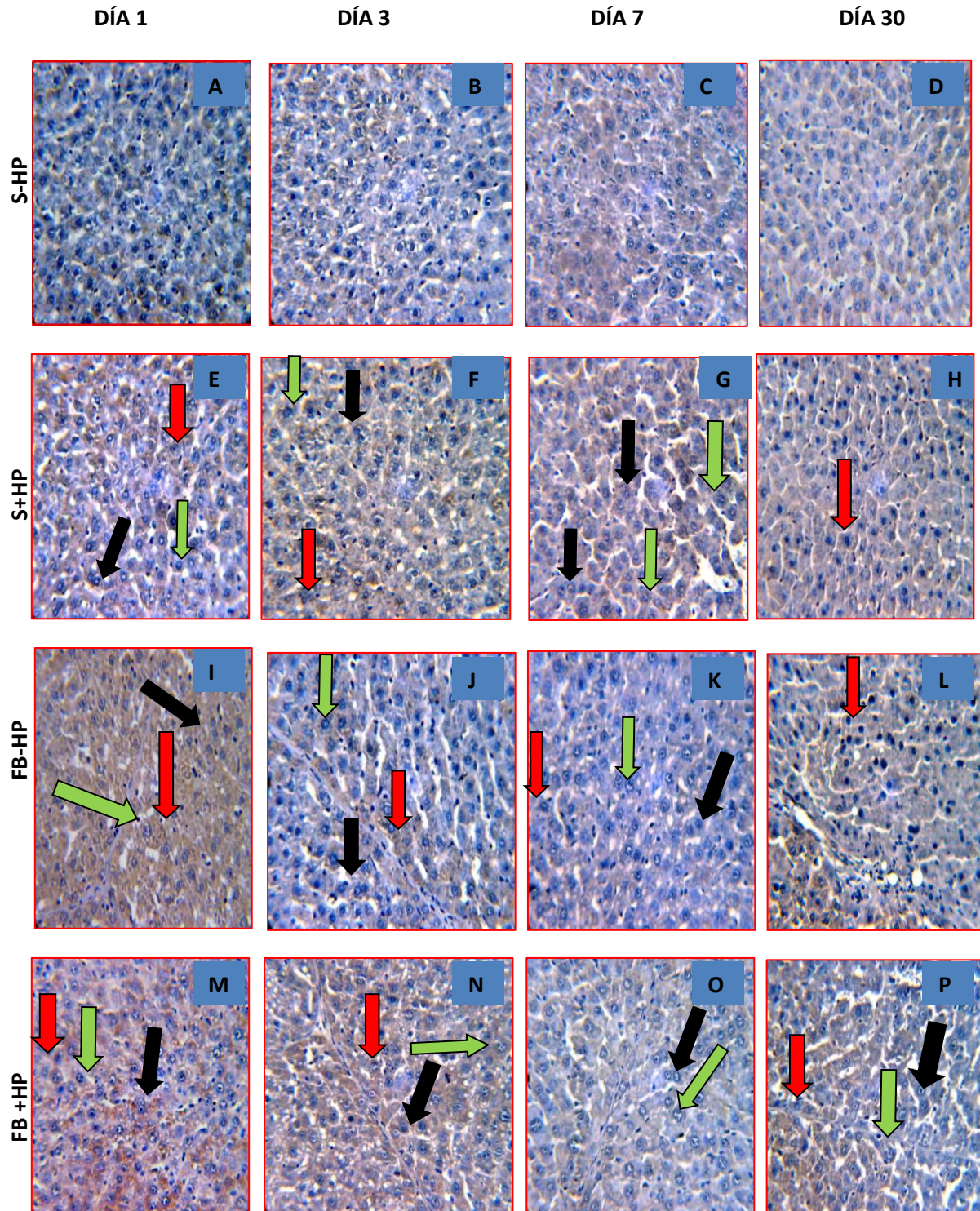


Figura 9.1 (A-D) expresión de Bcl-2 en tejido en condiciones normales (S-HP). (E-H) expresión de Bcl-2 en hígado sano en regeneración (S+HP). (I-L) expresión de Bcl-2 en tejido fibrótico (FB-HP). (M-P) expresión de Bcl-2 en tejido fibrótico en regeneración (FB+HP). Hepatocitos proliferando (flecha verde), hepatocitos apoptóticos (flecha roja), hepatocitos binucleados (flecha negra). Contraste con hematoxilina. Observaciones a 40x en microscopio óptico.

9.1.1. Morfología y detección de Bcl-2 en el parénquima del hígado normal e hígado sano en regeneración.

La localización de Bcl-2 se encuentra en el citoplasma en todos los grupos de estudio. En el hígado normal se observa la conformación de los hepatocitos separados por estrechos espacios sinusoidales, se encuentran pocos hepatocitos binucleados y no se observan hepatocitos con cuerpos apoptóticos. En la micrografía 9.1A y 9.1B la señal de Bcl-2 es moderada durante los primeros 3 días, pero en las micrografías 9.1C y 9.1D la señal aumenta su intensidad discretamente a los 7 y 30 días post hepatectomía, y el área de respuesta demuestra una cobertura de Bcl-2 que se reduce a partir del día 7 post-hepatectomía. El tejido sano en regeneración muestra a las primeras 24 horas una mayor distribución de Bcl-2, pero también se alcanzan a observar una cantidad diversa de hepatocitos dividiéndose, hepatocitos binucleados y cuerpos apoptóticos (9.1E). A los tres días post-hepatectomía (9.1F) la intensidad aumenta, mientras que el área de expresión se reduce, encontrándose hepatocitos en proliferación, junto con algunos cuerpos apoptóticos y hepatocitos binucleados. A partir del día 7 post hepatectomía (9.1G) la señal de Bcl-2 es intensa localizándose en menos regiones, además se observan menos hepatocitos en la fase de apoptosis y se observan aún hepatocitos proliferando. Finalmente a los 30 días (9.1H) no se percibe señal de Bcl-2 y se ve una cantidad limitada de hepatocitos que están por entrar a la fase de apoptosis.

9.1.2. Morfología y detección de Bcl-2 en el parénquima del hígado fibrótico e hígado fibrótico en regeneración.

En las micrografías 9.1I a 9.1L durante el primer día (9.1I) el tejido fibrótico presenta una elevación de la intensidad de Bcl-2 abarcando una región extensa, incluso pueden observarse la aparición de bandas de fibrosis depositándose en sinusoides, y vecinos a estas bandas hay hepatocitos binucleados, cuerpos apoptóticos y algunos hepatocitos preparándose para la proliferación. La banda de fibrosis persiste a los 3 días (9.1J) de la suspensión del tratamiento pero Bcl-2 se ve con una señal débil y distribuida en menores regiones. En el día 7 y en el día 30 (9.1K y 9.1L) los tejidos continúan con intensidad débil de Bcl-2 y con una distribución escasa, e incluso la fibrosis persiste y se pueden observar más hepatocitos en apoptosis. En el tejido fibrótico en regeneración ilustrado en las micrografías 9.1M a 9.1P, se observa que la intensidad de Bcl-2 es baja durante el primer día y que esta señal se encuentra extensamente distribuida en el parénquima (9.1M), durante el día 3 post hepatectomía la señal de Bcl-2 reduce su área junto a las bandas de fibrosis remanentes, pero su intensidad ha incrementado (9.1N), en ambas micrografías se observa que en el primer día se encuentran hepatocitos binucleados, hepatocitos en apoptosis y hepatocitos proliferando, pero en el día 3 post hepatectomía ha reducido la cantidad de células en apoptosis, mientras que predominan los hepatocitos proliferantes y algunos hepatocitos binucleados. En las micrografías 9.1O y 9.1P que corresponden al día 7 post hepatectomía y día 30 post hepatectomía respectivamente, la intensidad de Bcl-2 es mayor y se encuentra en regiones limitadas, a tiempos prolongados la intensidad se reduce observándose algunos hepatocitos binucleados y hepatocitos en apoptosis, pero no se perciben bandas de fibrosis.

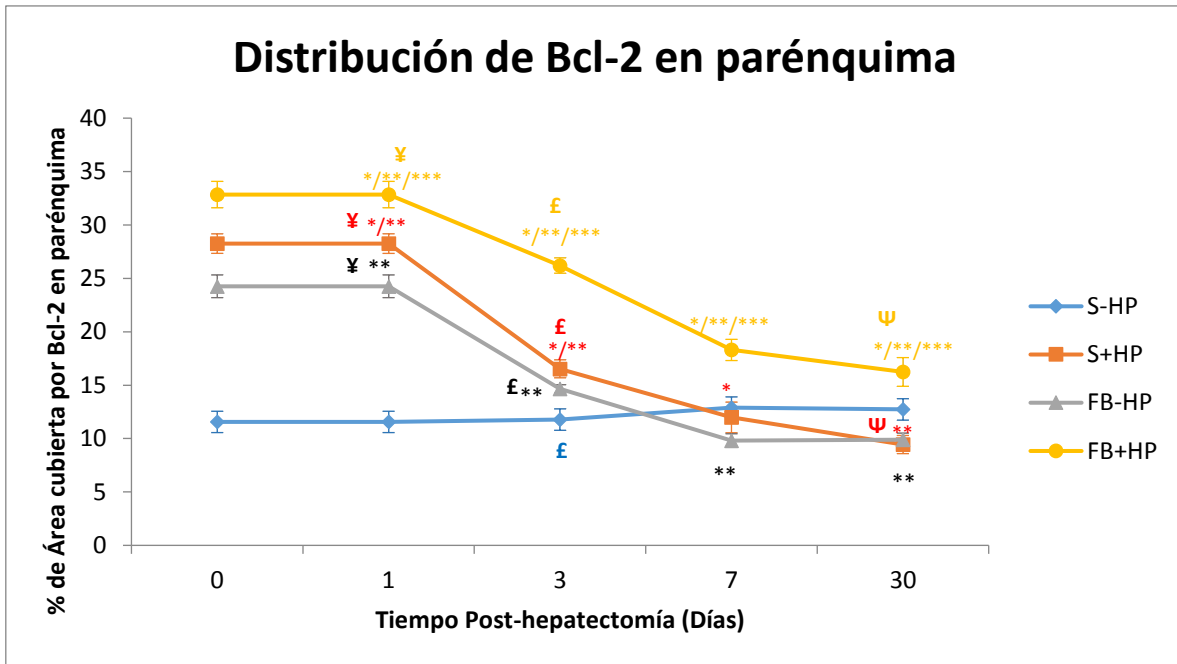
9.1.3. Distribución^a e intensidad^b de Bcl-2 en el parénquima.

De acuerdo a la gráfica 9.1.1. el área en la que se distribuyó Bcl-2 por efecto de la hepatectomía alcanza el 28.25% del tejido correspondiente a la contribución del parénquima hepático en condiciones normales (Línea naranja) y un 32.84% en el caso del tejido fibrótico en regeneración (Línea amarilla) durante las primeras 24 horas post hepatectomía, esta proporción de área responde con un nivel de intensidad bajo (Gráfica 9.1.2.) para el hígado fibrótico en regeneración, el cual se encuentra 40.46% debajo de los niveles normales, mientras que en el hígado sano en regeneración está disminuido con un intervalo de 38.42% con respecto a la intensidad normal. A los 3 días post hepatectomía, el área de respuesta en todos los tejidos comienza a descender progresivamente, mientras que las intensidades de los hígados con hepatectomía comienzan a elevarse después del primer día post-hepatectomía. Entre los 5 y 7 días el área afectada por la hepatectomía (Línea naranja) y el área afectada por la fibrosis (Línea gris) representan el 10% y 15% de área respectivamente respondiendo con Bcl-2, siendo el hígado sano en regeneración el que muestra una intensidad aumentada un 60% por arriba del hígado sano. En el caso del hígado fibrótico en regeneración (Línea amarilla) en este intervalo de tiempo el área que cubre la respuesta es de un 18.3% por lo que permanece arriba de las condiciones normales, y también presenta una elevación de intensidad del 51.6%, por lo que el tejido eleva la expresión de Bcl-2 durante la fase de terminación. En el día 30 post hepatectomía el hígado fibrótico y el hígado sano en regeneración, el área se reduce hasta llegar al porcentaje de área normal de Bcl-2 con 9.4%. Al contrario el hígado fibrótico en regeneración comprende el 16.24 % de área respondiendo con el marcador anti- apoptótico con una intensidad elevada por lo menos a un 14.4%

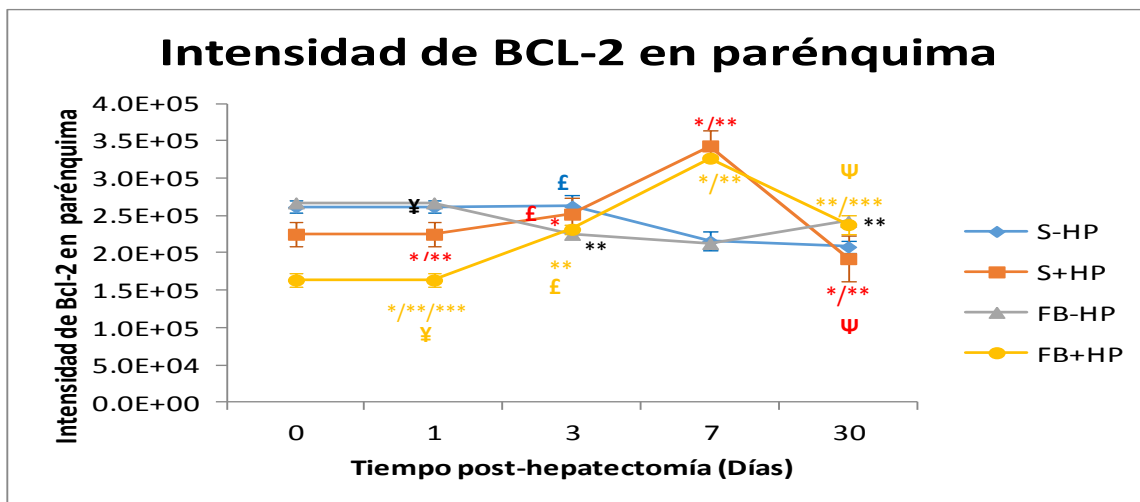
Tabla 9.1 Porcentajes de área e intensidades promedio de Bcl-2 en el parénquima hepático.

Grupo	Área (%)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	11.559 ± 0.502	11.776 ± 0.645 [£]	12.895 ± 0.029	12.731 ± 0.287 ^ψ
	+HP	28.252 ± 0.910 [¥] **	16.526 ± 0.841 [£] **	11.983 ± 1.438 [†]	9.439 ± 0.851 ^ψ **
Fibrótico	-HP	24.253 ± 1.06 [¥] **	14.651 ± 0.387 [£] **	9.811 ± 0.634 ^{††}	9.894 ± 0.622 ^{††}
	+HP	32.841 ± 1.237 [¥] **	26.199 ± 0.712 [£] **	18.297 ± 0.993 ^{†††}	16.238 ± 1.342 ^{†††} **
Grupo	Intensidad (x10 ⁵)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	2.62 ± 0.08	2.63 ± 0.183 [£]	2.16 ± 0.127	2.08 ± 0.075
	+HP	2.25 ± 0.169 [¥] **	2.52 ± 0.213 [£] *	3.43 ± 0.212 ^{††}	1.92 ± 0.326 ^{††} ψ
Fibrótico	-HP	2.61 ± 0.224 [¥]	2.25 ± 0.129 ^{††}	2.13 ± 0.278	2.42 ± 0.264 ^{††}
	+HP	1.64 ± 0.083 [¥] **	2.32 ± 0.594 [£] *	2.28 ± 0.15 ^{††}	2.38 ± 0.307 ^{†††} **

^a Los incrementos de distribución de área se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta A\% = A\%_X - A\%_{S-HP}$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. ^b Los incrementos de intensidad se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta I\% = [I_X - I_{S-HP} / I_{S-HP}] X 100$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. Diferencia estadística analizada por χ^2 en porcentaje de área y t-student en intensidad: *P≤ 0.05 contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, **P≤ 0.05 contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, ***P≤ 0.05 contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [P≤ 0.05 día 1 contra día 3], £ [P≤ 0.05 día 3 contra día 7], ψ [P≤ 0.05 día 7 contra día 30].



Gráfica 9.1.1. Gráfica de distribución de Bcl-2 en parénquima. El porcentaje de área cubierta por el marcaje de Bcl-2 está representado por el promedio de porcentaje de área \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes para cada grupo experimental. Hígado normal (Línea azul), hígado sano en regeneración (Línea naranja), hígado fibrótico (Línea gris), hígado fibrótico en regeneración (Línea amarilla). Diferencia estadística analizada por χ^2 : * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].



Gráfica 9.1.2 Gráfica de intensidad de Bcl-2 en parénquima. Hígado normal (Línea azul), hígado sano en regeneración (Línea naranja), hígado fibrótico (Línea gris), hígado fibrótico en regeneración (Línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por el nivel de intensidad de la imagen. Significancia estadística: Diferencia estadística analizada por t-student: * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].

9.2 Inmunohistoquímica de Bcl-2 en vena porta

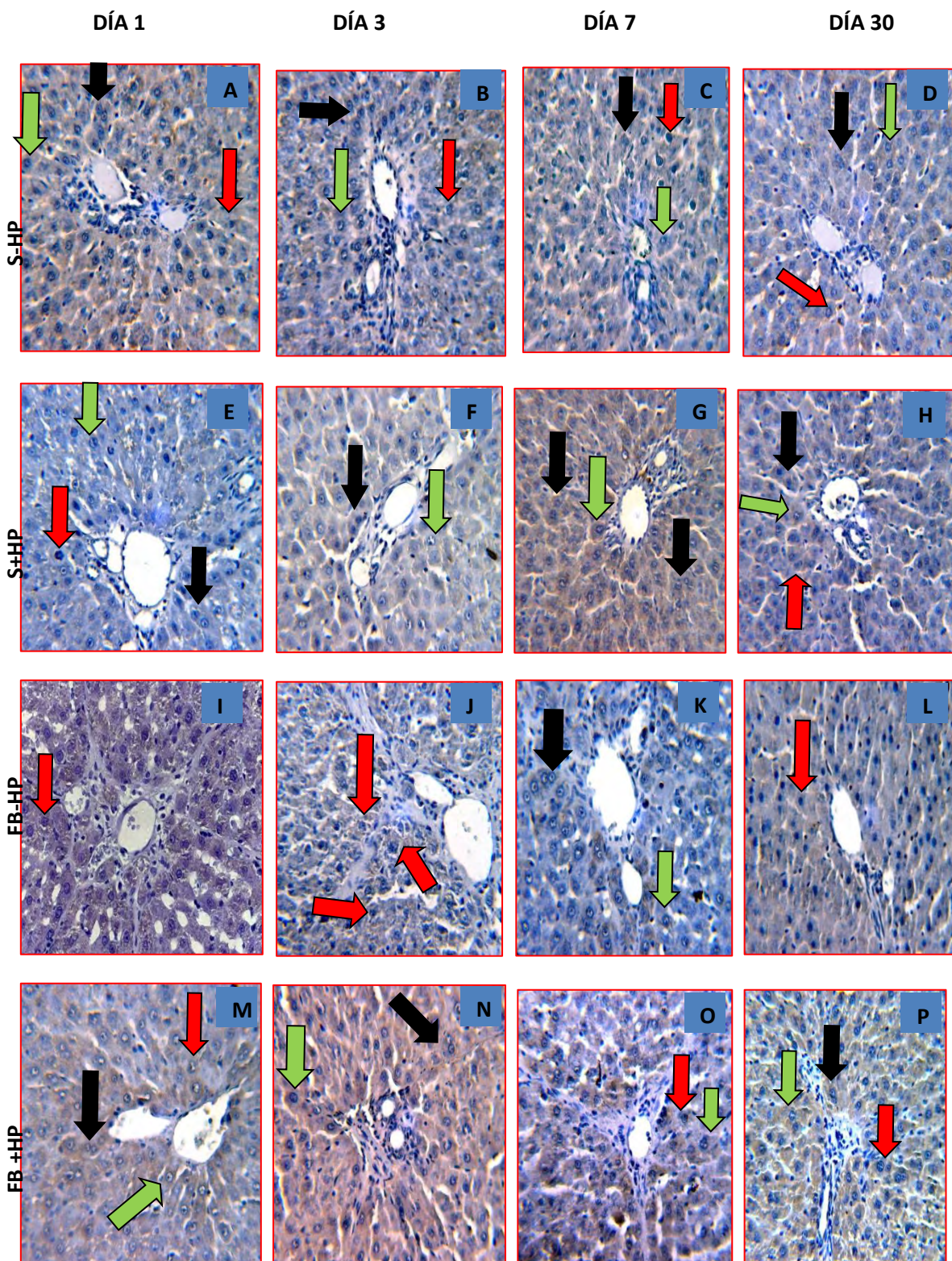


Figura 9.2 (A-D) expresión de Bcl-2 en tejido en condiciones normales (S-HP). (E-H) expresión de Bcl-2 en hígado sano en regeneración (S+HP). (I-L) expresión de Bcl-2 en tejido fibrótico (FB-HP). (M-P) expresión de Bcl-2 en tejido fibrótico en regeneración (FB+HP). Hepatocitos proliferando (flecha verde), cuerpos apoptóticos (flecha roja), hepatocitos binucleados (flecha negra). Contraste con hematoxilina. Observaciones a 40x en microscopio óptico.

9.2.1. Morfología y detección de Bcl-2 en la vena porta del hígado normal e hígado normal con hepatectomía.

En el tejido normal (9.2A a 9.2D) se puede observar que Bcl-2 se expresa en el citoplasma de los hepatocitos, el área corresponde a las zonas más alejadas del borde de las venas portales, la señal se mantiene en este nivel de intensidad hasta después de los 3 días post hepatectomía (9.2B) que es cuando la intensidad disminuye. Durante el primer día de tratamiento (9.2A) se encuentran hepatocitos proliferando, al igual que hepatocitos binucleados y hepatocitos en apoptosis, pero a los 3 días hay hepatocitos proliferando y hepatocitos binucleados, en el día 7 (9.2C) se hallan más hepatocitos binucleados y hepatocitos entrando a la apoptosis, y en el día 30 (9.2D) se encuentran tanto hepatocitos proliferando, hepatocitos binucleados y una reducida cantidad de hepatocitos en apoptosis.

El tejido sano en regeneración presenta una intensidad de Bcl-2 más débil la cual se encuentra en una extensión de área más grande, se hallan más hepatocitos binucleados en los bordes de la vena portal, hepatocitos en apoptosis acompañados por hepatocitos proliferantes predominando en las partes alejadas de la vena porta (9.2E). En el día 3 y día 7 post hepatectomía (9.2F y 9.2G) se observan menos hepatocitos en apoptosis, hepatocitos binucleados y hepatocitos proliferantes y en este tiempo la intensidad de Bcl-2 es fuerte. En el día 30 post hepatectomía (9.2H) se observa nuevamente a los hepatocitos con algunos hepatocitos en apoptosis en la parte alejada de la vena porta.

9.2.2. Morfología y detección de Bcl-2 en la vena porta del hígado fibrótico e hígado fibrótico en regeneración.

En el tejido fibrótico (9.2I a 9.2L) la localización de Bcl-2 es extensa y tiene una intensidad mayor que el tejido en condiciones normales (9.2I), pero se puede observar la generación de fibras de colágeno o bandas de fibrosis depositándose en los espacios sinusoidales del lobulillo, y más concentrándose en los bordes de la vena central. También se hallan hepatocitos binucleados y hepatocitos en apoptosis. Después de los 3 días de tratamiento (9.2J) se ve una señal de Bcl-2 débil y con un área reducida con respecto a la observada en el día 1 (9.2I), además se observan aun hepatocitos en apoptosis junto con la banda de fibrosis. A los 7 días (9.2K) la fibrosis ha disminuido, la vena porta aún conserva la deposición de matriz extracelular alrededor del borde pero no se observan más extensiones en otras zonas que rodean a la vena porta, se observan una mayor frecuencia de hepatocitos binucleados alrededor de la vena porta acompañados por hepatocitos proliferantes. A los 30 días (9.2L) se observan más hepatocitos en apoptosis a la vez que se ve una persistencia de las fibras de colágeno.

El tejido fibrótico en regeneración expresa una intensidad de Bcl-2 tenue en una región extensa que comienza desde los bordes de la vena porta hacia el interior del lobulillo, y se observan hepatocitos binucleados, proliferantes y hepatocitos en apoptosis acompañados por delgadas fibras de colágeno circundando los bordes de la vena y extendiéndose hacia las zonas alejadas de la vena porta durante el primer día post hepatectomía (9.2M). A los 3 días post hepatectomía (9.2N) la fibrosis ha aumentado de grosor pero no se ha expandido a las demás zonas del lobulillo

y además se identifican hepatocitos proliferantes y binucleados en mayor frecuencia. Al día 7 post hepatectomía (9.2O) la fibrosis ha aumentado de grosor y se vuelven a identificar hepatocitos en apoptosis acompañados en su mayoría por hepatocitos proliferantes y se observa una intensidad de Bcl-2 moderada en regiones limitadas en el borde de la vena porta, pero al día 30 post hepatectomía (9.2P) el grosor de la vena porta disminuye aunque con algunas infiltraciones encontrándose una señal moderada de Bcl-2 circundando el borde de la vena porta, en este periodo se vuelven a observar los hepatocitos binucleados junto con los apoptóticos y proliferantes.

9.2.3. Distribución^a e intensidad^b de Bcl-2 en vena porta.

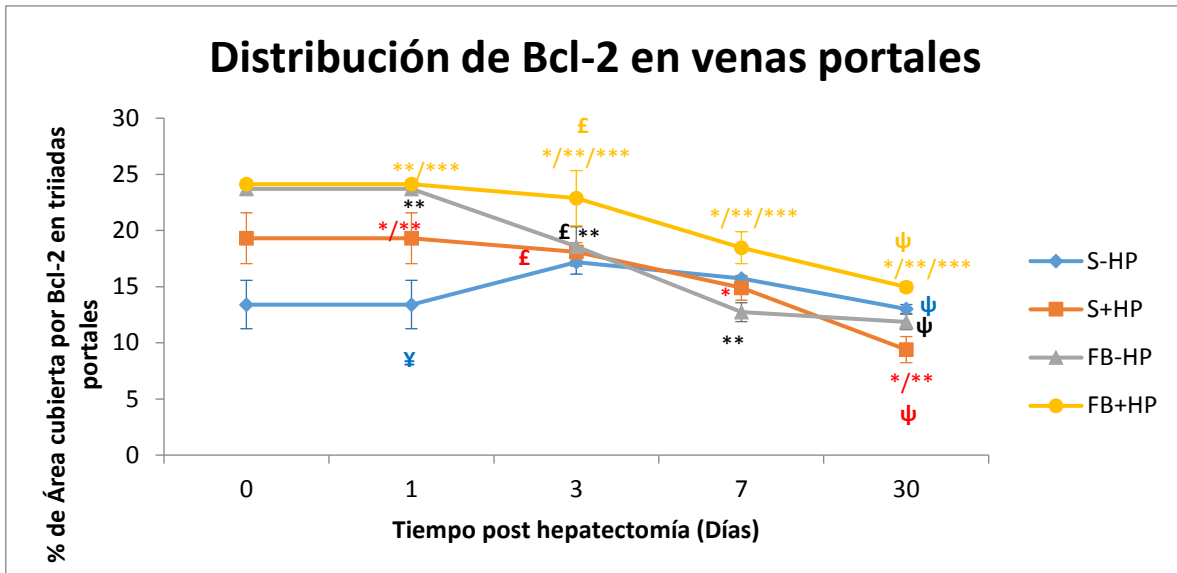
En la Gráfica 9.2.1 la vena porta contribuye con el 20 % de área de respuesta al practicarle la hepatectomía parcial (Línea naranja), pero hay más área respondiendo por el daño crónico provocado por la generación de la fibrosis, ya que el hígado fibrótico (Línea gris) y el hígado fibrótico en regeneración (Línea amarilla) elevan su respuesta hasta alcanzar el 23.7 y 24.12% respectivamente durante el primer día post hepatectomía. El nivel de expresión de Bcl-2 (Gráfica 9.2.2) en estas primeras 24 horas post hepatectomía se presenta en el hígado fibrótico en regeneración con una disminución del 32.4% mientras que en condiciones normales solo disminuye la mitad con un 24.4%. A partir del día 3 post hepatectomía se presenta una reducción consecutiva del área de respuesta, mientras que para el hígado en condiciones normales (Línea azul) Bcl-2 comienzan elevarse tanto el área e intensidad hasta estabilizarse nuevamente a los 30 días post hepatectomía. En el caso de los hígados con hepatectomía parcial la elevación de intensidad Bcl-2 también comienza a los 3 días post hepatectomía siendo el pico máximo a los 7 días post hepatectomía abarcando un incremento de 57.6% para el hígado sano en regeneración y 68.3% para el hígado fibrótico en regeneración, mientras que el área de respuesta desciende continuamente. Después de los 3 días el área que responde al daño crónico y a la hepatectomía alcanza el porcentaje de área normal que denota un 18%, pero el hígado fibrótico en regeneración continua elevado hasta un 2.74% arriba de las condiciones normales.

El hígado fibrótico en regeneración y el hígado fibrótico intersectan con los valores normales de intensidad de Bcl-2 entre los 5 y 7 días post hepatectomía, pero en el caso del hígado fibrótico la intensidad no se restablece sino que continúa elevándose hasta los 30 días post hepatectomía. Después de los 30 días post hepatectomía el área de respuesta del hígado fibrótico con hepatectomía y el hígado fibrótico regresan a los valores normales, mientras que el hígado fibrótico se encuentra con un área del 3.5% arriba de los valores normales, y con una intensidad incrementada al 25% coincidiendo con la elevación del hígado fibrótico.

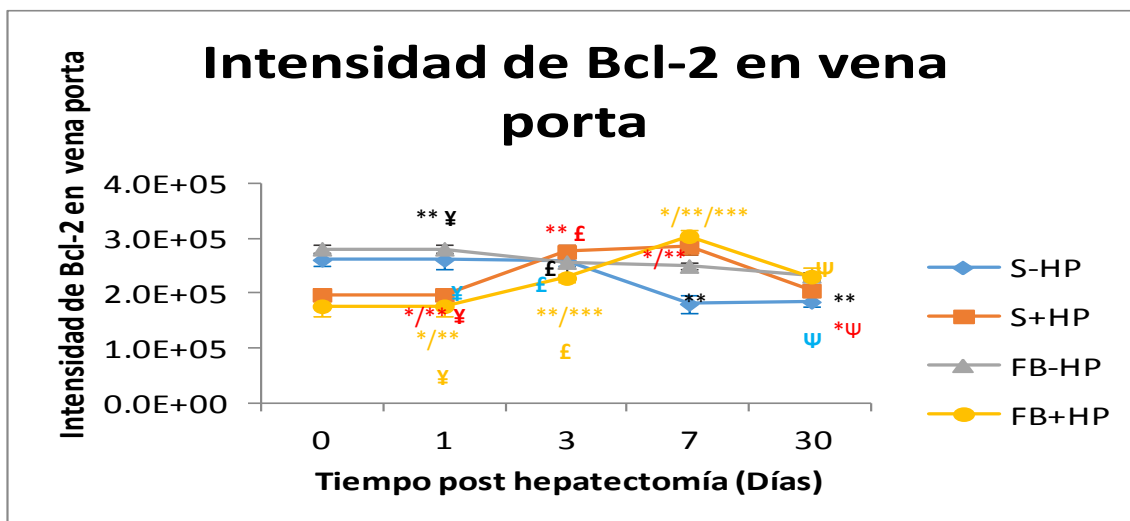
Tabla 9.2 Porcentajes de área e intensidades promedio de Bcl-2 en venas portales.

Área (%)		Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	13.65 ± 1.323 [¥]	17.176 ± 1.062	15.726 ± 0.132	13.008 ± 0.396 ^Ψ
	+HP	20.055 ± 2.928 ^{**}	19.304 ± 2.259 [£]	14.898 ± 1.102 [*]	9.067 ± 1.163 ^{**Ψ}
Fibrótico	-HP	24.198 ± 1.207 ^{**}	18.579 ± 1.744 ^{**£}	12.724 ± 0.841 ^{**}	11.935 ± 0.621 ^Ψ
	+HP	24.124 ± 0.366 ^{**£}	22.873 ± 2.455 ^{**£}	18.463 ± 1.417 ^{**£}	14.966 ± 0.418 ^{**£Ψ}
Intensidad (x10 ⁵)		Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	2.61 ± 0.173 [¥]	2.60 ± 0.109 [£]	1.81 ± 0.164	1.85 ± 0.111 ^Ψ
	+HP	1.97 ± 0.108 ^{**¥}	2.76 ± 0.118 ^{**£}	2.85 ± 0.129 ^{**}	2.05 ± 0.357 ^{**Ψ}
Fibrótico	-HP	2.82 ± 0.094 ^{**¥}	1.98 ± 0.117 [£]	2.50 ± 0.0527 ^{**}	2.32 ± 0.071 ^{**}
	+HP	1.78 ± 0.175 ^{**}	2.28 ± 0.088 ^{**£}	3.05 ± 0.111 ^{**£}	2.31 ± 0.159 ^Ψ

^a Los incrementos de distribución de área se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta A\% = A\%_X - A\%_{S-HP}$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. ^b Los incrementos de intensidad se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta I\% = [I_X - I_{S-HP} / I_{S-HP}] \times 100$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. Diferencia estadística analizada por χ^2 en porcentaje de área y t-student en intensidad: *P ≤ 0.05 contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, **P ≤ 0.05 contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, ***P ≤ 0.05 contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [P ≤ 0.05 día 1 contra día 3], £ [P ≤ 0.05 día 3 contra día 7], Ψ [P ≤ 0.05 día 7 contra día 30].



Gráfica 9.2.1. Distribución de Bcl-2 en venas portales. Hígado normal (Línea azul), hígado sano en regeneración (Línea naranja), hígado fibrótico (Línea gris), hígado fibrótico en regeneración (Línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por el porcentaje de área cubierta por el marcaje de Bcl-2. Significancia estadística analizada por χ^2 : * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). \forall [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].



Gráfica 9.2.2. Intensidad de Bcl-2 en la vena porta. Hígado normal (Línea azul), hígado sano en regeneración (Línea naranja), hígado fibrótico (Línea gris), hígado fibrótico en regeneración (Línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por la intensidad del marcaje de Bcl-2 en la imagen. Significancia estadística analizada por t-student: * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). \forall [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].

9.3 Inmunohistoquímica de Bcl-2 en vena central

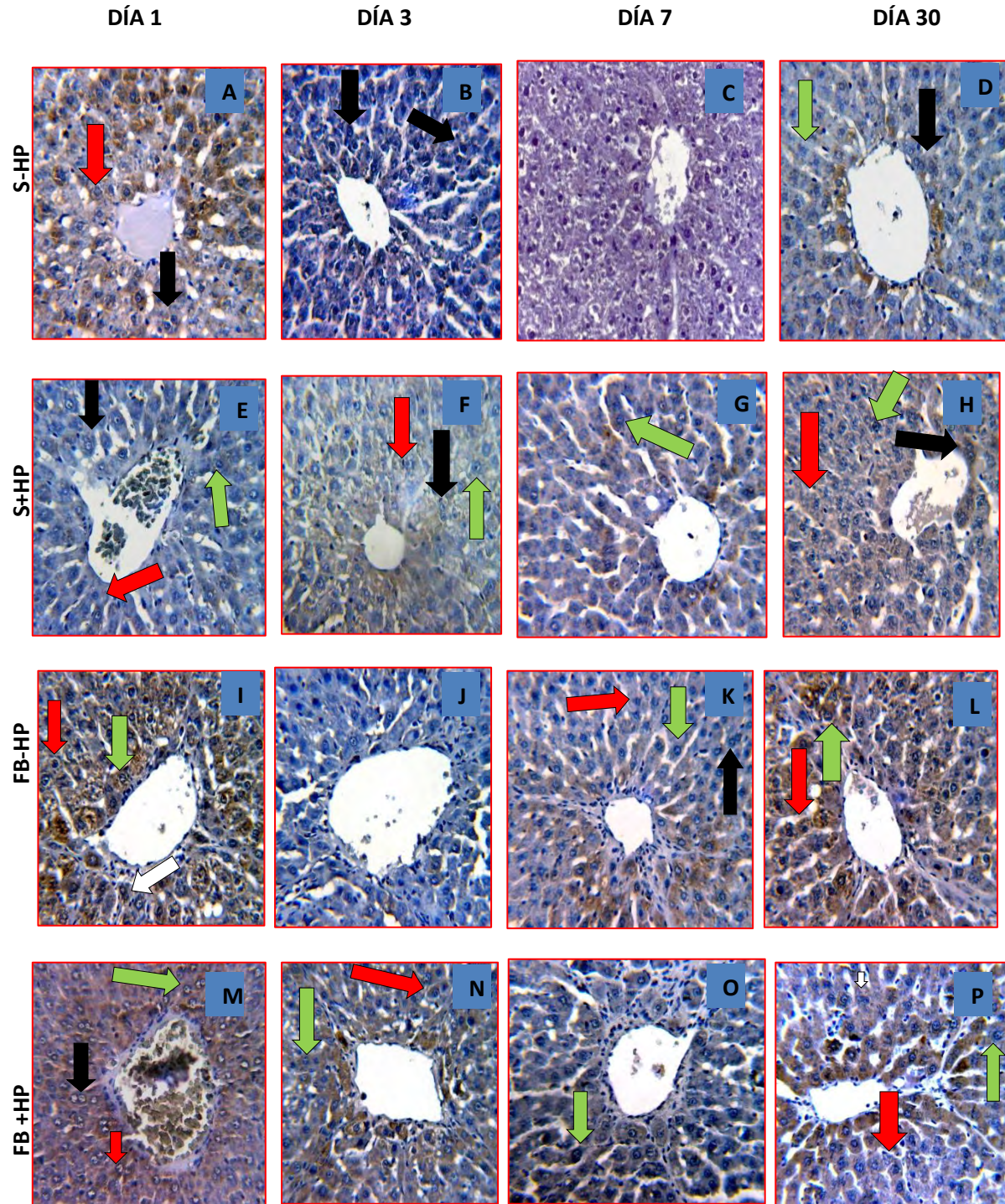


Figura 9.3 (A-D) expresión de Bcl-2 en tejido en condiciones normales (S-HP). (E-H) expresión de Bcl-2 en hígado sano en regeneración (S+HP). (I-L) expresión de Bcl-2 en tejido fibrótico (FB-HP) (M-P) expresión de Bcl-2 en tejido fibrótico en regeneración (FB+HP). Hepatocitos proliferando (flecha verde) hepatocitos apoptóticos (flecha roja), hepatocitos binucleados (flecha negra). Tejido contrastado con hematoxilina. Observaciones en microscopio óptico a 40x

9.3.1. Morfología y detección de Bcl-2 en la periferia de la vena central del hígado normal e hígado normal con hepatectomía.

En el tejido normal la intensidad de Bcl-2 durante el primer día (9.3A) tiene una señal moderada que cubre hasta las regiones alejadas del borde de las venas centrales, y se hallan hepatocitos proliferantes, binucleados y algunos apoptóticos, a los 3 días (9.3B) la señal de Bcl-2 disminuye y se localiza concentrada en una menor región, una extensión limitada que se concentra en el borde de la vena central, al mismo tiempo se observan hepatocitos binucleados, hepatocitos en apoptosis y hepatocitos proliferando. En los 7 y 30 días (9.3C y 9.3D) la señal de Bcl-2 es tenue y se concentra en el borde de la vena central, se encuentran hepatocitos binucleados, proliferando y en apoptosis.

En el tejido sano en regeneración se ve una intensidad débil de Bcl-2 en un área extendida hacia las zonas lejanas de la vena central durante el primer día (9.3E), a su vez se encuentran hepatocitos binucleados, hepatocitos en apoptosis y hepatocitos proliferando, a los 3 días (9.3F) post hepatectomía la señal de Bcl-2 es más intensa concentrándose en las áreas más cercanas a la vena central, se encuentra en la periferia más hepatocitos binucleados y proliferantes que hepatocitos en apoptosis. En el día 7 y el día 30 (9.3G y 9.3H) la intensidad de Bcl-2 disminuye y comprende un área menor localizada en los alrededores cercanos de la vena central, se observan hepatocitos binucleados, proliferantes y en el día 30 se observan hepatocitos en apoptosis.

9.3.2. Morfología y detección de Bcl-2 en la vena central del hígado fibrótico e hígado fibrótico en regeneración.

El hígado fibrótico tiene una señal de Bcl-2 intensa y extendida por la periferia de la vena central, también se puede ver un engrosamiento de la vena central por los depósitos de colágena, la cual se va extendiendo a diferentes zonas aledañas a la vena central. Los hepatocitos apoptóticos son más abundantes y acompañados por hepatocitos binucleados (9.3I). En el día tres (9.3J) la señal de Bcl-2 es menos intensa y con una distribución limitada al contorno de la vena. Además en el día 3 del tratamiento se observan más hepatocitos en apoptosis y cuerpos apoptóticos. En el día 7 y día 30 (9.3K y 9.3L) la intensidad de Bcl-2 es más intensa y con área más reducida, concentrándose alrededor de la vena central, en el día 7 se observan hepatocitos proliferantes, apoptóticos y binucleados, y en el día 30 se observa que hay más hepatocitos binucleados y apoptóticos.

El hígado fibrótico en regeneración presenta una señal tenue que se observa desde los bordes de la vena central hacia las zonas retiradas del borde donde se detectan hepatocitos proliferantes, apoptóticos y binucleados, además la banda de fibrosis solo abarca el contorno de la vena central durante el primer día (9.3M). En el día 3 post hepatectomía (9.3N) la banda de fibrosis es más delgada en el contorno de la vena central, no se hallan hepatocitos binucleados pero si proliferantes con algunos pocos hepatocitos apoptóticos. La señal de Bcl-2 es más intensa pero concentrada en las zonas más cercanas de la vena central. En los días 7 y 30 post hepatectomía (9.3O y 9.3P) la señal de Bcl-2 es débil y difusa, encontrándose junto con hepatocitos proliferantes, binucleados y algunos apoptóticos. Las bandas de fibrosis persisten pero con un aspecto delgado en el lobulillo.

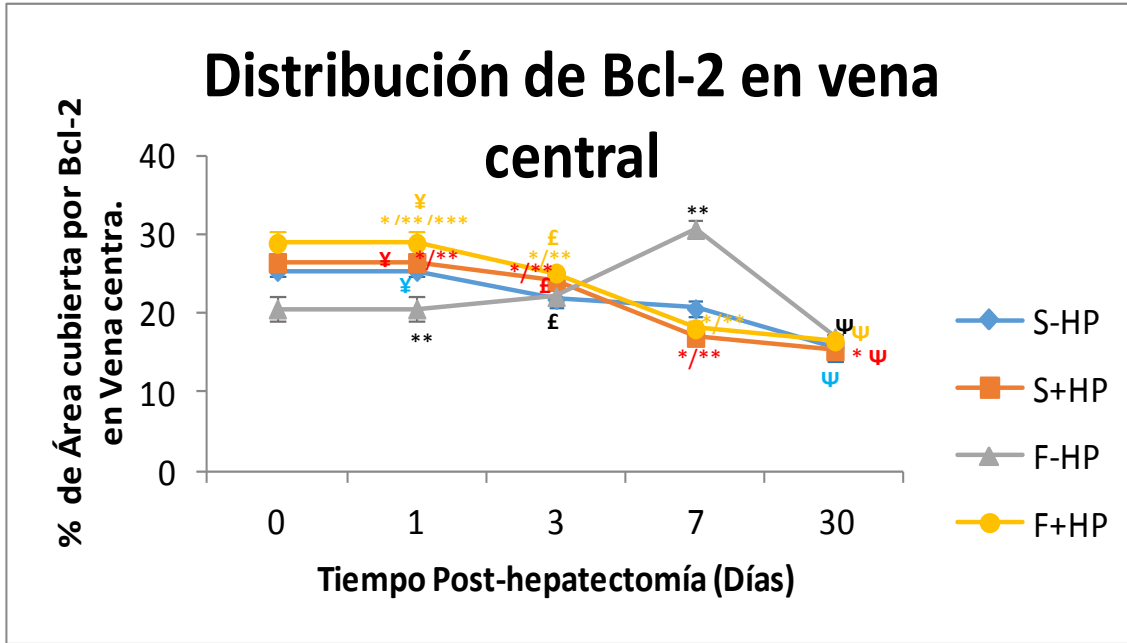
9.3.3 Distribución^a e intensidad^b de Bcl-2 en vena central.

Durante el primer día post hepatectomía el hígado fibrótico (Línea gris) abarca un área menor con respecto al área observada en las muestras (Gráfica 9.3.1), representa el 20.6% de área de respuesta de Bcl-2, pero la intensidad (Gráfica 9.3.2) aumenta 23.2% con respecto a la intensidad del hígado normal. Mientras que para el fibrótico en regeneración el área de respuesta es de 28.9% y su intensidad es baja con una disminución de Bcl-2 de 40.5%. El hígado sano en regeneración (Línea naranja) abarca un área de 26.48% y una intensidad baja con una disminución del 38.4%. A los 3 días post hepatectomía el hígado normal con hepatectomía y el hígado fibrótico en regeneración (Línea amarilla) comienzan a reducir su área de respuesta y sus intensidades incrementan con una tendencia hacia el nivel normal de intensidad, pero en el hígado fibrótico el área de respuesta aumenta hasta alcanzar el 22.15% mientras que su intensidad disminuye 15% por debajo de los niveles normales. Al día 7 post hepatectomía el área de Bcl-2 en la vena central en el hígado normal (Línea azul) disminuye siendo el 20.6% de área de respuesta mientras que su intensidad va disminuyendo conforme avanza el tiempo de estudio. En el caso del hígado fibrótico en regeneración, el hígado sano en regeneración y el hígado fibrótico presentan una disminución de distribución del 2.54%, 12.09% y 8.17% respectivamente. En el caso de la intensidad de Bcl-2 se encuentra arriba de los niveles normales de intensidad para los hígados fibróticos, siendo el hígado fibrótico en regeneración un aumento del 57.4% y para el hígado fibrótico el 8.3%. A los 30 días la distribución de los hígados con hepatectomía reduce su área de respuesta hasta un 7% mientras que la distribución entre el hígado fibrótico y el hígado normal de Bcl-2 abarca la misma área de 16%. Por el contrario la intensidad de los hígados con hepatectomía se reestablece alcanzando los valores normales, mientras que el hígado fibrótico va incrementando su intensidad abarcando un aumento del 23.7%. Las intersecciones entre los hígados con hepatectomía y el hígado fibrótico con la respuesta en condiciones normales indican que entre el 15 y 20 % del área alcanzan la intensidad normal en los 5 a 7 días post hepatectomía.

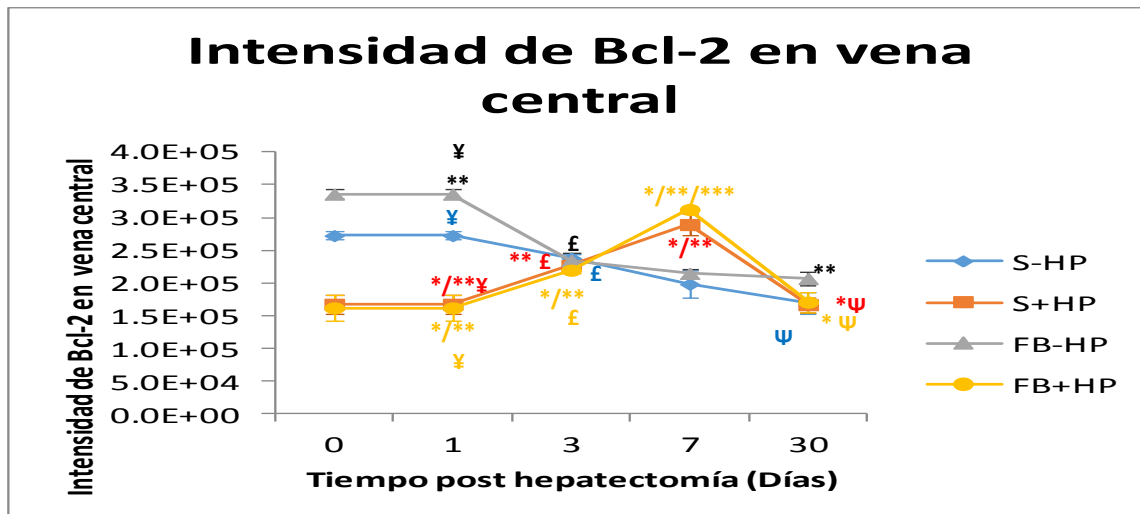
Tabla 9.3 Porcentajes e intensidades promedio de Bcl-2 en venas centrales.

Grupo	Área (%)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	25.355±0.592 [¥]	21.795 ± 1.109	20.612 ± 0.939	15.666± 1.796 ^Ψ
	+HP	26.48±0.803 [¥]	24.139±1.114 [£]	16.991 ± 0.263 [£]	15.294± 1.077 ^Ψ
Fibrótico	-HP	20.594 ± 1.64 ^{**}	22.154 ± 0.77 [£]	30.697±0.368 ^{**}	16.925 ± 0.527 ^Ψ
	+HP	28.929±1.393 [¥]	25.146± 0.571 [£]	18.0733±1.106 [£]	16.545 ± 0.481 ^Ψ
Grupo	Intensidad (x10 ⁵)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	2.73 ± 0.059 [¥]	2.38 ± 0.056 [£]	1.98 ± 0.207	1.69 ± 0.161 ^Ψ
	+HP	1.68 ± 0.153 [¥]	2.27± 0.559 [£]	2.89 ± 0.172 [£]	1.67±0.177 ^Ψ
Fibrótico	-HP	3.36 ± 0.076 ^{**}	2.35 ± 0.012 [£]	2.15 ± 0.073	2.07± 0.102 ^{**}
	+HP	1.62 ± 0.194 [¥]	2.19±0.042 [£]	3.12±0.135 [£]	1.71 ± 0.152 ^Ψ

^a Los incrementos de distribución de área se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta A\% = A\%_X - A\%_{S-HP}$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. ^b Los incrementos de intensidad se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta I\% = [I_X - I_{S-HP} / I_{S-HP}] \times 100$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. Diferencia estadística analizada por χ^2 en porcentaje de área y t-student en intensidad: *P≤ 0.05 contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, **P≤ 0.05 contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, ***P≤ 0.05 contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [P≤ 0.05 día 1 contra día 3], £ [P≤ 0.05 día 3 contra día 7], Ψ [P≤ 0.05 día 7 contra día 30].



Gráfica 9.3.1. Distribución de Bcl-2 en vena central. Hígado normal (Línea azul), hígado sano en regeneración (Línea naranja), hígado fibrótico (Línea gris), hígado fibrótico en regeneración (Línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por el porcentaje de área cubierta por el marcaje de Bcl-2. Significancia estadística analizada por χ^2 : * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [P ≤ 0.05 día 1 contra día 3], £ [P ≤ 0.05 día 3 contra día 7], Ψ [P ≤ 0.05 día 7 contra día 30].



Gráfica 9.3.2 Intensidad de Bcl-2 en vena central. Hígado normal (Línea azul), hígado sano en regeneración (Línea naranja), hígado fibrótico (Línea gris), hígado fibrótico en regeneración (Línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por la intensidad del marcaje de Bcl-2. Significancia estadística analizada por t-student: * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [P ≤ 0.05 día 1 contra día 3], £ [P ≤ 0.05 día 3 contra día 7], Ψ [P ≤ 0.05 día 7 contra día 30].

9.4 Distribución^a e Intensidad^b total de Bcl-2

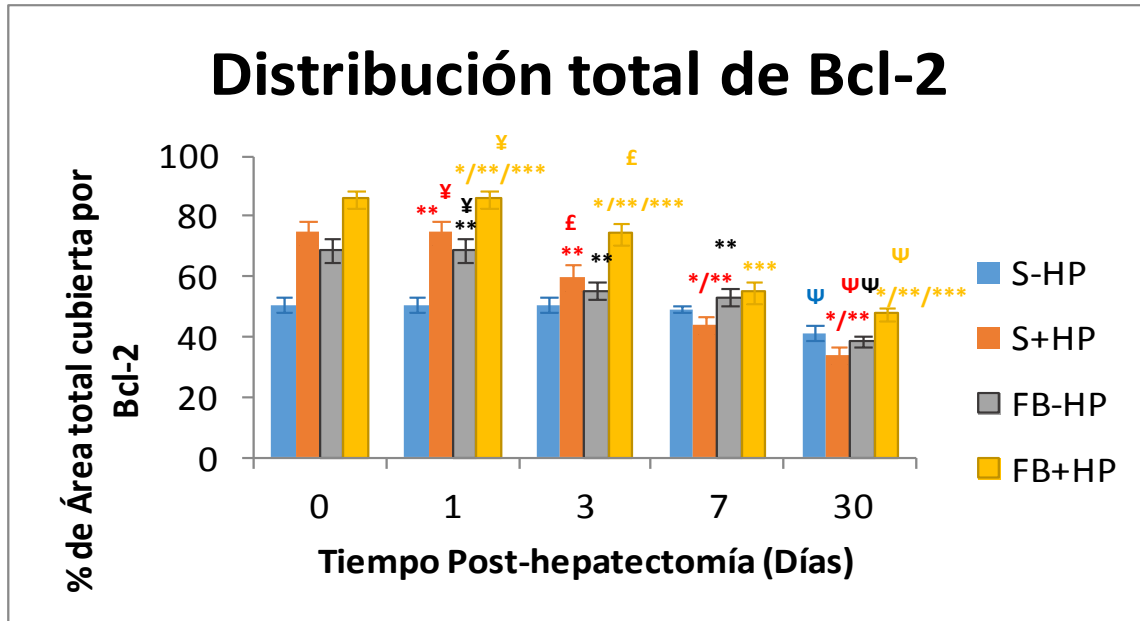
Observando la gráfica de la gráfica 9.4.1, Bcl-2 aumenta 24% sobre el nivel basal durante las primeras 24 horas después de someter al hígado normal a una hepatectomía parcial al 70%, siendo así un aumento de área de tejido respondiendo a la resección (Línea naranja). En los grupos fibróticos, posteriormente se ve un descenso del área después de las 72 horas regresando al nivel basal, posteriormente desciende hasta un 20% del nivel basal de área. En el caso del hígado fibrótico (Línea gris) el marcaje de Bcl-2 se detectó con un aumento del 5% por arriba de los valores normales de área, mientras que para el hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla) abarcó un aumento del 24% de área.

La intensidad (Gráfica 9.4.2) de la respuesta tiene un perfil distinto, a pesar de que la mayoría de las células señala a Bcl-2 en su citoplasma su intensidad es baja, la intensidad disminuye 26% cuando se somete a una hepatectomía parcial a condiciones normales (Línea naranja). Además la intensidad de la señal disminuye un 37% cuando presenta fibrosis (Línea amarilla). Posterior a las 72 horas los grupos con hepatectomía (Línea naranja y línea amarilla) se elevan hasta niveles normales, y superándolos hasta un 60% después de los primeros 7 días con respecto al grupo en condiciones normales (S-HP). Por otro lado la intensidad en el hígado fibrótico (Línea gris) mantiene una elevación del 11% durante las primeras 24 horas y después de las 72 horas declina a un nivel cercano al nivel basal, a los primeros 7 días la intensidad de Bcl-2 vuelve a elevarse a un máximo de 14% de intensidad con respecto a las condiciones normales (Línea gris).

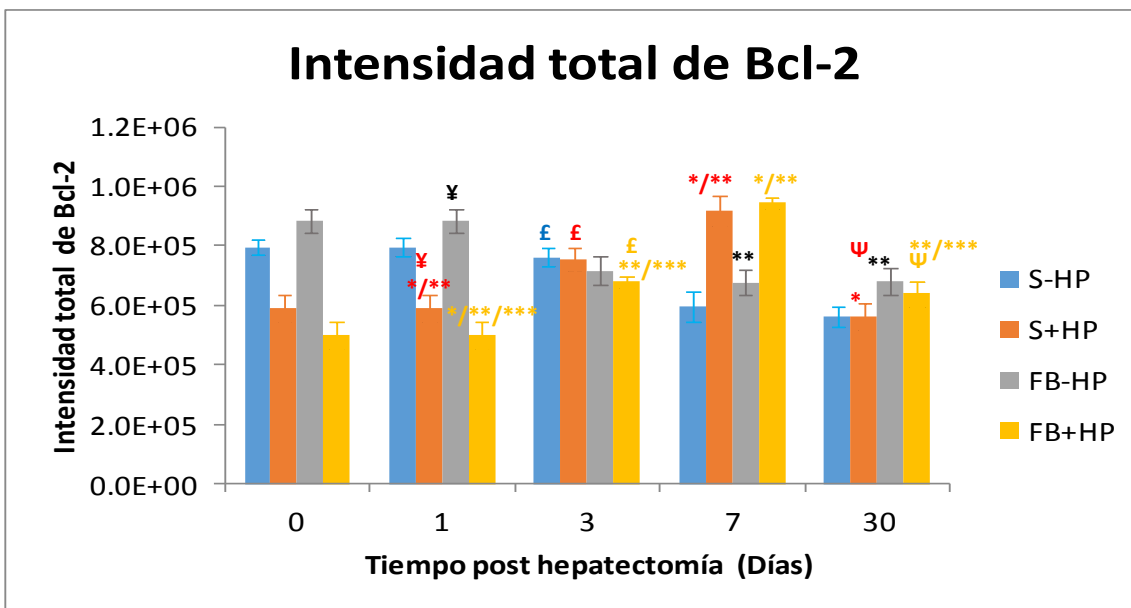
Tabla 9.4 Porcentajes e intensidades promedio totales de Bcl-2.

Grupo	Área (%)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	50.561±2.418	50.747 ± 2.816	49.233±1.101	41.405 ± 2.479 ^ψ
	+HP	74.787±3.976 [¥]	59.969 ± 4.215 [£]	43.873 ± 2.803 ^ψ	33.801 ± 3.109 ^ψ
Fibrótico	-HP	69.046 ± 3.908 [¥]	55.384 ± 2.902 [£]	53.233 ± 2.656 ^ψ	38.753 ± 1.769 ^ψ
	+HP	85.895 ± 2.998 [¥]	74.218 ± 3.739 [£]	54.834 ± 3.515 ^ψ	47.749 ± 2.241 ^ψ
Grupo	Intensidad (x10 ⁵)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	7.95 ± 0.313	7.61 ± 0.317 [£]	5.95 ± 0.498	5.62 ± 0.033
	+HP	5.90 ± 0.043 [¥]	7.55 ± 0.387 [£]	9.18 ± 0.513 ^ψ	5.65 ± 0.454 ^ψ
Fibrótico	-HP	8.84 ± 0.404 [¥]	7.17 ± 0.491	6.78 ± 0.404 ^ψ	6.81 ± 0.435 ^ψ
	+HP	5.03 ± 0.453 [¥]	6.79 ± 0.189 [£]	9.44 ± 0.193 ^ψ	6.39 ± 0.432 ^ψ

^a Los incrementos de distribución de área se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta A\% = A\%_X - A\%_{S-HP}$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. ^b Los incrementos de intensidad se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta I\% = [I_X - I_{S-HP}/I_{S-HP}]X100$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. Diferencia estadística analizada por χ^2 en porcentaje de área y t-student en intensidad: *P≤ 0.05 contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, **P≤ 0.05 contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, ***P≤ 0.05 contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [P≤ 0.05 día 1 contra día 3], £ [P≤ 0.05 día 3 contra día 7], ψ [P≤ 0.05 día 7 contra día 30].



Gráfica 9.4.1. Distribución total de Bcl-2. Hígado normal (barra azul), hígado sano en regeneración (barra naranja), hígado fibrótico (barra gris), hígado fibrótico en regeneración (barra amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por el porcentaje de área cubierta por el marcaje de Bcl-2. Significancia estadística analizada por χ^2 : * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].



Gráfica 9.4.2. Intensidad total de Bcl-2. Hígado normal (barra azul), hígado sano en regeneración (barra naranja), hígado fibrótico (barra gris), hígado fibrótico en regeneración (barra amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por la intensidad del marcaje de Bcl-2. Significancia estadística analizada por t-student: * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].

9.5 Inmunohistoquímica de PCNA en el parénquima

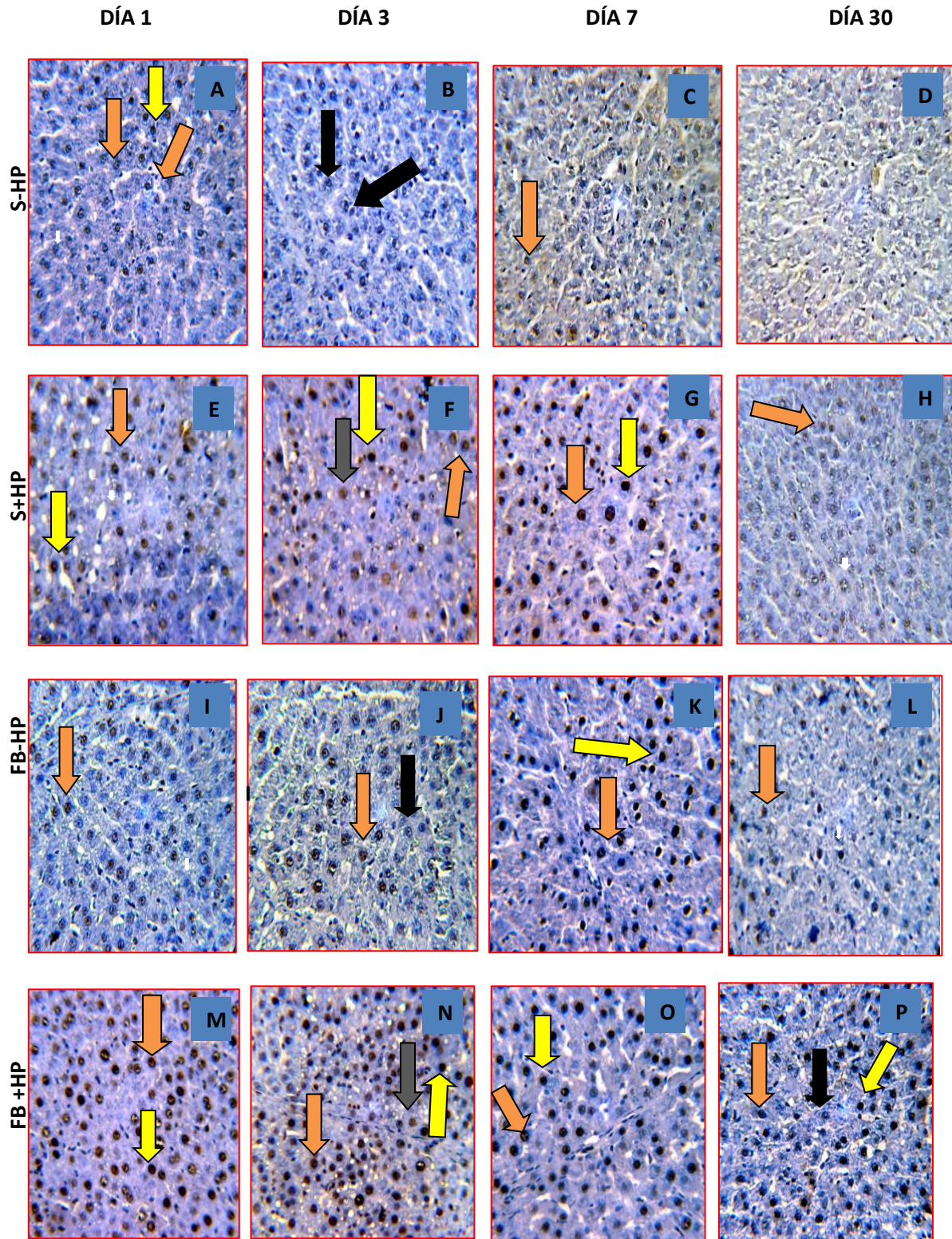


Figura 9.5 (A-D) expresión de PCNA en hígado normal (S-HP). (E-H) expresión de PCNA en hígado sano en regeneración (S+HP). (I-L) expresión de PCNA en hígado fibrótico (FB-HP). (M-P) expresión PCNA en tejido fibrótico en regeneración (FB+HP). Hepatocitos en fase G0 (Flecha negra), hepatocitos en fase G1 (naranja), hepatocitos en fase S (Flecha amarilla), hepatocitos en fase G2 (Flecha gris). Contraste con hematoxilina. Observaciones a 40x en microscopio óptico.

9.5.1 Morfología y detección de PCNA en el parénquima del hígado normal e hígado normal con hepatectomía.

En el hígado normal la señal de PCNA varía de acuerdo a las fases en las que se encuentre la célula, PCNA presenta en promedio una intensidad alta para los hepatocitos que están en la fase S (flecha naranja) mientras que los hepatocitos que están en la fase G1 presentan una señal tenue en el núcleo (flecha amarilla), los hepatocitos en fase G0 no presentan señal de PCNA (flecha negra). En el parénquima durante el primer día (9.5A) se observan hepatocitos en la fase S en diversas zonas del parénquima acompañados por hepatocitos en fase G1 y fase G0. A los 3 días (9.5B) la señal de PCNA es débil y escasa en el parénquima, las células están en la fase G0, pero a los 7 días (9.5C) los hepatocitos muestran señales intensas y tenues hasta concluir los 30 días (9.5D) en los que no se perciben núcleos con señales de PCNA intenso.

El tejido sano en regeneración muestra al parénquima con hepatocitos en la fase S y fase G1 durante el primer día post hepatectomía (9.5E), en el día 3 post hepatectomía (9.5F) se encuentran hepatocitos en fase S y Fase G1, a su vez hay señales difusas de PCNA dentro de algunos núcleos indicando que los hepatocitos están en la fase G2 preparándose para su división. En el día 7 post hepatectomía (9.5G) los hepatocitos que predominan son los que se encuentran en fase G1 y S ocupando todo el área del parénquima y finalmente a los 30 días post hepatectomía (9.5H) se tienen hepatocitos en fase G1 y G0 en todo el parénquima hepático.

9.5.2 Morfología y detección de PCNA en el parénquima del hígado fibrótico e hígado fibrótico en regeneración.

El tejido fibrótico presenta escasas señales de PCNA en el núcleo de los hepatocitos, solo se detectan hepatocitos en fase G0 y fase G1. La fase G1 es la más intensa durante el primer día de tratamiento (9.5I). Hasta los 3 días de tratamiento (9.5J) se presentan núcleos en fase S pero predominan las células en fase G0 y G1 en todo el parénquima. Los primeros 3 días muestran bandas de fibrosis que van sintetizándose y degradándose. A los 7 días (9.5K) se pueden observar hepatocitos con señales de PCNA intensas, por lo tanto están en la fase de síntesis de ADN o fase S y se observan menos bandas de fibrosis. A los 30 días (9.5L) los hepatocitos han cesado su proliferación presentando hepatocitos en la fase G0.

El tejido fibrótico en regeneración presenta hepatocitos con señal de PCNA intensas tenues durante el primer día post hepatectomía (9.5M) junto con la reversión del tejido fibrótico, en el día 3 post hepatectomía (9.5N) hay hepatocitos en la fase S abarcando todo el área del parénquima, las bandas de fibrosis están más delgadas, también se ven hepatocitos binucleados. La señal de PCNA a partir de los 7 días post hepatectomía se mantiene intensa hasta los 30 días post hepatectomía remarcando con PCNA hepatocitos en la fase S y fase G2 (9.5O y 9.5P).

9.5.3 Distribución^a e intensidad^b de PCNA en parénquima

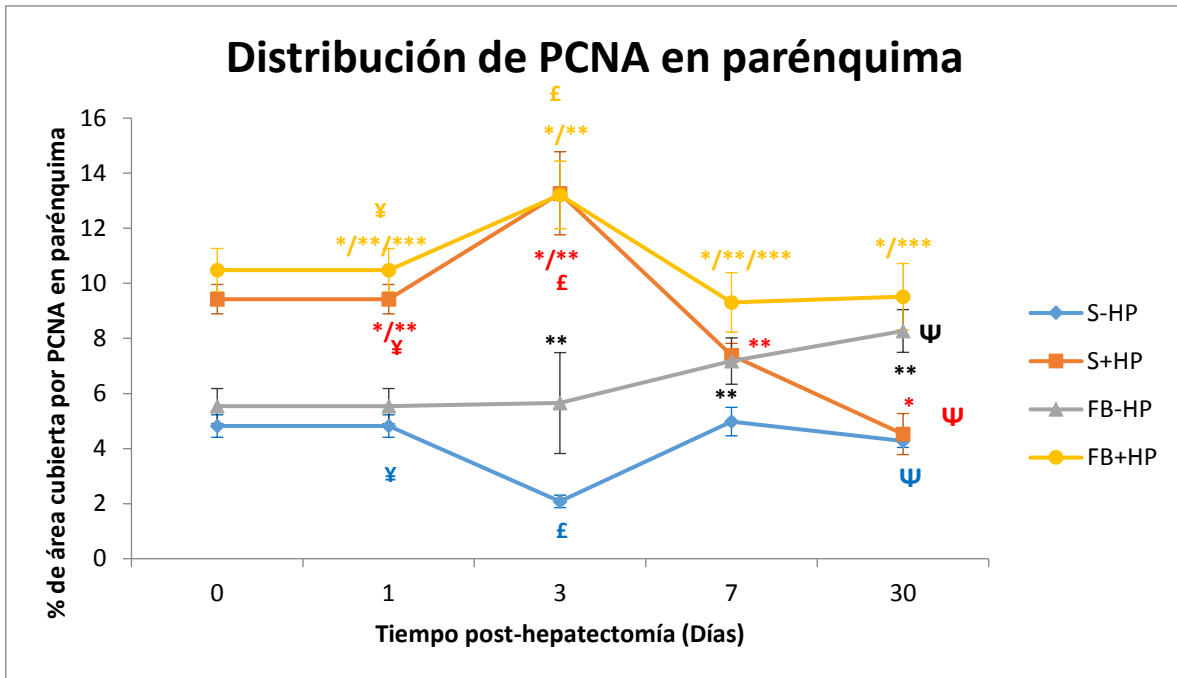
En el parénquima hepático representado en la gráfica 9.5.1 los núcleos que presentan expresión de PCNA mantienen un área constante de 4.81% no presentando una elevación marcada durante las primeras 24 horas pero si disminuyen a 2.08% durante el periodo de 3 días post hepatectomía. A los 7 días post hepatectomía presenta una elevación que se dispone a alcanzar un 4.97% hasta los 30 días con respecto al área en condiciones normales (Línea azul). Por otro lado ambos grupos sanos en regeneración (Línea naranja) y fibróticos en regeneración (Línea amarilla) se mantienen elevados con áreas de 9.42% y 10.47% respectivamente en referencia al área cubierta en condiciones normales, y prácticamente hay una estrecha diferencia de 1% entre ellos durante las primeras 24 horas post hepatectomía. No es hasta el día 3 post hepatectomía en el que ambos grupos alcanzan un punto máximo de área similar de 13%. A partir de este punto el hígado con hepatectomía en condiciones normales (Línea naranja) desciende lo suficiente hasta retornar al nivel basal.

Las intensidades representadas en la gráfica 9.5.2 del parénquima determinan diferentes niveles de expresión entre los grupos pero una tendencia semejante entre los grupos fibróticos. En condiciones de fibrosis (Línea gris) se observa un aumento del 35.7% y en la fibrosis en regeneración (Línea amarilla) se observa un aumento del 61.2% con respecto a la intensidad basal durante las primeras 24 horas, este aumento en el grupo fibrótico en regeneración permanece constante hasta los 3 días post hepatectomía, a su vez desciende de la misma forma que lo hace el grupo fibrótico (Línea gris) restableciendo ambos la intensidad a niveles de expresión en condiciones normales hasta el día 30 post hepatectomía. Por el contrario el hígado sano en regeneración (Línea naranja) se mantiene arriba de los niveles basales, iniciando con un aumento del 42.6% durante las primeras 24 horas, y presentando un segundo aumento del 47.24% 7 días post hepatectomía, finalmente retoma los niveles basales a los 30 días post hepatectomía.

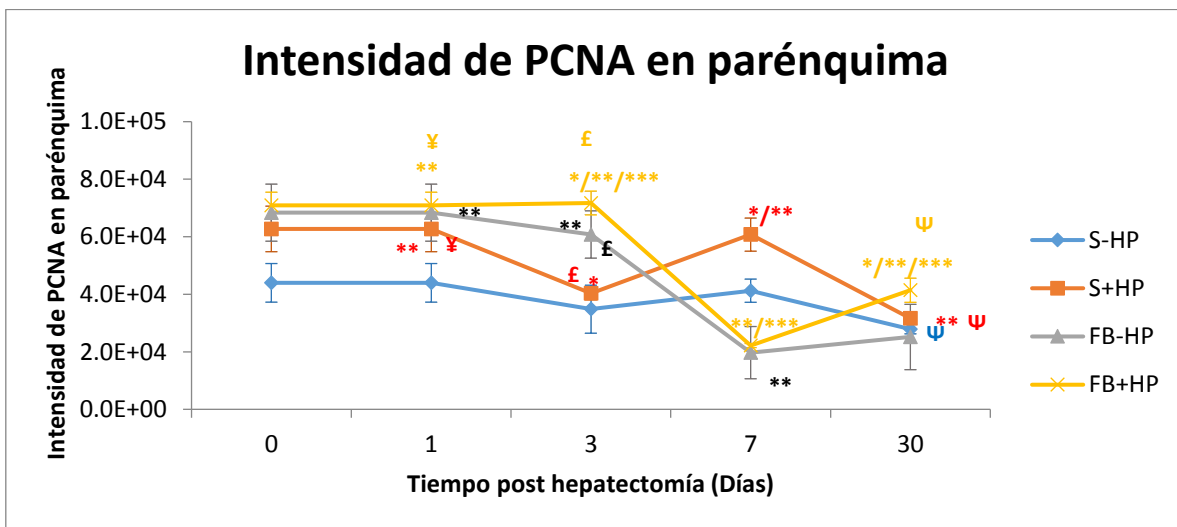
Tabla 9.5 Porcentajes de área e intensidades promedio de PCNA en el parénquima hepático.

Grupo	Área (%)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	4.817 ± 0.407 [¥]	2.081 ± 0.226 [£]	4.979 ± 0.517	4.269 ± 0.229 ^Ψ
	+HP	9.426 ± 0.534 ^{**¥}	13.271 ± 1.508 ^{**£}	7.391 ± 0.431 ^{**}	4.527 ± 0.746 ^{*Ψ}
Fibrótico	-HP	5.541 ± 0.639	5.652 ± 1.832 ^{**}	7.177 ± 0.839 ^{**}	8.270 ± 0.776 ^{**Ψ}
	+HP	10.477 ± 0.788 ^{**¥}	13.211 ± 1.231 ^{**£}	9.308 ± 1.079 ^{**£}	9.518 ± 1.202 ^{**Ψ}
Grupo	Intensidad (x10 ⁴)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	4.39 ± 0.67	3.48 ± 0.834	4.13 ± 0.404	2.78 ± 0.165 ^Ψ
	+HP	6.27 ± 0.793 ^{**¥}	4.03 ± 0.225 ^{*£}	6.07 ± 0.576 ^{**}	3.16 ± 0.121 ^{**Ψ}
Fibrótico	-HP	6.84 ± 0.993 ^{**}	6.08 ± 0.819 ^{**£}	1.97 ± 0.908 ^{**}	2.51 ± 0.113
	+HP	7.08 ± 0.462 ^{**¥}	7.17 ± 0.416 ^{**£}	2.22 ± 0.071 ^{**£}	4.14 ± 0.421 ^{**Ψ}

^a Los incrementos de distribución de área se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta A\% = A\%_X - A\%_{S-HP}$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. ^b Los incrementos de intensidad se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta I\% = [I_X - I_{S-HP} / I_{S-HP}] \times 100$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. Diferencia estadística analizada por χ^2 en porcentaje de área y t-student en intensidad: *P≤ 0.05 contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, **P≤ 0.05 contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, ***P≤ 0.05 contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [P≤ 0.05 día 1 contra día 3], £ [P≤ 0.05 día 3 contra día 7], Ψ [P≤ 0.05 día 7 contra día 30].



Gráfica 9.5.1. Distribución de PCNA en parénquima. Hígado normal (línea azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (línea gris), hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por el porcentaje de área cubierta por el marcaje de PCNA. Significancia estadística analizada por χ^2 : * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].



Gráfica 9.5.2. Intensidad de PCNA en el parénquima. Hígado normal (línea azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (línea gris), hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por la intensidad del marcaje de PCNA. Significancia estadística analizada por t-student: * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].

9.6 Inmunohistoquímica de PCNA en la vena porta

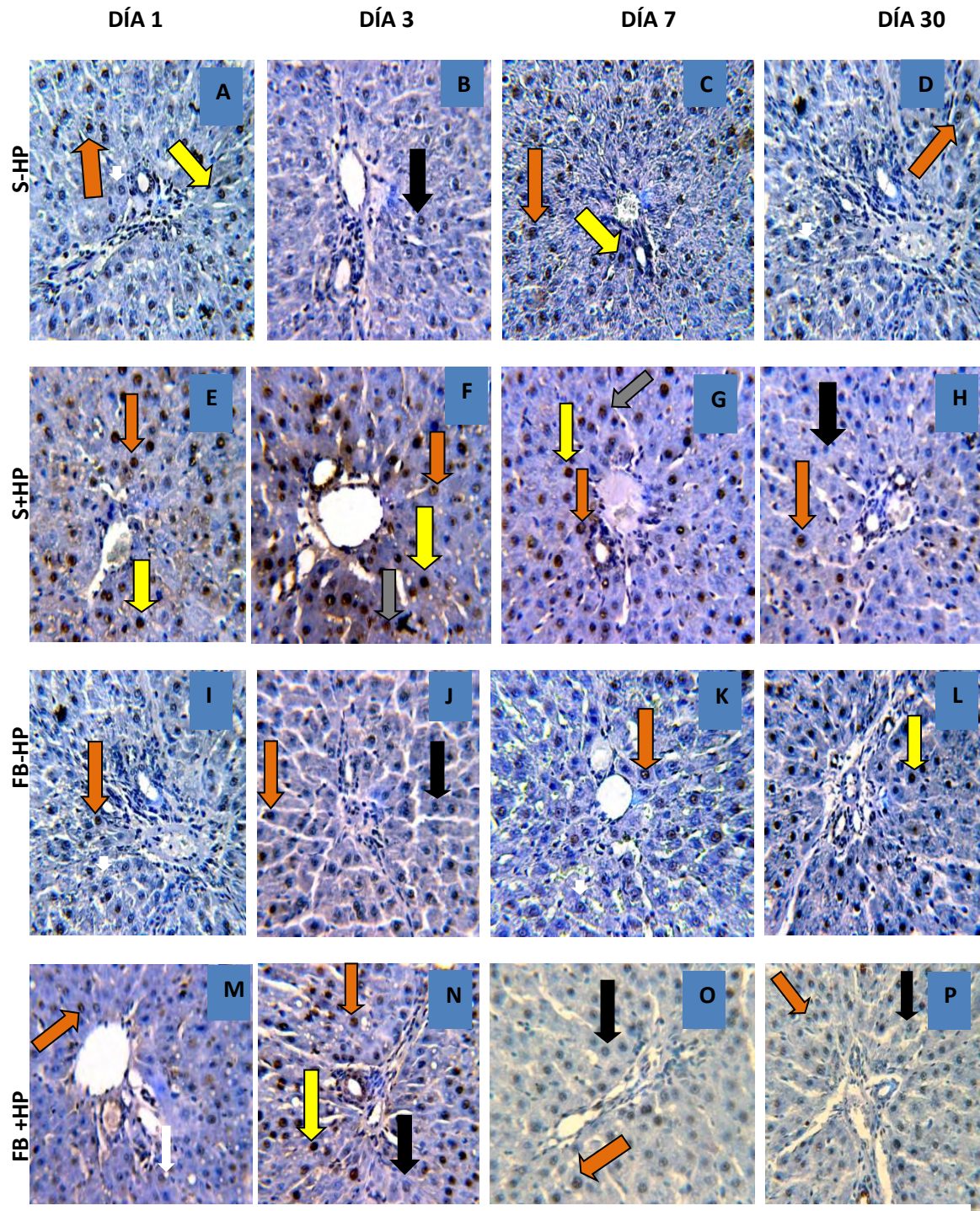


Figura 9.6 (A-D) expresión de PCNA en hígado normal (S-HP). (E-H) expresión de PCNA en hígado sano en regeneración (S+HP). (I-L) expresión de PCNA en hígado fibrótico (FB-HP). (M-P) expresión PCNA e hígado fibrótico en regeneración (FB+HP). Hepatocitos en fase G0 (Flecha negra), hepatocitos en fase G1 (naranja), hepatocitos en fase S (Flecha amarilla), hepatocitos en fase G2 (Flecha gris). Contraste con hematoxilina. Observaciones a 40x en microscopio óptico.

9.6.1 Morfología y detección de PCNA en la vena porta del hígado normal e hígado normal con hepatectomía.

La vena porta del hígado presenta hepatocitos con una intensidad de PCNA moderada junto con otros hepatocitos con intensidades más bajas durante el primer día de tratamiento (9.6A), en el tercer día la intensidad de PCNA es escasa (9.6B), posteriormente en el día 7 post hepatectomía (9.6C) del tratamiento la señal de PCNA muestra hepatocitos en fase S alrededor de la vena porta, y a los 30 días la señal de PCNA muestra que hay hepatocitos en fase S y también en fase G0 (9.6D)

El hígado sano en regeneración muestra a los hepatocitos entrando a la fase S junto con otros que se encuentran en la fase G1 y G0 (9.6E), la intensidad de los hepatocitos de la fase S se mantiene a los 3 días post hepatectomía, el área cubierta por PCNA aumenta hacia las zonas alejadas de la vena porta. En el tercer día (9.6F) aumenta la intensidad de los núcleos por lo que hay más hepatocitos en la fase de síntesis; la señal continúa extendiéndose hacia las zonas lejanas de la vena porta. Al día 7 post hepatectomía (9.6G) la señal de PCNA marca hepatocitos en fase S junto con una cantidad mayor de hepatocitos en fase G2 en la periferia de la vena porta. A los 30 días post hepatectomía (9.6H) los hepatocitos marcados con PCNA tienen una intensidad menor correspondiente a hepatocitos en la fase G1 localizados en la periferia de la vena porta.

9.6.2 Morfología y detección de PCNA en la vena porta del hígado fibrótico e hígado fibrótico en regeneración.

El tejido fibrótico presenta venas portales gruesas debido a la fibrosis que se extiende hacia el lobulillo, en su contorno se ven hepatocitos cuya señal de PCNA es bastante débil indicando hepatocitos en la fase G1 (9.6I) dentro de un área más limitada cerca de las venas centrales, también se observan hepatocitos que no se encuentran expresando PCNA. Tres días después (9.6J) los hepatocitos muestran una señal intensa de la fase S, y se van detectando en las zonas alejadas de la vena porta. En el día 7 del tratamiento (9.6K), se observa que la fibrosis a medida que persiste, impide la expresión de PCNA ya que su intensidad indica que los hepatocitos están detenidos en la fase G1 en un área de tejido reducida. Al día 30 post hepatectomía (9.6L) la señal de PCNA se ha mantenido en la fase S en la mayoría de los hepatocitos.

El tejido fibrótico en regeneración presenta venas portales rodeadas de bandas de fibrosis, a diferencia del parénquima las bandas pueden permanecer depositadas en los bordes de la vena porta. Las señales de PCNA corresponden a hepatocitos que se encuentran en la fase S y en la G1 durante el primer día (9.6M), después en los 3 días post hepatectomía (9.6N) los hepatocitos que están en la fase S conforman la mayor parte del área, posteriormente a los 7 días y 30 días (9.6O y 9.6P) los hepatocitos mantienen la señal de PCNA con una intensidad alta junto con otros hepatocitos que presentan la señal de PCNA en la fase G1.

9.6.3 Distribución^a e intensidad^b de PCNA en vena porta

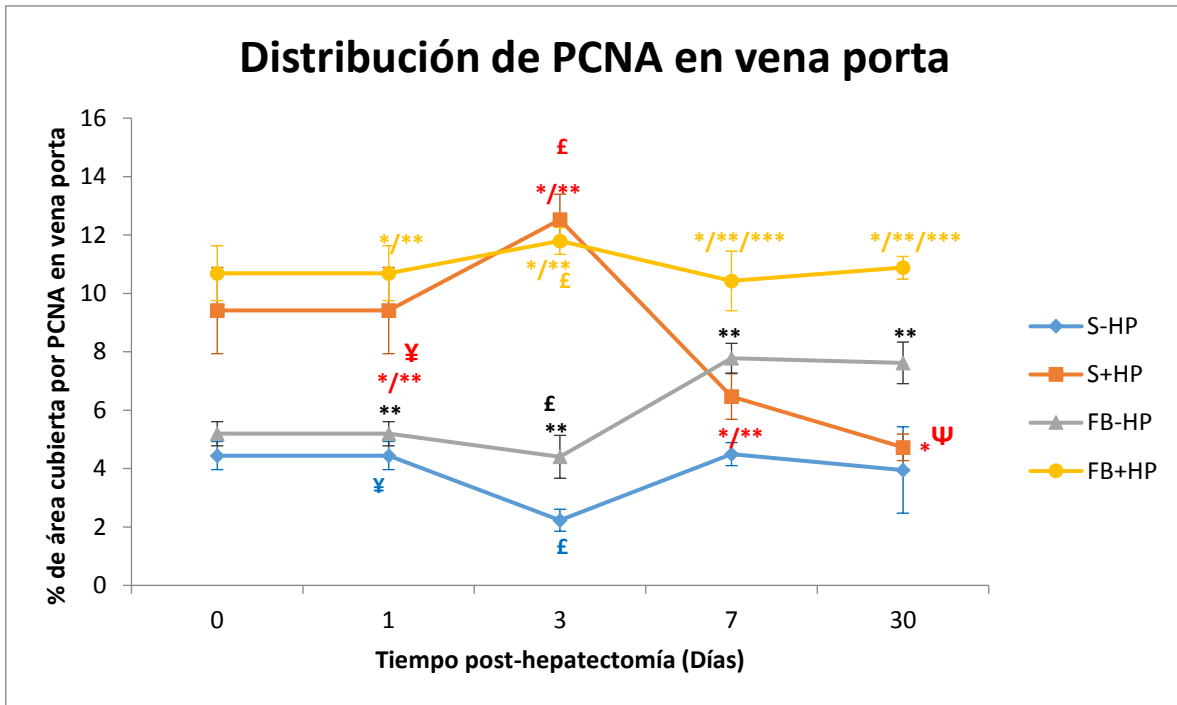
El área comprendida por PCNA en la gráfica 9.6.1 en el grupo con hepatectomía en condiciones normales (Línea naranja) y el grupo fibrótico en regeneración (Línea amarilla) muestran áreas de 9.41% y 10.68% respectivamente durante las primeras 24 horas del tratamiento, posteriormente el hígado va abarcando un área de 12.52% en el grupo sano en regeneración (Línea naranja) y un aumento del 11.79% en el tejido fibrótico en regeneración (Línea amarilla) dentro de las 72 horas post hepatectomía con respecto a los niveles normales. La vena porta responde con un descenso de PCNA alcanzando los niveles basales a los 30 días post hepatectomía, situación que no ocurre en el tejido fibrótico en regeneración (Línea amarilla) manteniendo un área de 10.87% hasta los 30 días post hepatectomía. En cuanto al grupo fibrótico (Línea gris) responde con una elevación progresiva hasta los 3 días post hepatectomía con un área de 7.78% durante los 3 días post hepatectomía, y finalmente alcanzando un área del 7.62% a los 30 días post hepatectomía.

El nivel de expresión representado en la gráfica 9.6.2 el grupo sano en regeneración (Línea naranja) presenta cambios en su elevación desde el primer día post hepatectomía iniciando con un aumento del 96.75% y alcanzando un punto máximo arriba del 100% con respecto a la intensidad cuantificada en condiciones normales. Después de este punto la intensidad de PCNA desciende rápidamente hasta dirigirse a la intensidad normal a los 30 días post hepatectomía. En el caso del grupo en regeneración (Línea amarilla) se mantiene elevado 30.8% arriba del nivel basal, y no es hasta el día 3 post hepatectomía cuando presenta un aumento más del 100% con respecto a la intensidad en condiciones normales, finalmente incrementa su expresión hasta un 48.63% arriba del valor basal de expresión. Al contrario el grupo fibrótico (Línea gris) se mantiene al margen de las condiciones normales durante el primer día post hepatectomía, y posteriormente mantiene un aumento del 56% a partir del día 3 post hepatectomía hasta el día 30 post hepatectomía.

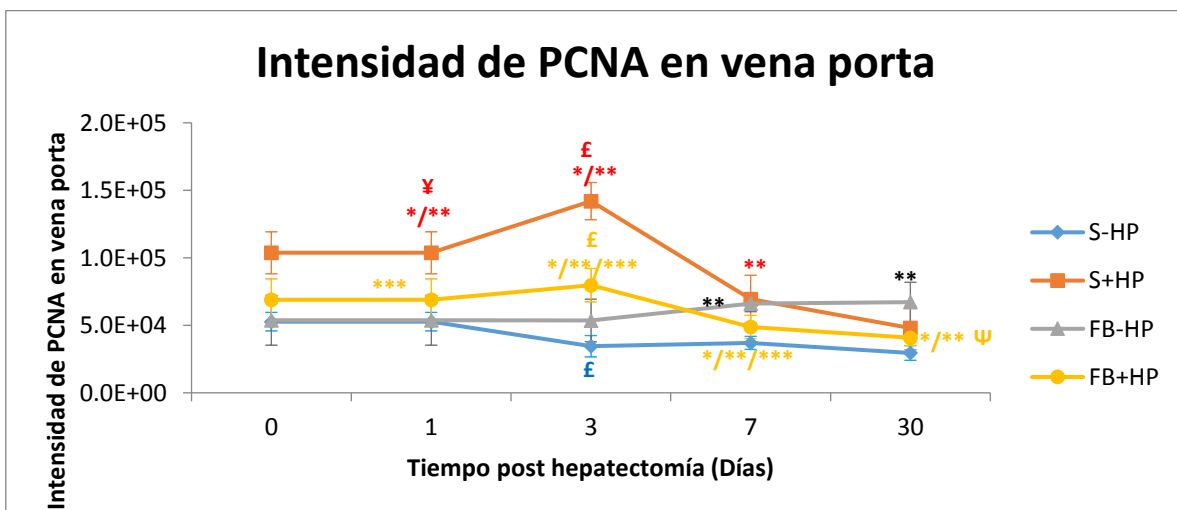
Tabla 9.6 Porcentajes de área e intensidades promedio de PCNA en las venas portales

Grupo	Área (%)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	4.445 ± 0.482 ^Y	2.230 ± 0.377 ^E	4.495 ± 0.394	3.952 ± 1.478 ^Ψ
	+HP	9.409 ± 1.476 ^{**Y}	12.523 ± 0.874 ^{***E}	6.469 ± 0.782 ^{***}	4.728 ± 0.454 ^{*Ψ}
Fibrótico	-HP	5.192 ± 0.414 ^{**}	4.403 ± 0.733 ^{***E}	7.778 ± 0.509 ^{**}	7.620 ± 0.712 ^{**}
	+HP	10.686 ± 0.939 ^{***}	11.795 ± 0.457 ^{***E}	10.426 ± 1.022 ^{***}	10.879 ± 0.387 ^{***}
Grupo	Intensidad (x10 ⁵)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	0.527 ± 0.068	3.45 ± 0.079 ^E	0.37 ± 0.048	0.295 ± 0.054
	+HP	1.03 ± 0.155 ^{**Y}	1.42 ± 0.138 ^{***E}	0.695 ± 0.176 ^{**}	0.479 ± 0.162
Fibrótico	-HP	0.537 ± 0.184	0.536 ± 0.158	0.660 ± 0.597 ^{**}	0.672 ± 0.147 ^{**}
	+HP	0.689 ± 0.153 ^{***}	0.797 ± 0.214 ^{***E}	0.488 ± 0.086 ^{***}	0.407 ± 0.056 ^{**Ψ}

^a Los incrementos de distribución de área se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta A\% = A\%_X - A\%_{S-HP}$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. ^b Los incrementos de intensidad se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta I\% = [I_X - I_{S-HP}/I_{S-HP}] \times 100$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. Diferencia estadística analizada por χ^2 en porcentaje de área y t-student en intensidad: *P ≤ 0.05 contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, **P ≤ 0.05 contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, ***P ≤ 0.05 contra el hígado sano en regeneración (S+HP). Y [P ≤ 0.05 día 1 contra día 3], E [P ≤ 0.05 día 3 contra día 7], Ψ [P ≤ 0.05 día 7 contra día 30].



Gráfica 9.6.1 Distribución de PCNA en vena porta. Hígado normal (línea azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (línea gris), hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por el porcentaje de área cubierta por el marcaje de PCNA. Significancia estadística analizada por χ^2 : * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). Υ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].



Gráfica 9.6.2 Intensidad de PCNA en vena porta. Hígado normal (línea azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (línea gris), hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por la intensidad del marcaje de PCNA. Significancia estadística analizada por t-student: * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). Υ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].

9.7 Inmunohistoquímica de PCNA en la vena central

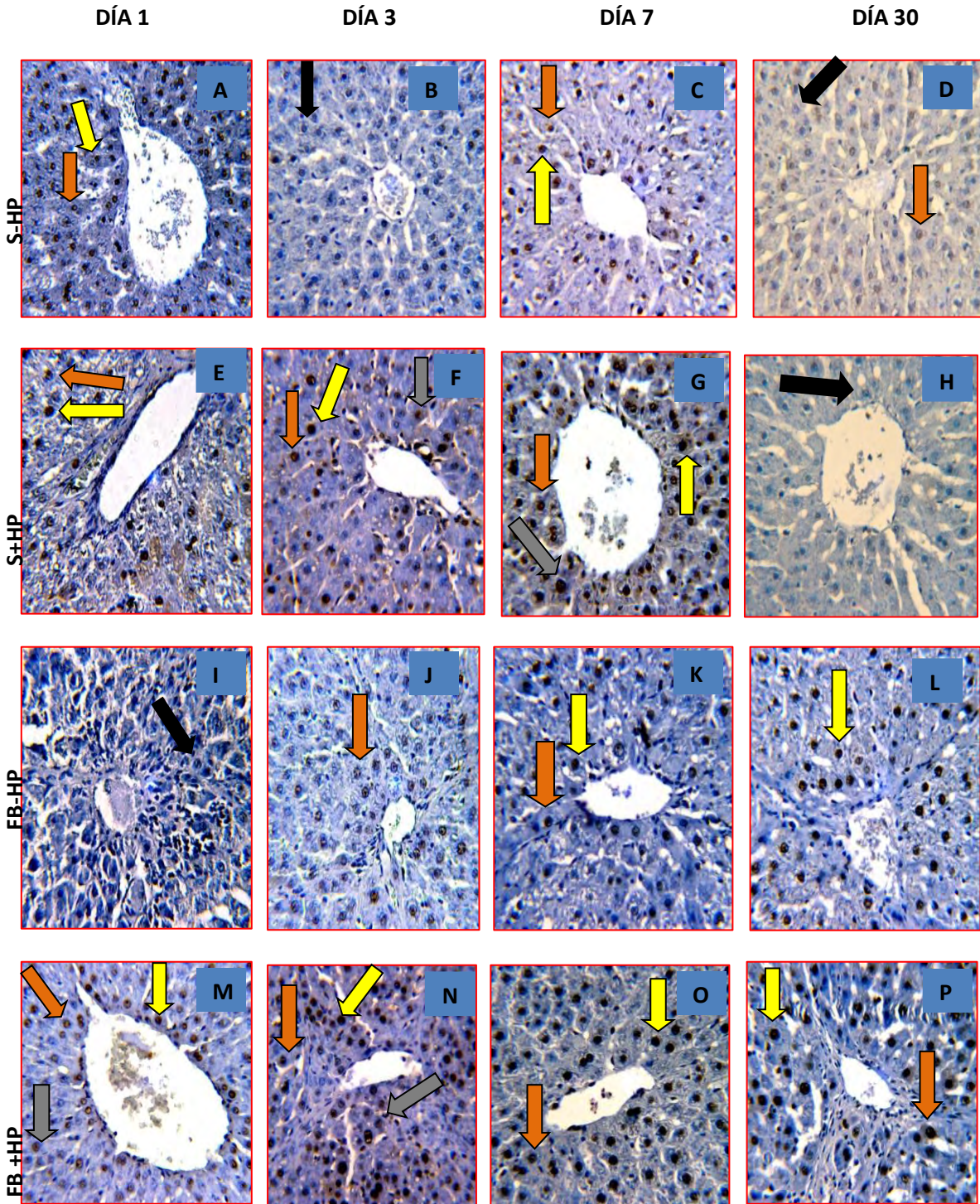


Figura 9.7 (A-D) expresión de PCNA en hígado normal (S-HP). (E-H) expresión de PCNA en hígado sano en regeneración (S+HP). (I-L) expresión de PCNA en hígado fibrótico (FB-HP). (M-P) expresión PCNA en tejido fibrótico en regeneración (FB+HP). Hepatocitos en fase G0 (Flecha negra), hepatocitos en fase G1 (naranja), hepatocitos en fase S (Flecha amarilla), hepatocitos en fase G2 (Flecha gris). Contraste con hematoxilina. Observaciones a 40x en microscopio óptico.

9.7.1 Morfología y detección de PCNA en la vena central del hígado normal e hígado normal con hepatectomía.

Los hepatocitos del tejido normal tienen una señal moderada en sus núcleos correspondiente a la fase S, incluso esta señal se encuentra en los hepatocitos que se ubican más alejados de la vena central durante el primer día de estudio (9.7A). A los 3 días de tratamiento (9.7B) los hepatocitos no presentan señales de PCNA en la vena central, pero a los 7 días (9.7C) la señal es intensa correspondiente a la fase S, la cual se observa en hepatocitos cerca de la vena central y en hepatocitos más alejados. En el día 30 del tratamiento (9.7D) el tejido mantiene la respuesta de PCNA con una intensidad moderada con los hepatocitos que están en la fase G1.

Los hepatocitos del tejido sano en regeneración presentan una intensidad alta durante el primer día post hepatectomía y corresponde a los hepatocitos que entran en la fase S del ciclo celular alrededor de la vena central y extendiéndose en las zonas alejadas (9.7E). A los 3 días post hepatectomía (9.7F) el tejido se ve conformado por hepatocitos en fase G1 y en la fase S, y los que están en la fase de síntesis rodean la vena central y parte de las zonas alejadas. Posteriormente a los 7 días post hepatectomía (9.7G) la señal de PCNA no varía, siendo los hepatocitos en la fase S los que predominan. En el día 30 (9.7H) la señal de PCNA es tenue junto con hepatocitos que no presentan señales de PCNA por lo que los hepatocitos entran a la fase G1.

9.7.2 Morfología y detección de PCNA en la vena central del hígado fibrótico e hígado fibrótico en regeneración.

El tejido fibrótico presenta venas centrales con mayor grosor gracias a la fibrosis resultante del daño. El tejido no presenta señales de PCNA en los núcleos de los hepatocitos que están cerca de la vena central y en sus áreas lejanas durante el primer día (9.7I). En el tercer día de tratamiento (9.7J) hay señales tenues de PCNA en los hepatocitos cercanos a la vena central por lo que están en la fase G1 y G0. A los 7 días (9.7K) la intensidad de PCNA se eleva en hepatocitos en la fase S, y se encuentran rodeando la vena central, y finalmente a los 30 días (9.7L) los hepatocitos comprenden intensidades desde la fase G1 y algunos en la fase S.

El tejido fibrótico en regeneración muestra venas centrales cuyos bordes no contienen bandas de fibrosis densas hasta el día 30 post hepatectomía donde se aprecia la vena central con un engrosamiento de las fibras de colágeno. Durante el primer día (9.7M) se hallan hepatocitos con una señal de PCNA tenue indicando de que estos hepatocitos están en fase G1, después en el día 3 post hepatectomía (9.7N) la vena central se rodea de hepatocitos tanto en fase G1 como en fase S, después la respuesta en el día 7 post hepatectomía (9.7O) la intensidad de PCNA es fuerte y corresponde a los hepatocitos en fase S, la misma intensidad se conserva en los hepatocitos al día 30 post hepatectomía (9.7P).

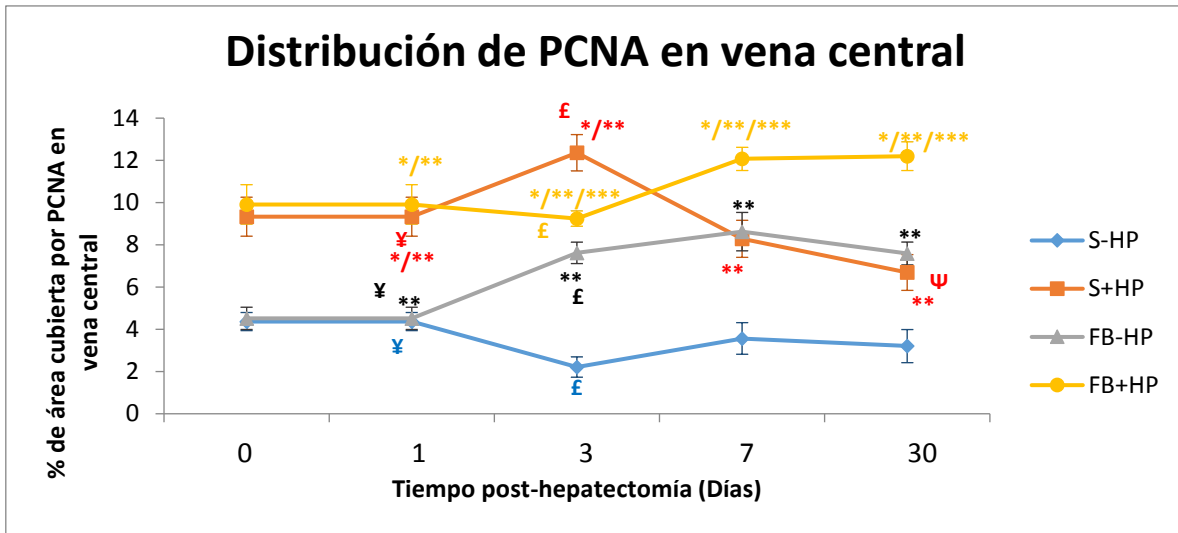
9.7.3 Distribución^a e intensidad^b de PCNA en vena central

La respuesta proliferativa del tejido (Gráfica 9.7.1) conserva el mismo patrón de cambios en el grupo sano en regeneración (Línea naranja) presentando un área de 9.33% durante el primer día, después, en el día 3 post hepatectomía alcanza un área máxima de 12.36%, tendiendo al porcentaje normal después a los 30 días post hepatectomía. En la vena porta los grupos fibróticos tienen cambios distintos a los que se muestran en las áreas anteriores, en el caso del grupo fibrótico (Línea gris) el área aumenta después del primer día post hepatectomía alcanzando un punto máximo a los 7 días post hepatectomía correspondiendo a un área del 8.62% y después va descendiendo en el periodo de 30 días post hepatectomía. Por otro lado el grupo fibrótico en regeneración presenta otra tendencia en sus áreas, durante el primer día se mantiene al margen del grupo con hepatectomía en condiciones normales (Línea amarilla) pero hasta después de los 3 días post hepatectomía el área de respuesta es de 9.24%, a los 7 días post hepatectomía se mantiene arriba con un área de 12.07% hasta los 30 días post hepatectomía. La intensidad de la expresión de PCNA (Gráfica 9.7.2) en el grupo sano en regeneración (Línea naranja) presenta una elevación del 45.8% durante la primer día post hepatectomía y presenta un incremento mayor al 100% con respecto al nivel basal de intensidad en condiciones normales (Línea azul) posteriormente desciende rápidamente hasta alcanzar los niveles normales a los 30 días post hepatectomía. En el caso de los grupos fibróticos durante el primer día de tratamiento se observa un aumento del 12.0% en el grupo fibrótico (Línea gris) y un aumento del 21.89% en el grupo fibrótico en regeneración con respecto a los niveles de intensidad en condiciones normales (Línea azul). Posteriormente los grupos fibróticos presentan diferentes patrones de intensidad a partir del día 3 post hepatectomía, siendo el grupo fibrótico en regeneración (Línea amarilla) el que aumenta al 100%. El grupo fibrótico (Línea gris) se presenta un nivel de intensidad cercano al nivel basal con respecto a las condiciones normales (Línea azul). Después de que el grupo fibrótico en regeneración (Línea amarilla) alcanza su punto máximo, a los 7 días mantiene una elevación del 55.63% con respecto a la intensidad basal hasta los 30 días post hepatectomía. Por el contrario en el grupo fibrótico (Línea gris) el nivel de intensidad permanece bajo frente al del grupo fibrótico en regeneración (Línea amarilla)

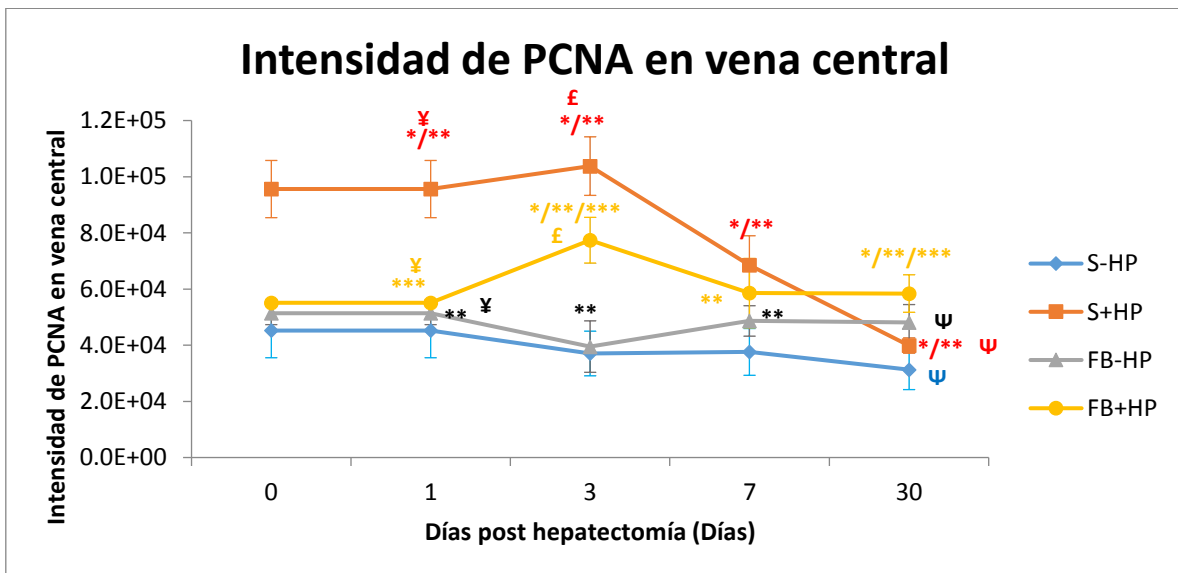
Tabla 9.7 Porcentajes de área e intensidades promedio de PCNA en las venas centrales.

Grupo	Área (%)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	4.367 ± 0.428 [¥]	2.213 ± 0.480 [£]	3.567 ± 0.748	3.204 ± 0.784
	+HP	9.333 ± 0.923 [¥]	12.359 ± 0.861 [£]	8.285 ± 0.877 ^{**}	6.69 ± 0.846 ^{**Ψ}
Fibrótico	-HP	4.519 ± 0.527 [¥]	7.621 ± 0.508 [£]	8.625 ± 0.909 ^{**}	7.59 ± 0.544 ^{**}
	+HP	9.916 ± 0.932 [¥]	9.242 ± 0.359 [£]	12.069 ± 0.549 [£]	12.197 ± 0.678 [£]
Grupo	Intensidad (x10 ⁵)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	0.452 ± 0.097	0.37 ± 0.079	0.376 ± 0.083	0.313 ± 0.071 ^Ψ
	+HP	0.956 ± 0.102 [¥]	1.03 ± 0.104 [£]	0.685 ± 0.105 [£]	0.398 ± 0.027 [£]
Fibrótico	-HP	0.514 ± 0.041 [¥]	0.395 ± 0.092 ^{**}	0.486 ± 0.054 ^{**}	0.481 ± 0.064 ^Ψ
	+HP	0.551 ± 0.011 [¥]	0.774 ± 0.081 [£]	0.585 ± 0.124 ^{**}	0.584 ± 0.066 [£]

^a Los incrementos de distribución de área se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta A\% = A\%_X - A\%_{S-HP}$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. ^b Los incrementos de intensidad se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta I_{p\%} = [I_X - I_{S-HP} / I_{S-HP}] \times 100$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. Diferencia estadística analizada por χ^2 en porcentaje de área y t-student en intensidad: *P≤ 0.05 contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, **P≤ 0.05 contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, ***P≤ 0.05 contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [P≤ 0.05 día 1 contra día 3], £ [P≤ 0.05 día 3 contra día 7], Ψ [P≤ 0.05 día 7 contra día 30].



Gráfica 9.7.1 distribución de PCNA en vena central. Hígado normal (línea azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (línea gris), hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por el porcentaje de área cubierta por el marcaje de PCNA. Significancia estadística analizada por χ^2 : * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). Υ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].



Gráfica 9.7.2 intensidad de PCNA en vena central. Hígado normal (línea azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (línea gris), hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por la intensidad del marcaje de PCNA. Significancia estadística analizada por t-student: * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). Υ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].

9.8 Distribución^a e intensidad^b total de PCNA

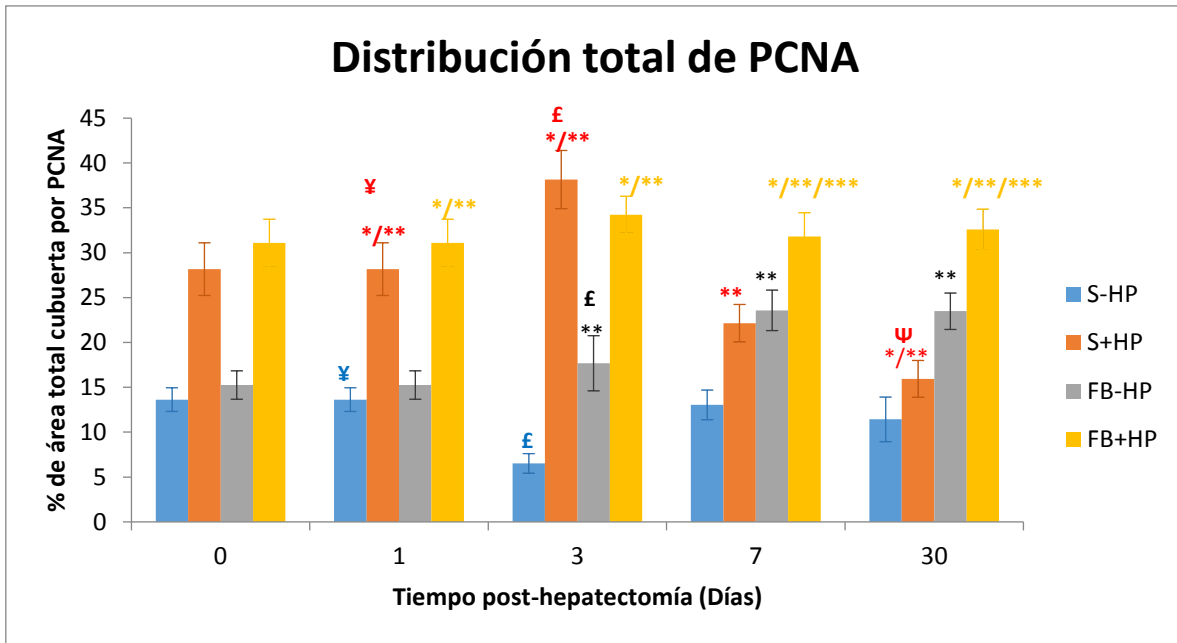
El antígeno de proliferación celular (PCNA) representa el curso de las células que se encuentran desde su fase de crecimiento hasta la nueva síntesis de DNA en la fase S para promover la proliferación del tejido hepático. En la gráfica 9.8.1, el grupo fibrótico (barra gris) presenta un incremento de PCNA del 27.72% arriba respecto al nivel basal al tercer día de tratamiento, hasta llegar a un nivel estable 10.54% arriba del porcentaje de área basal a partir del día 7. La hepatectomía en condiciones normales (barra naranja) presenta un incremento de 14.54% durante las primeras 24 horas y después de los 3 días post hepatectomía el pico máximo es de 27.72%, una vez alcanzado el pico máximo, el área se reduce hasta alcanzar los niveles normales. La distribución de PCNA en el grupo fibrótico en regeneración (barra amarilla) se mantiene elevado a lo largo del tratamiento presentando un nivel máximo que comprende un aumento del 27.7% en el día 3 post hepatectomía con respecto al nivel basal en condiciones normales (barra azul) y que se mantiene elevado 21.17% con referencia al nivel basal al día 30 post-hepatectomía.

En la intensidad de PCNA (Gráfica 9.8.2) generalmente se ven elevados los grupos fibróticos durante las primeras 24 horas aumentando 24.06% para el grupo fibrótico (barra gris) y 35.6% para el fibrótico en regeneración (barra amarilla), la diferencia entre ambos se observa hasta el día 3 post hepatectomía donde el grupo fibrótico en regeneración (barra amarilla) eleva su nivel de expresión 53.53% con respecto al nivel basal y 48.7% con respecto al grupo fibrótico (barra gris), pero al día 7 post hepatectomía se observa una disminución del efecto con la intensidad del grupo fibrótico (barra gris) y continuando con el mismo aumento hasta los 30 días post hepatectomía. En el caso de la intensidad de PCNA en el grupo con hepatectomía bajo condiciones normales (barra azul) los núcleos marcados con PCNA abarcan un área mucho mayor, mostrando una segunda elevación del 62.82% dentro de los 3 días post-hepatectomía con respecto a los niveles cuantificados en condiciones normales (barra azul).

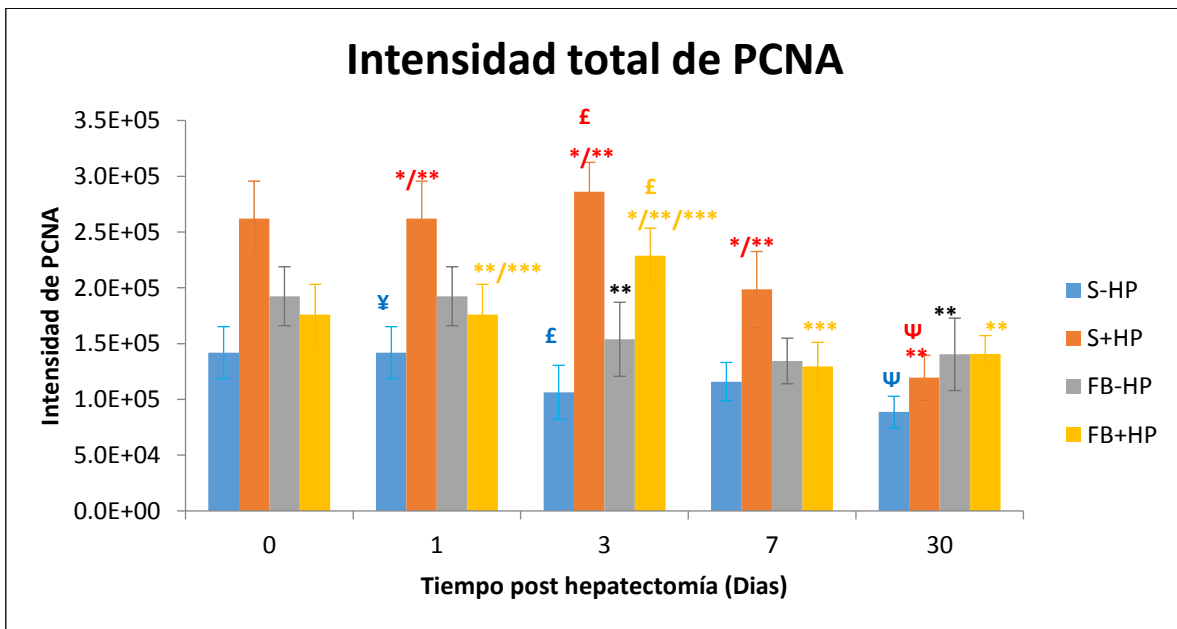
Tabla 9.8 Porcentajes de área e intensidades promedio totales de PCNA

Grupo	Área (%)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	13.629 ± 1.317 [¥]	6.524 ± 1.084 [£]	13.041 ± 1.659	11.426 ± 2.492
	+HP	28.169 ± 2.934 ^{¥**}	38.154 ± 3.243 ^{£**}	22.145 ± 2.089 ^{**}	15.946 ± 2.048 ^{£**} ^Ψ
Fibrótico	-HP	15.252 ± 1.581	17.676 ± 3.074 ^{**} [£]	23.58 ± 2.258 ^{**}	23.481 ± 2.033 ^{**}
	+HP	31.078 ± 2.661 ^{£**}	34.248 ± 2.048 ^{£**}	31.803 ± 2.652 ^{£**} ^{***}	32.594 ± 2.268 ^{£**} ^{***}
Grupo	Intensidad (x10 ⁵)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	1.42 ± 0.233 [¥]	1.06 ± 0.242 [£]	1.16 ± 0.172	8.86 ± 0.141 ^Ψ
	+HP	2.62 ± 0.336 ^{£**}	2.86 ± 0.265 ^{£**}	1.98 ± 0.388 ^{£**}	1.19 ± 0.201 ^{**}
Fibrótico	-HP	1.74 ± 0.211	1.54 ± 0.332 ^{**}	1.34 ± 0.205	1.4 ± 0.325 ^{**}
	+HP	1.95 ± 0.324 ^{£**} ^{***}	2.28 ± 0.247 ^{£**} ^{***} [£]	1.29 ± 0.217 ^{**}	1.41 ± 0.165 ^{**}

^a Los incrementos de distribución de área se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta A\% = A\%_X - A\%_{S-HP}$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. ^b Los incrementos de intensidad se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta I\% = [I_X - I_{S-HP} / I_{S-HP}] \times 100$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. Diferencia estadística analizada por χ^2 en porcentaje de área y t-student en intensidad: *P ≤ 0.05 contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, **P ≤ 0.05 contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, ***P ≤ 0.05 contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [P ≤ 0.05 día 1 contra día 3], £ [P ≤ 0.05 día 3 contra día 7], Ψ [P ≤ 0.05 día 7 contra día 30].



Gráfica 9.8.1 Distribución total de PCNA. Hígado normal (barra azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (barra gris), hígado fibrótico en regeneración (barra amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por el porcentaje de área cubierta por el marcaje de PCNA. Significancia estadística analizada por χ^2 : * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].



Gráfica 9.8.2 Intensidad total de PCNA. Hígado normal (barra azul), hígado sano en regeneración (barra naranja), hígado fibrótico (barra gris), hígado fibrótico en regeneración (barra amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por la intensidad del marcaje de PCNA. Significancia estadística analizada por t-student: * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].

9.9 Inmunohistoquímica de P22 en el parénquima

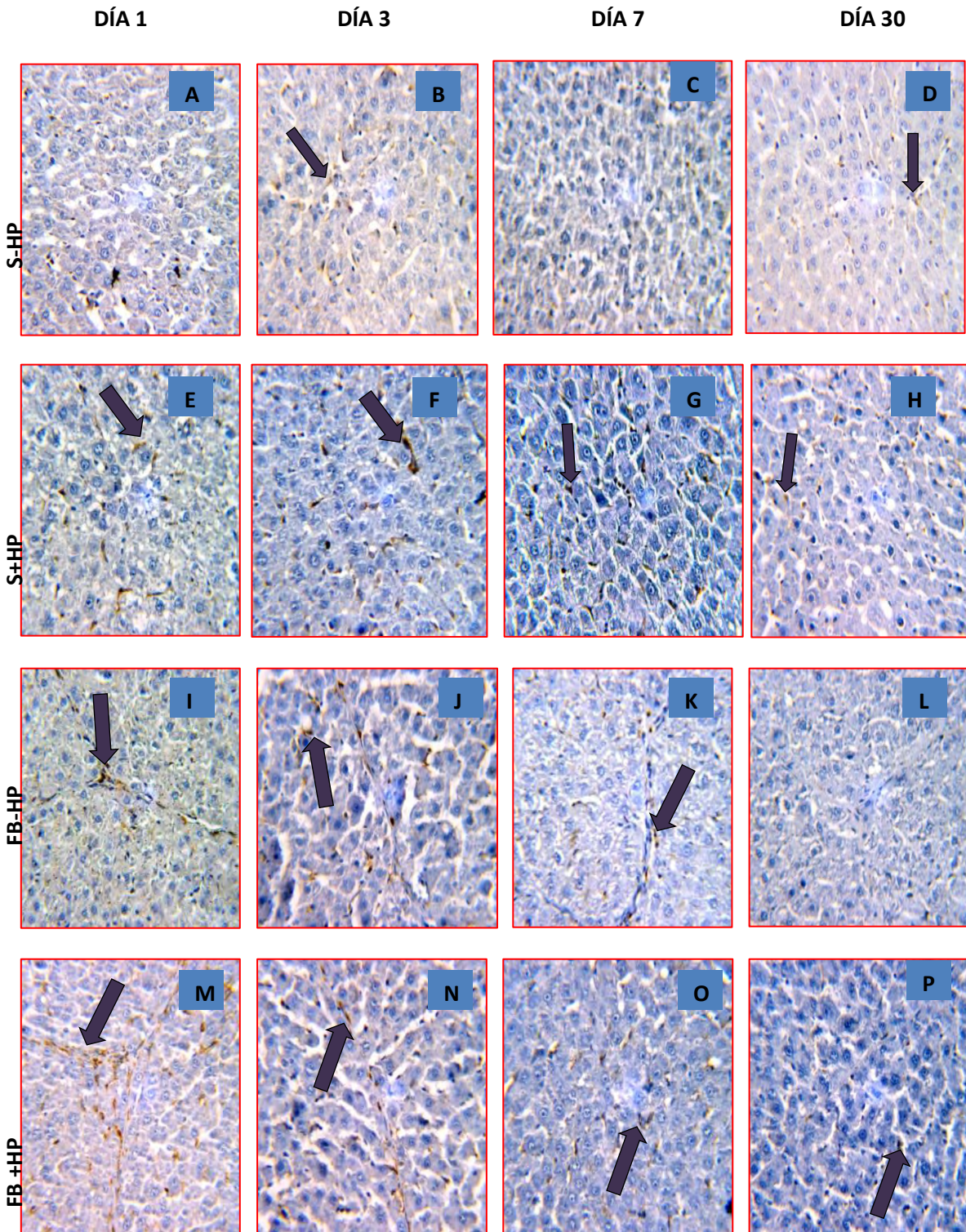


Figura 9.9 (A-D) expresión de P22 en hígado normal (S-HP). (E-H) expresión de P22 en hígado sano en regeneración (S+HP). (I-L) expresión de P22 en hígado fibrótico (FB-HP). (M-P) expresión P22 en tejido fibrótico en regeneración (FB+HP). Expresión de P22 en sinusoides (Flecha morada). Contraste con hematoxilina. Observaciones a 40x en microscopio óptico.

9.9.1 Morfología y detección de P22 en el parénquima del hígado normal e hígado normal con hepatectomía.

Se detectó p22 debido a que es la subunidad de la NADPH oxidasa, la cual es una fuente importante del estrés oxidante durante los mecanismos de proliferación y muerte celular. El tejido normal muestra señales de P22 moderadas durante el día 1 y 3 después del tratamiento (9.9A y 9.9B), la señal de P22 se localiza en los sinusoides del lobulillo. A partir del día 7 después del tratamiento la señal de P22 es baja en intensidad y reduce su área a lo largo de los 30 días (9.9C y 9.9D)

El hígado sano en regeneración presenta señales de P22 intensas cubriendo todas las zonas del parénquima durante el primer y tercer día post-hepatectomía (9.9E y 9.9F) dónde la señal de p22 es intensa en varios sinusoides en el parénquima. Posteriormente hay señales de P22 en el día 7 (9.9G) y 30 post hepatectomía (9.9H) que tienen menor intensidad y menor área del parénquima hasta que regresa a los niveles normales de intensidad en el tejido.

9.9.2 Morfología y detección de P22 en el parénquima del hígado fibrótico e hígado fibrótico en regeneración.

El tejido fibrótico presenta señales intensas de P22 sobre todo concentradas cerca de las bandas de fibrosis durante el primer día de tratamiento (9.9I), en el día 3 la señal se vuelve más tenue y se encuentra no solo cerca de las bandas de fibrosis sino que también en los sinusoides que están apartados de las bandas (9.9J). A los 7 días (9.9K) conforme el tejido reduce las bandas de fibrosis en el parénquima, los sinusoides expresan P22 con menor intensidad y también reduce el área que lo expresa. A los 30 días se detectan señales de P22 y las fibras de colágena han reducido su grosor (9.9L).

El tejido fibrótico en regeneración presenta señales intensas de P22 tanto en las bandas de fibrosis como en los sinusoides que se encuentran apartados de ellas. En el día 3 post hepatectomía (9.9M) las bandas de fibrosis van degradándose mientras que la señal de P22 se localiza en los sinusoides apartados de las bandas y con una intensidad reducida. A partir del día 7 post hepatectomía (9.9O) el hígado ha degradado los depósitos de matriz extracelular mientras que la señal de P22 también se encuentra disminuida tanto en área como en intensidad. Finalmente a los 30 días post hepatectomía (9.9P) las bandas de fibrosis son imperceptibles y la señal de P22 ha disminuido hasta los niveles basales.

9.9.3 Distribución^a e intensidad^b de P22 en parénquima

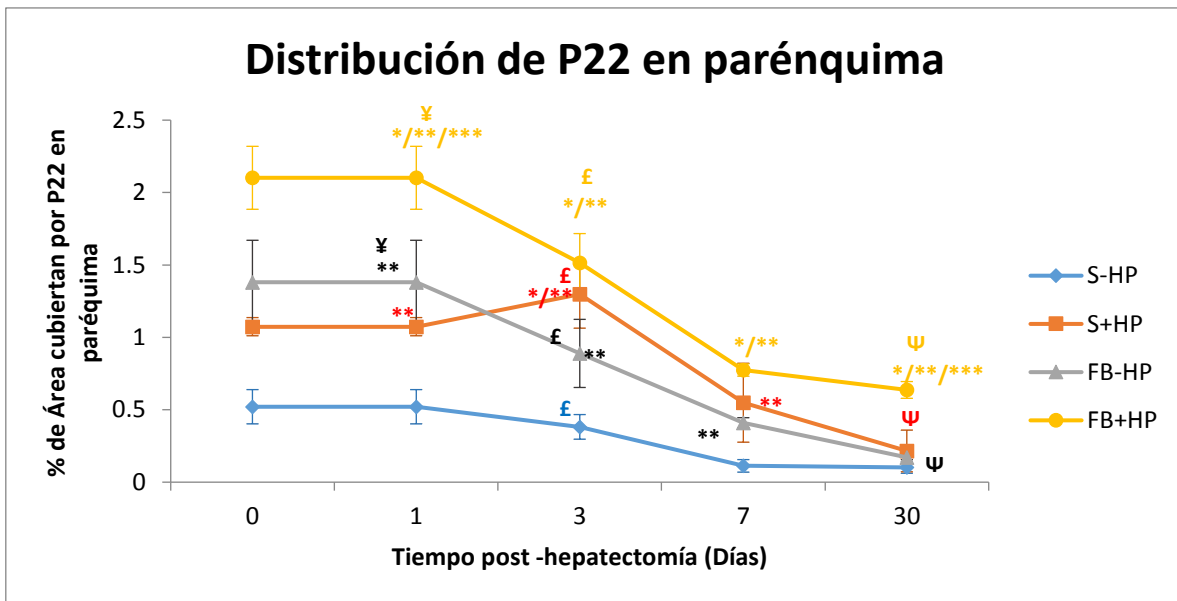
En la gráfica 9.9.1 el área de respuesta en el parénquima tiene un área de 1.38% en el grupo fibrótico (Línea gris) durante el primer día de tratamiento, descendiendo continuamente entre un promedio de 0.5% y 0.7% hasta los 30 días post hepatectomía sobre el área basal en condiciones normales (Línea azul). Por otro lado el grupo sano en regeneración (Línea naranja) aumenta hasta un de 1.07% durante el primer día post hepatectomía, mientras que el grupo fibrótico en regeneración (Línea amarilla) presenta un área del 2.01%, lo que corresponde al triple de área respondiendo sobre las condiciones normales y, al doble sobre las condiciones de fibrosis. Posteriormente el grupo con hepatectomía en condiciones normales (Línea naranja) expande su respuesta a los 3 días post hepatectomía hasta un 1.29% de área, a su vez alcanza un límite por el cuál desciende para regresar al área correspondiente a las condiciones normales, pero el grupo fibrótico en regeneración supera esta área y, a partir de este periodo desciende para alcanzar un área límite dónde continúa respondiendo 5 veces por arriba de las condiciones normales.

En las intensidades presentadas en la gráfica 9.9.2 la intensidad en el grupo sano en regeneración (Línea naranja) se encuentra elevado 64.26% por encima del nivel de intensidad normal (Línea azul), mientras que los grupos fibróticos tienen un aumento superior al 100%, siendo el grupo fibrótico en regeneración (Línea amarilla) el de mayor aumento de intensidad. Los grupos fibróticos y el grupo con hepatectomía en condiciones normales intersectan en el tercer día post hepatectomía, a partir de este periodo comienzan a descender en las mismas proporciones de intensidad hasta alcanzar el nivel de intensidad basal en condiciones normales.

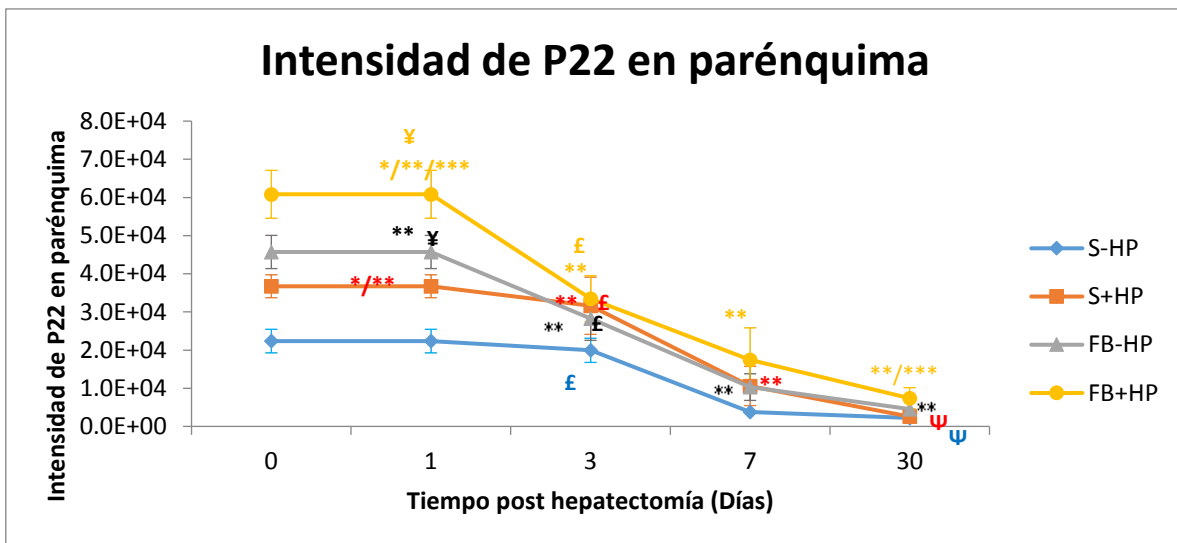
Tabla 9.9 Porcentajes de área e intensidades de P22 en el parénquima hepático

Grupo	Área (%)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	0.521 ± 0.118	0.382 ± 0.085 [£]	0.113 ± 0.043	0.102 ± 0.04
	+HP	1.074 ± 0.063 ^{**}	1.298 ± 0.234 ^{*/£}	0.549 ± 0.272 ^{**}	0.216 ± 0.144 ^ψ
Fibrótico	-HP	1.381 ± 0.289 ^{**¥}	0.889 ± 0.235 ^{**£}	0.411 ± 0.034	0.171 ± 0.015 ^ψ
	+HP	2.102 ± 0.217 ^{*/**¥}	1.514 ± 0.202 ^{*/£}	0.775 ± 0.042 ^{*/}	0.637 ± 0.058 ^{*/**/ψ}
Grupo	Intensidad (x10 ⁴)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	2.24 ± 0.309	1.99 ± 0.317 [£]	3.81 ± 0.008	2.21 ± 0.054 ^ψ
	+HP	3.67 ± 0.3 ^{*/}	3.16 ± 0.75 ^{**£}	1.06 ± 0.513 ^{**}	0.256 ± 0.111 ^ψ
Fibrótico	-HP	4.57 ± 0.430 ^{**¥}	2.82 ± 0.560 ^{**£}	1.03 ± 0.348 ^{**}	1.03 ± 0.349 ^{**ψ}
	+HP	6.08 ± 0.628 ^{*/**¥}	3.34 ± 0.604 ^{**£}	1.75 ± 0.833 ^{**}	7.38 ± 0.277 ^{*/**/ψ}

^a Los incrementos de distribución de área se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta A\% = A\%_X - A\%_{S-HP}$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. ^b Los incrementos de intensidad se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta I\% = [I_X - I_{S-HP} / I_{S-HP}] X 100$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. Diferencia estadística analizada por χ^2 en porcentaje de área y t-student en intensidad: *P≤ 0.05 contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, **P≤ 0.05 contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, ***P≤ 0.05 contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [P≤ 0.05 día 1 contra día 3], £ [P≤ 0.05 día 3 contra día 7], ψ [P≤ 0.05 día 7 contra día 30].



Gráfica 9.9.1 Distribución de P22 en parénquima. Hígado normal (línea azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (línea gris), hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por el porcentaje de área cubierta por el marcaje de PCNA. Significancia estadística analizada por χ^2 : * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].



Gráfica 9.9.2 Intensidad de P22 en parénquima. Hígado normal (línea azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (línea gris), hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por la intensidad del marcaje de PCNA. Significancia estadística analizada por t-student: * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].

9. 10 Inmunohistoquímica de P22 en la vena porta

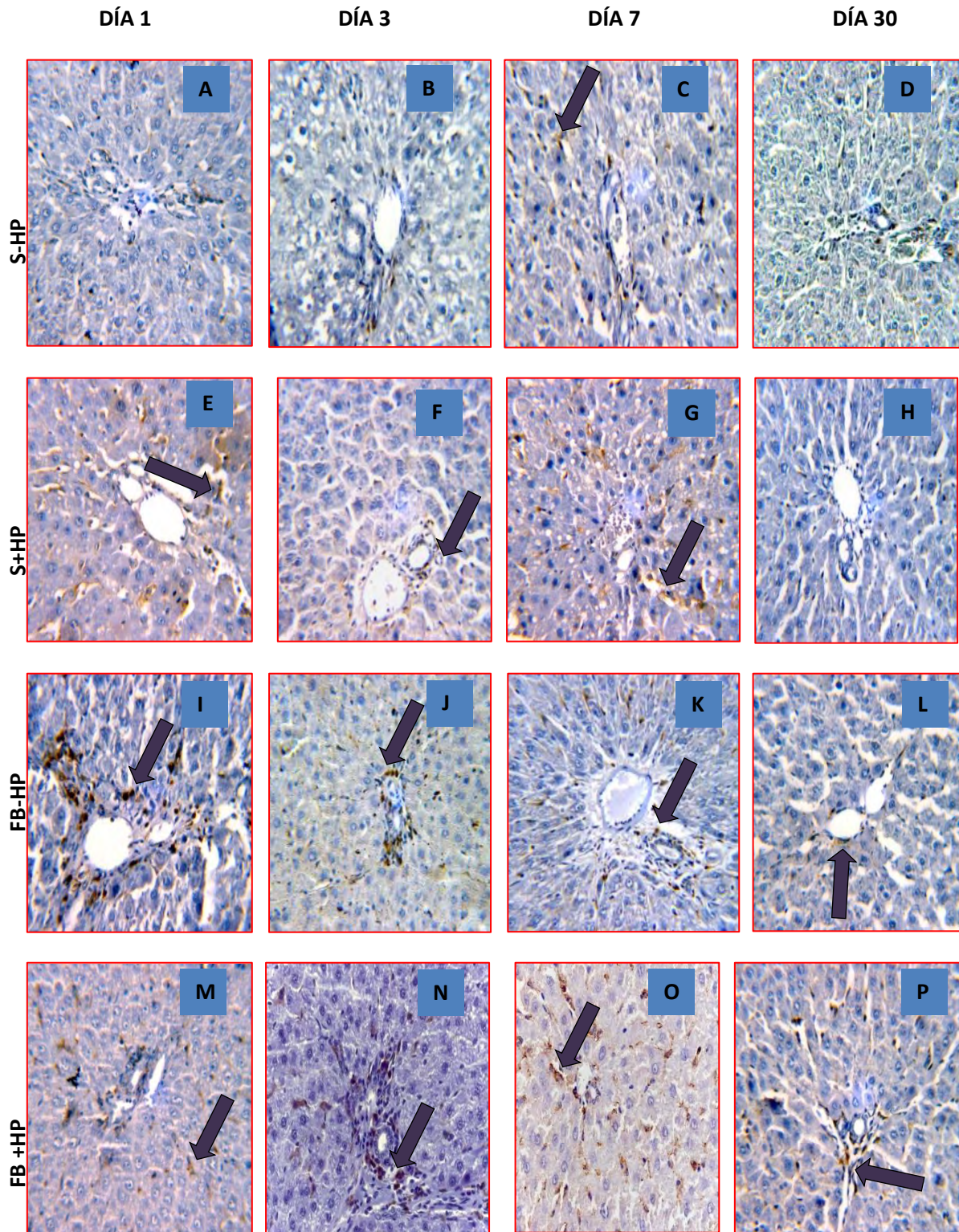


Figura 9.10 (A-D) expresión de P22 en hígado normal (S-HP). (E-H) expresión de P22 en hígado sano en regeneración (S+HP). (I-L) expresión de P22 en hígado fibrótico (FB-HP). (M-P) expresión P22 en tejido fibrótico en regeneración (FB+HP). Expresión de P22 en sinusoide (Flecha morada). Contraste con hematoxilina. Observaciones a 40x en microscopio óptico.

9.10.1 Morfología y detección de P22 en la vena porta del hígado normal e hígado normal con hepatectomía.

El tejido normal presenta señales con intensidad baja de P22 alrededor de las venas portas y se mantiene expresado en el contorno de la triada portal y en los sinusoides apartados de la vena (9.10A a 9.10B), durante el día 7 (9.10C) la distribución de P22 abarca un número menor de zonas al igual que la intensidad disminuye. En el día 30 post hepatectomía (9.10D) la intensidad y la distribución de la señal de P22 es escasa.

El tejido sano en regeneración muestra que por el efecto de la hepatectomía, la presencia del estrés oxidante señalado por P22 abarca más sinusoides alrededor de la vena porta y también en las zonas distales durante el primer día (9.910E), en el día 3 post hepatectomía (9.10F) la señal de P22 está reducida y limitada al contorno de la vena porta y a los 7 días (9.10G) se distingue una intensidad débil de P22 pero distribuida en los sinusoides lejanos a la vena porta y en el contorno de la misma. A los 30 días post hepatectomía (9.10H) la intensidad y distribución de P22 se encuentran con una expresión reducida.

9.10.2 Morfología y detección de P22 en la vena porta del hígado fibrótico e hígado fibrótico en regeneración.

El tejido fibrótico muestra venas portales con una densa capa de matriz extracelular depositada en los bordes de la vena porta y extendiéndose a las demás zonas que conforman al lobulillo, la intensidad de P22 es alta y comprende las zonas apartadas de la vena porta durante el primer día (9.10I), a los 3 días (9.10J) las intensidades más fuertes se concentran en los sinusoides cerca de la vena porta cuya fibrosis aún continúa siendo densa, a los 7 días post hepatectomía (9.10K) la distribución de P22 se localiza tanto en los sinusoides cerca de la vena porta como en los sinusoides apartados de ella, la intensidad se ve reducida de la misma forma que la vena presenta menos fibrosis. A los 30 días (9.10L) las bandas de fibrosis que se encontraban densas en un principio ahora persisten con un grosor reducido y las señales de P22 adquieren una intensidad similar a los niveles normales y su distribución es en los sinusoides cerca de la vena porta y en las zonas alejadas.

El tejido fibrótico en regeneración se puede observar modificaciones de la vena porta, en el primer día (9.10M) se observan bordes densos con fibras de colágeno y se detecta P22 con señales intensas a los alrededores y en los sinusoides apartados de la triada, en el día 3 post hepatectomía (9.10N) las fibras de colágeno que cubren a las venas portales son más gruesas al igual que la respuesta de P22 se vuelve más fuerte en los sinusoides cercanos a la zona de la vena porta. Después a los 7 días post hepatectomía (9.10O) las bandas que cubren a las venas portales van degradándose presentando un grosor reducido, y la señal de P22 reduce su intensidad pero su área de respuesta continúa siendo mayor en comparación a los demás grupos. Finalmente a los 30 días post hepatectomía (9.10P) se conserva una banda de fibrosis bastante delgada y la señal de P22 se observa con una intensidad disminuida.

9.10.3 Distribución^a e intensidad^b de P22 en vena porta

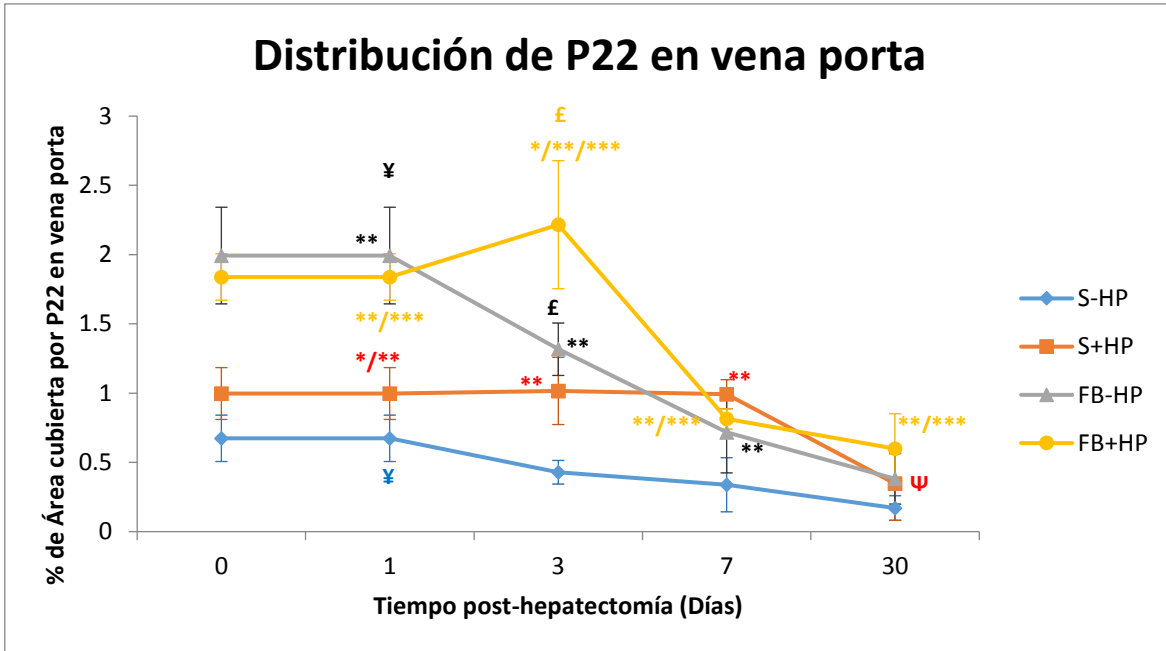
En la gráfica 9.10.1 se presenta el área que responde al estrés oxidante en áreas vecinas a la vena porta. En el grupo con hepatectomía en condiciones normales (Línea naranja) el área es de 0.99% el cual se mantiene constante hasta el día 7 post hepatectomía donde presenta un descenso para descender al porcentaje de área correspondiente a los niveles normales. Por otro lado los cambios del estrés oxidante son mayores durante el primer día post hepatectomía presentando un área de 1.99% para el grupo fibrótico (Línea gris) y uno del 1.83% para el grupo fibrótico en regeneración (Línea amarilla), sin embargo difieren en su tendencia en el día 3 post hepatectomía que es cuando el grupo fibrótico (Línea gris) tiene un continuo descenso hasta el día 30 post hepatectomía para aproximarse al área basal como en el caso del grupo sano en regeneración (Línea naranja), mientras que el fibrótico en regeneración (Línea amarilla) alcanza un punto máximo, un área de 2.21%. A partir de este punto comienza su descenso deteniendo su disminución a los 7 días post hepatectomía permaneciendo arriba con un área de 0.6 % a los 30 días post hepatectomía.

En la gráfica 9.10.2 el nivel de intensidad entre el grupo fibrótico (Línea gris) y el grupo sano en regeneración (Línea naranja) aumentan 118.4% y 108.7% respectivamente por encima de la intensidad en condiciones normales (Línea azul) durante el primer día post hepatectomía, después durante su descenso sus intensidades intersectan en el día 5 post hepatectomía y ambos grupos, las intensidades de ambos grupos acoplan sus intensidades conforme descienden para alcanzar el nivel de intensidad mínima normal a los 30 días hepatectomía. Por otro lado el grupo fibrótico en regeneración (Línea amarilla) representa un aumento del 191.05 % por encima del nivel de intensidad en condiciones normales durante el primer día post hepatectomía, posteriormente va descendiendo y conservando una elevación del 30% por encima de las condiciones normales hasta llegar a los niveles en el día 30 post hepatectomía.

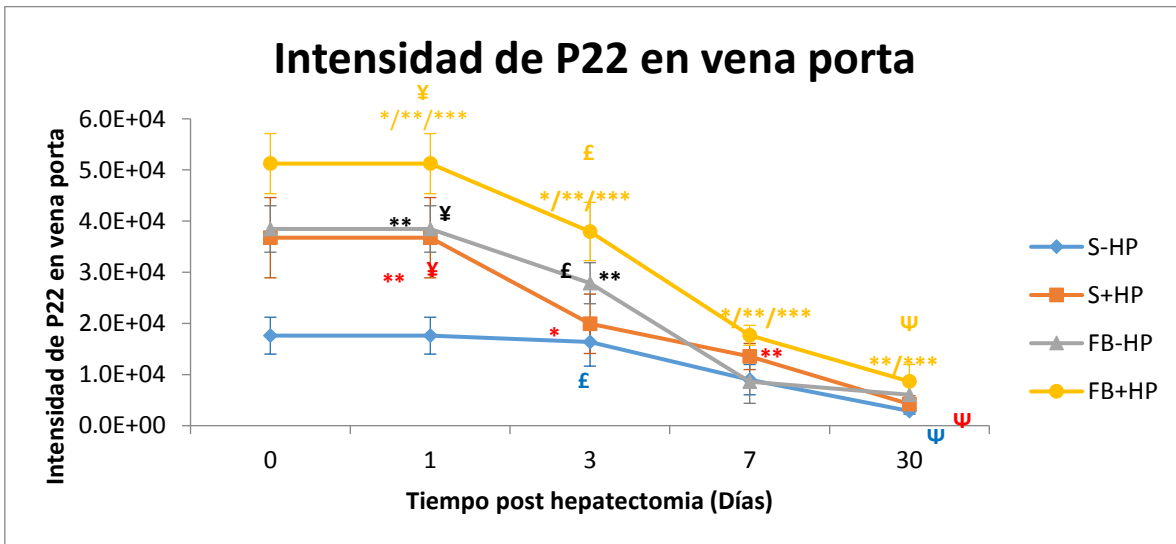
Tabla 9.10 Porcentajes de área e intensidades promedio de P22 en las venas portales.

Grupo	Área (%)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	0.674 ± 0.167 [¥]	0.429 ± 0.085	0.338 ± 0.195	0.17 ± 0.088,
	+HP	1.016 ± 0.243 ^{***}	1.016 ± 0.243 ^{**}	0.992 ± 0.104 ^{**}	0.347 ± 0.265 ^Ψ
Fibrótico	-HP	1.993 ± 0.349 ^{**¥}	1.317 ± 0.189 ^{**£}	0.716 ± 0.292 ^{**}	0.382 ± 0.182
	+HP	1.838 ± 0.167 ^{***}	2.216 ± 0.462 ^{***£}	0.814 ± 0.073 ^{***}	0.599 ± 0.252 ^{***}
Grupo	Intensidad (x10 ⁴)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	1.76 ± 0.360	1.64 ± 0.452 [£]	8.99 ± 0.296	2.87 ± 0.058 ^Ψ
	+HP	3.67 ± 0.785 ^{**¥}	1.99 ± 0.582 [*]	1.35 ± 0.256 ^{**}	0.422 ± 0.161 ^Ψ
Fibrótico	-HP	3.85 ± 0.454 ^{**¥}	2.78 ± 0.402 ^{**£}	8.57 ± 0.420	0.640 ± 0.265
	+HP	5.12 ± 0.588 ^{***¥}	3.79 ± 0.569 ^{***£}	1.77 ± 0.194 ^{***}	0.864 ± 0.334 ^{***Ψ}

^a Los incrementos de distribución de área se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta A\% = A\%_X - A\%_{S-HP}$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. ^b Los incrementos de intensidad se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta I\% = [I_X - I_{S-HP} / I_{S-HP}] \times 100$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. Diferencia estadística analizada por χ^2 en porcentaje de área y t-student en intensidad: *P≤ 0.05 contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, **P≤ 0.05 contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, ***P≤ 0.05 contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [P≤ 0.05 día 1 contra día 3], £ [P≤ 0.05 día 3 contra día 7], Ψ [P≤ 0.05 día 7 contra día 30].



Gráfica 9.10.1 Distribución de P22 en vena porta. Hígado normal (línea azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (línea gris), hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por el porcentaje de área cubierta por el marcaje de PCNA. Significancia estadística analizada por χ^2 : * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). \forall [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].



Gráfica 9.10.2 Intensidad de P22 en vena porta. Hígado normal (línea azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (línea gris), hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por la intensidad del marcaje de PCNA. Significancia estadística analizada por t-student: * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). \forall [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].

9. 11 Inmunohistoquímica de P22 en la vena central

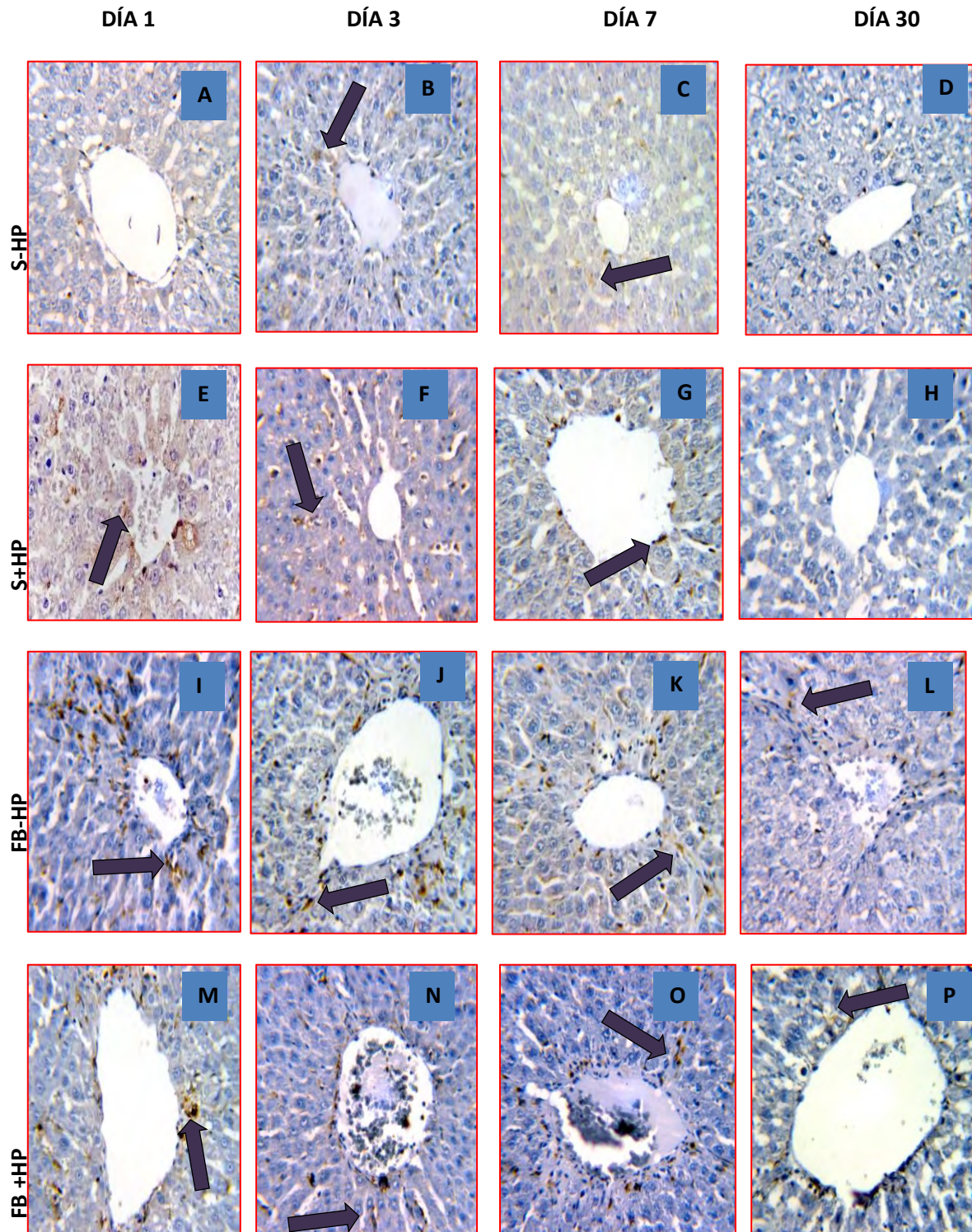


Figura 9.11 (A-D) expresión de P22 en hígado normal (S-HP). (E-H) expresión de P22 en hígado sano en regeneración (S+HP). (I-L) expresión de P22 en hígado fibrótico (FB-HP). (M-P) expresión P22 en tejido fibrótico en regeneración (FB+HP). Expresión de P22 en sinusoide (Flecha morada). Contraste con hematoxilina. Observaciones a 40x en microscopio óptico.

9.11.1 Morfología y detección de P22 en la vena porta del hígado normal e hígado normal con hepatectomía.

El tejido hepático normal presenta venas centrales con sus espacios sinusoidales centrados hacia la vena, la señal de P22 tiene una intensidad débil y se distribuye en los sinusoides apartados de la vena central (9.11A), a los tres días post hepatectomía (9.11B) la señal de P22 se dispone en los sinusoides cerca de la vena central con una intensidad moderada. Posteriormente a los 7 días (9.11C) hay más señales de P22 que se encuentran en los bordes de la vena central y en los sinusoides cercanos a ella con una intensidad reducida. A los 30 días (9.11D) la señal de P22 reduce su intensidad y su distribución en la vena central.

El tejido sano en regeneración presenta las señales de P22 distribuidas en los sinusoides distales y cercanos de la vena central con una intensidad elevada (9.11E). A los 3 días la intensidad de P22 disminuye pero sigue abarcando sinusoides en áreas alejadas y cercanas (9.11F). A los 7 días (9.11G) P22 responde en los sinusoides cercanos a la vena central, por lo que su área se ve reducida con una intensidad tenue. A los 30 días (9.11H) la señal de P22 es escasa, y no se observa su distribución en el tejido.

9.11.2 Morfología y detección de P22 en la vena porta del hígado fibrótico e hígado fibrótico en regeneración.

El tejido fibrótico presenta venas centrales gruesas debido a las fibras de colágeno que se van sintetizando en los bordes de las venas centrales, a su vez las señales de P22 se encuentran distribuidas en las zonas cercanas a las venas centrales, al igual que concentradas cerca de las fibras de colágeno que se extienden hacia la periferia de la vena central y algunas marcas en los sinusoides que no están en contacto con las fibras de colágeno durante el primer día post hepatectomía (9.11I) las fibras de colágeno van siendo más delgadas y las señales de P22 se van concentrando hacia los bordes de las venas centrales (9.11J). A los 7 días (9.11K) en las venas centrales persisten algunas fibras de colágeno en los bordes, las señales de P22 son más tenues y se distribuyen principalmente en los bordes de las venas y también cerca de las fibras de colágena. A los 30 días (9.11L) fibras de colágeno permanecen y se concentran en los bordes de la vena central. La señal de P22 es tenue y se localiza en los sinusoides vecinos de la vena central por lo que su intensidad y área se reducen al final de los 30 días.

El tejido fibrótico en regeneración presenta las venas centrales con fibras de colágeno depositados en sus bordes y las señales de P22 se encuentran con una intensidad alta y con una distribución comprendida entre los sinusoides vecinos y los sinusoides alejados de la vena central (9.11M), en el día 3 post hepatectomía (9.11N) las fibras se reducen y la intensidad de P22 disminuye y su distribución se localiza primordialmente en los alrededores de la vena central. A los 7 y 30 días post hepatectomía la remodelación de la fibrosis progresa reduciendo el grosor de las fibras en los bordes de la vena central y las señales de P22 permanecen en los sinusoides del borde de la vena con una intensidad moderada (9.11O y 9.11P)

9.11.3 Distribución^a e intensidad^b de P22 en vena central

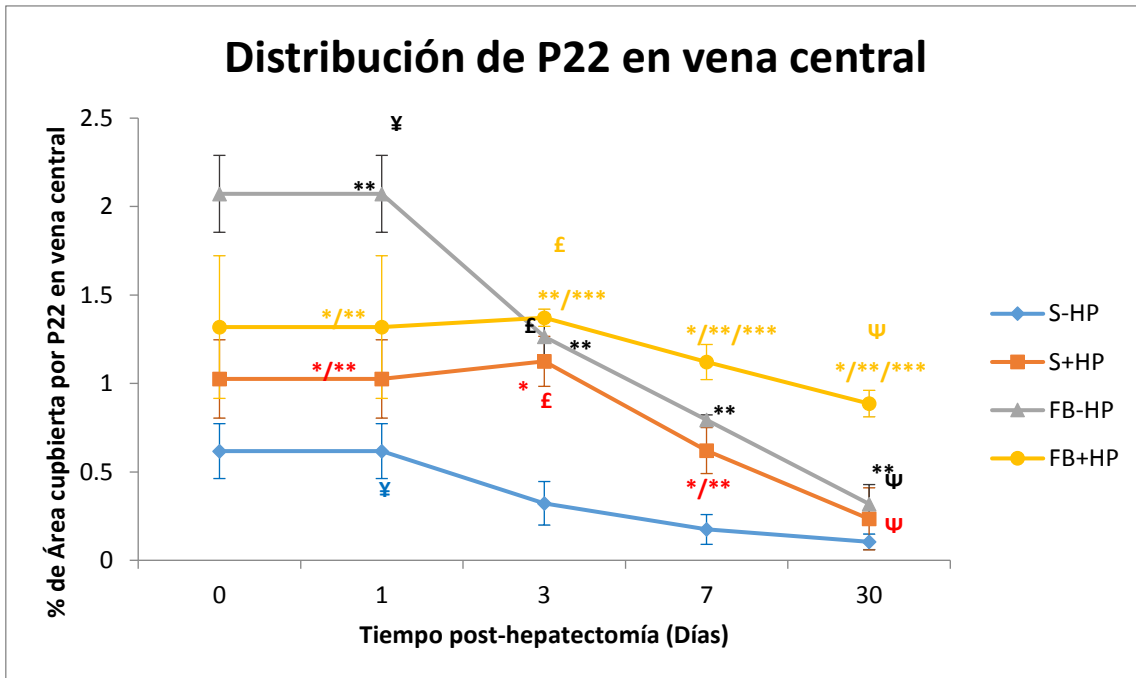
En la gráfica 9.11.1 se muestra la distribución de P22 en las áreas alrededor de las venas centrales. El grupo fibrótico (Línea gris) responde con una expansión del 2.07% de área por encima del área en condiciones normales (Línea azul) durante el primer día post hepatectomía, posteriormente descendiendo continuamente 0.60% en cada punto hasta aproximarse al área mínima en condiciones normales en el día 30 post hepatectomía. Por otro lado el grupo sano en regeneración (Línea naranja) y el grupo fibrótico en regeneración (Línea amarilla) tienen un aumento menor en comparación al grupo fibrótico comprendiendo áreas de 1.02% y 1.32% respectivamente durante el primer día post hepatectomía. En el día 3 post hepatectomía las áreas de los grupos fibróticos y el del grupo con hepatectomía en condiciones normales coinciden estrechamente en porcentaje marcando para cada uno un descenso continuo, siendo el grupo fibrótico (Línea gris) y el grupo con hepatectomía en condiciones normales (Línea naranja) los que se aproximan al área normal con un aumento de 0.21% y 0.13% respectivamente sobre las condiciones normales, mientras que el grupo fibrótico en regeneración permanece arriba con un área de 0.88%.

La intensidad de P22 en la gráfica 9.11.2 tiene un nivel mayor de expresión en el grupo fibrótico en regeneración (Línea amarilla) cuya intensidad percibe un aumento de 285.26% por encima de la intensidad normal en condiciones normales durante el primer día post hepatectomía manteniéndose por arriba hasta el día 30 post hepatectomía con un aumento del 177.93%. Por otro lado el grupo fibrótico (Línea gris) y el grupo sano en regeneración (Línea naranja) muestran un aumento intermedio de 213.16% y 172.411% respectivamente por encima del nivel de intensidad en condiciones normales (Línea azul), posteriormente sus intensidades intersectan en el día 5 post hepatectomía, periodo donde comienzan a descender en proporciones similares hasta alcanzar los niveles de intensidad normal en el día 30 post hepatectomía.

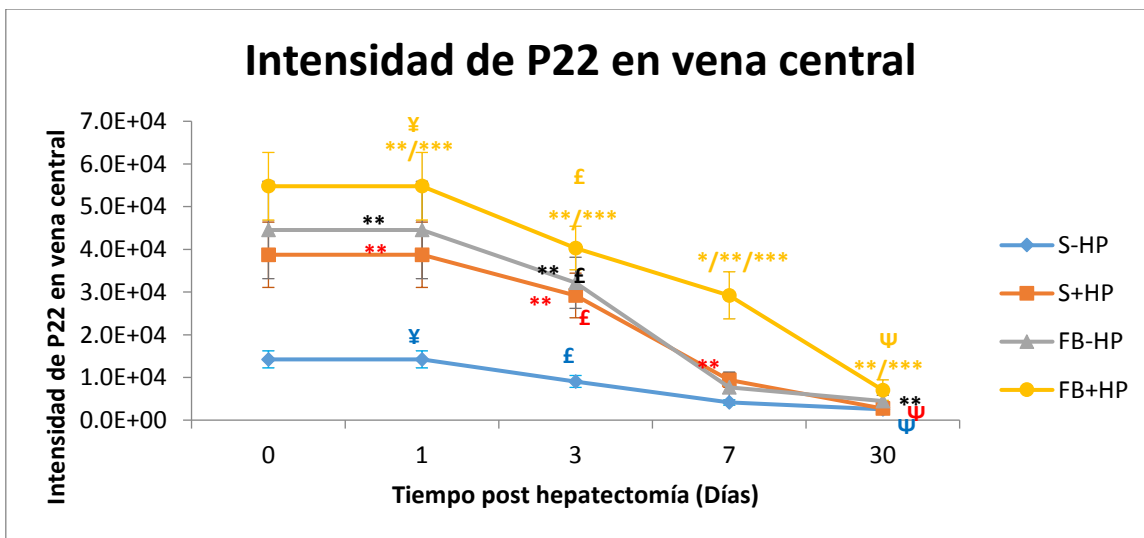
Tabla 9.11 Porcentajes de área e intensidades promedio de P22 en las venas centrales

Grupo	Área (%)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	0.617 ± 0.155 [¥]	0.322 ± 0.123	0.174 ± 0.084	0.104 ± 0.044
	+HP	1.025 ± 0.221 ^{¥**}	1.125 ± 0.141 [£]	0.621 ± 0.129 ^{¥**}	0.234 ± 0.175 ^Ψ
Fibrótico	-HP	2.072 ± 0.217 [¥]	1.264 ± 0.155 [£]	0.793 ± 0.028 ^{**}	0.318 ± 0.109 ^{**Ψ}
	+HP	1.318 ± 0.403 ^{¥**}	1.372 ± 0.048 ^{£***}	1.121 ± 0.099 ^{£***}	0.886 ± 0.075 ^{£***Ψ}
Grupo	Intensidad (x10 ⁴)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	-HP	1.42 ± 0.199 [¥]	0.906 ± 0.139 [£]	0.413 ± 0.061	0.253 ± 0.045 ^Ψ
	+HP	3.97 ± 0.766 ^{**}	2.92 ± 0.524 [£]	0.939 ± 0.17 ^{**}	0.271 ± 0.118 ^Ψ
Fibrótico	-HP	4.45 ± 0.114 ^{**}	3.24 ± 0.598 [£]	0.771 ± 0.356	0.446 ± 0.138
	+HP	5.48 ± 0.791 ^{£***}	4.03 ± 0.511 ^{£***}	2.92 ± 0.552 ^{£***}	0.702 ± 0.239 ^{£***Ψ}

^a Los incrementos de distribución de área se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta A\% = A\%_X - A\%_{S-HP}$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. ^b Los incrementos de intensidad se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta I\% = [I_X - I_{S-HP}/I_{S-HP}] \times 100$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. Diferencia estadística analizada por χ^2 en porcentaje de área y t-student en intensidad: *P ≤ 0.05 contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, **P ≤ 0.05 contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, ***P ≤ 0.05 contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [P ≤ 0.05 día 1 contra día 3], £ [P ≤ 0.05 día 3 contra día 7], Ψ [P ≤ 0.05 día 7 contra día 30].



Gráfica 9.11.1 Distribución de P22 en vena central. Hígado normal (línea azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (línea gris), hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por el porcentaje de área cubierta por el marcaje de P22. Significancia estadística analizada por χ^2 : * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].



Gráfica 9.11.2 Intensidad de P22 en vena central. Hígado normal (línea azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (línea gris), hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por la intensidad del marcaje de P22. Significancia estadística analizada por t-student: * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].

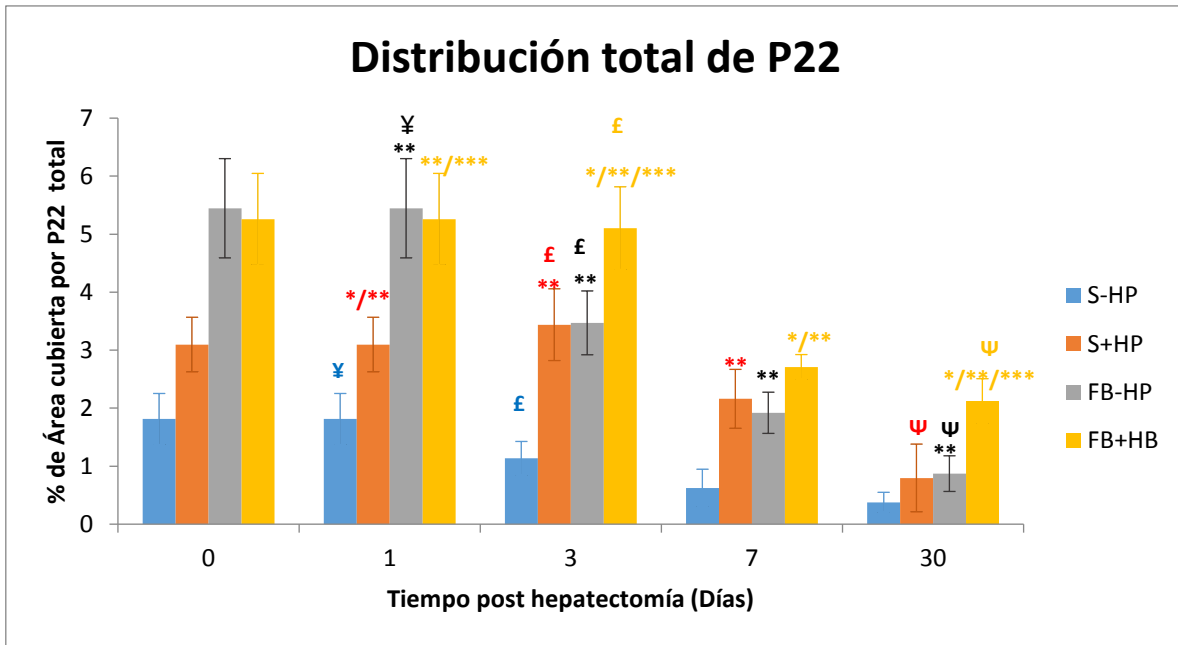
9.12 Distribución^a e intensidad^b total de P22

En la gráfica 9.12.1 el área que responde P22 en el hígado tiene un aumento máximo en los grupos fibróticos. Durante el primer día el hígado fibrótico (barra gris) tiene un aumento del 3.63% y el hígado fibrótico en regeneración (barra amarilla) tiene un aumento del 3.45% con respecto al área basal de los sinusoides en condiciones normales (S-HP), pero el hígado fibrótico en regeneración (barra amarilla) conserva este incremento hasta después de los 3 días post hepatectomía, disminuyendo el área de respuesta hasta un 1.74% por arriba de las condiciones normales a los 30 días post hepatectomía, mientras que el hígado fibrótico (barra gris) comienza a descender hasta un 0.07% de diferencia con el área basal. Por otro lado el patrón del hígado sano en regeneración (barra naranja) muestra una elevación de área del 1.28% con respecto al área basal en condiciones normales (barra azul) durante el primer día de tratamiento y teniendo un incremento del 2.9% a los 3 días post hepatectomía, es en este punto cuando el área del hígado fibrótico y el hígado con hepatectomía en condiciones normales (barra naranja) coinciden hasta que tienden ambos hacia el área basal de respuesta. La intensidad (Gráfica 9.12.2) en el hígado con hepatectomía en condiciones normales (barra naranja) aumenta su área de respuesta incrementando al 107.10% durante el primer día post hepatectomía con respecto a lo cuantificado en condiciones normales, posteriormente disminuye hasta alcanzar el nivel de intensidad en condiciones normales (barra azul) a los 30 días post hepatectomía. El hígado fibrótico (barra gris) y el fibrótico en regeneración (barra amarilla) presentan una elevación de intensidad del 137.75% y 207.5% respectivamente sobre el área basal en condiciones normales durante el primer día post hepatectomía, posteriormente el descenso de área del grupo fibrótico interseca a los 5 días post hepatectomía con el área del hígado con hepatectomía en condiciones normales (barra naranja), mientras que la intensidad del grupo fibrótico en regeneración continua presentando el doble de aumento. A partir de este periodo tanto el grupo fibrótico y el grupo con hepatectomía en condiciones normales se acoplan alcanzando el área mínima en condiciones normales (barra azul) a los 30 días post hepatectomía, por otro lado el grupo fibrótico en regeneración conserva un aumento máximo del 200% por arriba del nivel basal de intensidad al final.

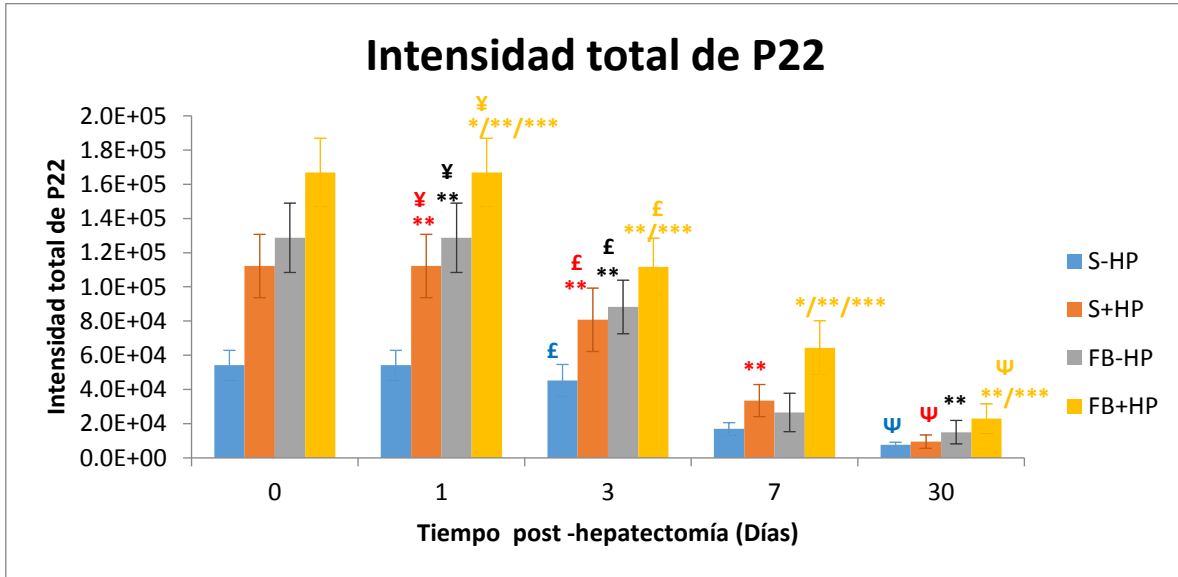
Tabla 9.12 Porcentajes de área e intensidades promedio totales de P22

Grupo	Área (%)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	S-HP	1.812 ± 0.441 ^Y	1.133 ± 0.293 ^F	0.625 ± 0.322	0.377 ± 0.173
	S+HP	3.096 ± 0.471 ^{Y*}	3.438 ± 0.618 ^{**E}	2.162 ± 0.507 ^{**}	0.796 ± 0.584 ^Ψ
Fibrótico	FB-HP	5.446 ± 0.856 ^{**Y}	3.469 ± 0.549 ^{**E}	1.921 ± 0.355 ^{**}	0.871 ± 0.307 ^{**Ψ}
	FB+HP	5.259 ± 0.788 ^{**Y}	5.102 ± 0.713 ^{**E}	2.709 ± 0.214 ^{**}	2.122 ± 0.385 ^{**Ψ}
Grupo	Intensidad (x10 ⁵)	Día 1	Día 3	Día 7	Día 30
Sano	S-HP	0.542 ± 0.087	0.454 ± 0.093 ^E	0.169 ± 0.036	0.076 ± 0.015 ^Ψ
	S+HP	1.12 ± 0.185 ^{**Y}	0.807 ± 0.018 ^{**E}	0.335 ± 0.094 ^{**}	0.095 ± 0.039 ^Ψ
Fibrótico	FB-HP	1.29 ± 0.203 ^{**Y}	0.882 ± 0.256 ^{**E}	0.266 ± 0.112	0.15 ± 0.068 ^{**}
	FB+HP	1.67 ± 0.201 ^{**Y}	1.12 ± 0.168 ^{**E}	0.644 ± 0.158 ^{**}	0.23 ± 0.085 ^{**Ψ}

^a Los incrementos de distribución de área se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta A\% = A\%_X - A\%_{S-HP}$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. ^b Los incrementos de intensidad se calcularon con respecto al hígado en condiciones normales: $\Delta I\% = [I_X - I_{S-HP} / I_{S-HP}] \times 100$ donde X=S+HP, FB-HP y FB+HP. Diferencia estadística analizada por χ^2 en porcentaje de área y t-student en intensidad: *P≤ 0.05 contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, **P≤ 0.05 contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, ***P≤ 0.05 contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ^Y [P≤ 0.05 día 1 contra día 3], ^E [P≤ 0.05 día 3 contra día 7], ^Ψ [P≤ 0.05 día 7 contra día 30].



Gráfica 9.12.1 Distribución total de P22. Hígado normal (línea azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (línea gris), hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por el porcentaje de área cubierta por el marcaje de P22. Significancia estadística analizada por χ^2 : * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].



Gráfica 9.12.2 intensidad total de P22. Hígado normal (línea azul), hígado sano en regeneración (línea naranja), hígado fibrótico (línea gris), hígado fibrótico en regeneración (línea amarilla). Los resultados son el promedio \pm DE de por lo menos 5 observaciones independientes por grupo experimental, y están expresados por la intensidad del marcaje de P22. Significancia estadística analizada por t-student: * $P \leq 0.05$ contra el hígado fibrótico (FB-HP) a un mismo tiempo, ** $P \leq 0.05$ contra el hígado normal (S-HP) a un mismo tiempo, *** $P \leq 0.05$ contra el hígado sano en regeneración (S+HP). ¥ [$P \leq 0.05$ día 1 contra día 3], £ [$P \leq 0.05$ día 3 contra día 7], Ψ [$P \leq 0.05$ día 7 contra día 30].

X. DISCUSIÓN

Desde hace muchos años se ha tenido conocimiento de que el hígado es un órgano con una capacidad regenerativa importante para el organismo, modulando su masa de acuerdo a sus requerimientos funcionales, proliferando bajo condiciones de deficiencia funcional, y recurriendo a la apoptosis en casos de exceso funcional. En ambos procesos, el hígado tiende a la remodelación de su fisiología orgánica para preservar su organización histológica habitual (74,75) apoyándose de un equilibrio de señales que dirigen la proliferación y la apoptosis. Además el hígado es muy versátil dado que durante la regeneración de las células hepáticas continua realizando funciones metabólicas cruciales tales como la regulación de la glucosa, síntesis de proteínas sanguíneas, secreción de bilis, y la biodegradación de los compuestos tóxicos (74). Por lo tanto el hígado responde a diversos estímulos, incluso respondiendo a estímulos que comprometen su funcionamiento y equilibrio dependiendo del impacto que tenga el estímulo sobre el órgano, un ejemplo es la pérdida de masa hepática por la administración de sustancias hepatotóxicas como el CCl_4 ; sin embargo este método corre el riesgo provocar una necrosis hepática por la respuesta inflamatoria que puede conducir a un daño irreversible imposibilitando la regeneración hepática, es por eso que la remoción quirúrgica del 70% de hígado, es un método comúnmente aplicado en todos los modelos experimentales (76).

La regeneración hepática y la respuesta al daño crónico involucran mecanismos que requieren grandes cantidades de energía para poder reestablecer la homeostasis del microambiente que sostiene al hígado, aprovechando la activación de vías especializadas en el estímulo de la proliferación y apoptosis. El hígado tiene ciertos mecanismos para determinar el inicio y el término de su regeneración ante un daño agudo y crónico, y para ello necesita la iniciación de una mayor cantidad de genes que se asocian con la cinética de la proliferación celular tales como genes asociados al ciclo celular, factores de transcripción y otros que aunque no son mitógenos en sí contribuyen a la optimización del proceso regenerativo (76).

El modelo realizado en este proyecto consistió en la administración de suero porcino durante nueve semanas para provocar un daño crónico y por lo tanto el desarrollo del hígado fibrótico al cual posteriormente se le practicó la hepatectomía parcial al 70% para estimular la regeneración de la masa hepática. La regeneración del hígado estudiada a partir de la resección de 2/3 o 70% de su masa ha tenido un perfil fisiológico interesante, diversos estudios indican la estimulación coordinada e inhibición de genes de protección, estrés oxidante y proliferación en un proceso que comprende 2 fases críticas, la primera es conocida como la "Fase preliminar" por su denominación en inglés "Priming phase" que tiene duración de 36 a 72 horas y la segunda que es conocida como "Fase terminal" o conocida por su denominación en inglés "Terminal phase" la cual comienza después de las 72 horas donde completa una recuperación mayor al 70% de masa hepática hasta 7 días post hepatectomía en roedores (77)

10. 1 Distribución e Intensidad del marcador antiapoptótico Bcl-2

Durante la primera fase de la regeneración se observa que Bcl-2 se detecta en el citoplasma de los hepatocitos, tanto en los grupos fibróticos (FB+HP y FB-HP) como en el grupo con hepatectomía en condiciones normales. La cuantificación de área obtenida refleja que durante la fase preliminar en los grupos fibróticos se observa una mayor área de respuesta por encima de las condiciones normales, esto quiere decir que hay una mayor población de células respondiendo tanto a la fibrosis como a la hepatectomía, siendo el grupo fibrótico en regeneración (FB+HP) el de mayor distribución (Gráfica 9.4.1). Al contrario del área, la intensidad de Bcl-2 tiene una tendencia que no se asocia con el porcentaje de área, tomando en cuenta que la intensidad refleja el tipo de respuesta observada en cierta población de células, el efecto de la hepatectomía en condiciones normales (S+HP) durante la primera fase de la regeneración refleja una intensidad promedio baja, lo mismo sucede con el grupo fibrótico en regeneración (FB+HP), por lo que el estímulo no es antiapoptótico sino que se da lugar a la muerte celular.

En condiciones normales el 50% del tejido expresa Bcl-2, pero en el grupo fibrótico en regeneración las células Bcl-2 positivas asciende a un 86% de las cuales 33% del tejido corresponde al parénquima que presenta un nivel más discreto de expresión de Bcl-2 (1.64×10^5) por efecto de la hepatectomía, mientras que el 53% corresponde al área de las zonas perivasculares, siendo la vena porta la que expresa una intensidad mayor a la del parénquima (1.78×10^5) durante la primera fase del estudio. En el parénquima hepático los factores que tienen un efecto significativo son la fibrosis y la hepatectomía durante el día 1 ($p \leq 0.05$) sobre el área y la intensidad de Bcl-2 en el grupo fibrótico en regeneración frente al grupo fibrótico y los grupos sanos. A partir del día 3 post hepatectomía el efecto significativo principal es el de la hepatectomía donde la intensidad de Bcl-2 interseca con los niveles normales y el área desciende progresivamente (Gráfica 9.1.2). En el caso de la vena porta la diferencia significativa entre el grupo fibrótico en regeneración y los grupos sanos se da únicamente por la fibrosis en la elevación del porcentaje de área (24%) y de la disminución de la intensidad (1.78×10^5) durante el día 1, pero en el transcurso del tiempo hasta el día 3, el efecto de la hepatectomía implica una $p \leq 0.05$ por el grupo fibrótico en regeneración frente al grupo fibrótico y al grupo sano señalando un cambio en la tendencia de la intensidad y del área (Gráfica 9.2.2). En la vena central la fibrosis y la hepatectomía inducen la elevación de área (28.93%) y la disminución de intensidad (1.62×10^5) durante el día 1 post hepatectomía con una $p \leq 0.05$ frente al grupo fibrótico y el sano sin hepatectomía, y sin diferencia entre grupos hepatectomizados (9.3.2). Además el efecto de la hepatectomía presenta diferencias significativas durante el intervalo de tiempo entre el día 1 y el día 3 post hepatectomía ya que posteriormente es cuando la intensidad alcanza los niveles normales y comienza el descenso de área.

Diversos estudios indican que los niveles de expresión de Bcl-2 tienen diversos propósitos y que su control es primordial en el ciclo celular de los hepatocitos y así reestablecer la homeostasis del hígado. Un estudio previo en ratones describe el perfil de expresión de los distintos miembros de la familia Bcl-2, indicando que hay detección de ellas en la inmunohistoquímica, pero la expresión génica de Bcl-2 es baja o casi imperceptible después de una hepatectomía parcial en un rango de 7

días, por otro lado los miembros pro-apoptóticos como Bax y Bad se encuentran expresados en mayor magnitud (77) durante las primeras 24 horas post hepatectomía. En cuanto a los miembros antiapoptóticos como Bcl-x e incluso Bcl-2 presentan una respuesta rezagada hasta tener una expresión definida después del intervalo de 24 a 72 hrs post hepatectomía. Quiere decir que durante la primera fase de la regeneración hay actividad apoptótica en curso, mientras que el resto de la población celular se protege frente al daño. Además los hepatocitos tienen características de células progenitoras, por medio de las cuales se ha demostrado la participación de Bcl-2 como una proteína que prolonga la fase de crecimiento del ciclo celular (G0 y G1) transformándolos en hepatocitos quiescentes (78) al haber sobreexpresión de Bcl-2 en el tejido, retrasando el progreso del ciclo en la entrada de la fase S, es decir la replicación de DNA. Un estudio correlacionó la cinética de la replicación de DNA con la expresión de Bcl-2 *in vivo* e *in vitro* demostrando que el pico de DNA alcanzaba un nivel máximo hasta las 32 horas post hepatectomía y permaneciendo elevado hasta las 44 horas post hepatectomía.

Durante la segunda fase o fase de terminación Bcl-2 comienza a elevar su intensidad tanto en el grupo sano en regeneración como el grupo fibrótico en regeneración a medida que va disminuyendo el área de expresión a lo largo de la fase de terminación, en el día 3 post hepatectomía la intensidad de Bcl-2 intersecta con la intensidad en condiciones normales, a partir de aquí el hígado va equilibrando la tasa de morbilidad hepatocitaria y la proliferativa. En conjunto los efectos a partir del día 3 son inducidos por la hepatectomía al tener el grupo fibrótico en regeneración una $p \leq 0.05$ frente al grupo fibrótico y los sanos en área e intensidad (Gráficas 9.4.1 y 9.4.2). Durante el día 7 post hepatectomía en el parénquima (Gráfica 9.1.2) la intensidad alcanza un punto máximo presente en un 16% de área (menor a la fase primaria) teniendo una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) gracias a la hepatectomía frente a los demás grupos y finalizando en el día 30 post hepatectomía con una elevación de la intensidad debido a las bandas fibróticas restantes pues esta intensidad solo difiere con el nivel de los grupos sanos. Alrededor de las venas portales después del tercer día post-hepatectomía el área cubierta por Bcl-2 se reduce a un 15% presentando una elevación de intensidad significativa ($p \leq 0.05$) frente a los grupos sanos y el grupo fibrótico (Gráfica 9.2.2) implicando un efecto por parte de la fibrosis y la hepatectomía. La segunda fase en la vena central (Gráfica 9.3.2) se ve afectada por la fibrosis y la hepatectomía en el día 7 pues la diferencia que presenta el grupo fibrótico en regeneración frente al sano en regeneración es significativa en este punto, y posteriormente los grupos hepatectomizados presentan intensidades iguales al grupo de hígados normales al finalizar los 30 días post hepatectomía.

Los hepatocitos del parénquima hepático y de la vena central son los que muestran mayor porcentaje de área con una intensidad baja en la primera fase, señalando que estos hepatocitos no son los primeros en entrar a los mecanismos de regeneración, pero si comprenden una fracción de la población que entra en la apoptosis, mientras que otra fracción de hepatocitos de las zonas perivasculares como las venas portales entran en un estado de arresto debido a que su intensidad es mayor en comparación con el parénquima y la vena central. En efecto el parénquima del hígado fibrótico en regeneración presenta hepatocitos apoptóticos y binucleados (micrografías 9.1M y 9.1N) que no se hallaban en el parénquima del hígado sano (micrografías 9.1A y 9.1B). Tanto el daño

crónico y el estímulo agudo de la hepatectomía modifican la morfología del tejido y las condiciones de los hepatocitos y es que en el hígado fibrótico (micrografías 9.1I y 9.1J) como en el sano en regeneración (micrografías 9.1E y 9.1F) se detectan los hepatocitos antes mencionados. En la segunda fase la vena porta y el parénquima suman un 31% de área con una intensidad elevada en el día 7 post-hepatectomía mientras que en la vena central el 16% presenta una intensidad menor en comparación. Morfológicamente en el hígado fibrótico en regeneración se halla un parénquima con septos fibróticos delgados con presencia de hepatocitos en proliferación, hepatocitos binucleados y una cantidad limitada de hepatocitos apoptóticos (micrografías 9.1 O y 9.1 P), y en este mismo grupo se observan septos remanentes en vena porta (micrografías 9.2 O y 9.2 P) y en vena central (9.3 O y 9.3 P), lugares donde se hallan en mayoría hepatocitos binucleados al final del proceso. Por lo tanto los mecanismos de supervivencia y el control de la regeneración se activan primero en el parénquima y en las zonas portales durante la fase de terminación.

10.2 Distribución e Intensidad del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

Durante la primera fase de la regeneración el estímulo derivado de la hepatectomía en el hígado fibrótico abarca un 33% de área de tejido detectado por la presencia de PCNA, cuya proporción se mantiene constante sin diferencia significativa entre el Día 1 y el día 3 post hepatectomía (Gráfica 9.8.1), pero esta misma fracción de área incrementa su intensidad alcanzando un pico máximo de intensidad de 2.28×10^5 en el día 3 post-hepatectomía, por lo que el tiempo tiene un efecto significativo junto con la hepatectomía realizada a nivel de expresión (9.8.2). El efecto proliferativo presente en el parénquima del hígado fibrótico en regeneración (Gráficas 9.5.1 y 9.5.2) tiene una diferencia significativa de porcentaje de área frente a los grupos de hígados sanos y al grupo del hígado fibrótico, esto abarca un 10% de área en fase S (micrografía 9.5M), y en el día 3 post hepatectomía, el área alcanza hasta un 13% con una intensidad que se mantuvo constante (7.1×10^5) a lo largo de los primeros tres días post-hepatectomía ya que no hay mayor efecto significativo entre el día 1 y 3 post hepatectomía ($p \geq 0.05$), por lo que se presentan igualmente hepatocitos en fase S (Micrografía 9.5N). La vena porta no presenta diferencias de área (11%) entre los grupos hepatectomizados por lo que el tejido responde primordialmente a la hepatectomía (Gráfica 9.6.1), sin embargo la comparación de intensidades entre grupos fibróticos no es significativa ya que el grupo sano en regeneración es el único que presenta una $p \leq 0.05$ frente a los demás grupos, por lo que el grupo fibrótico en regeneración presenta hepatocitos en fase G1 (micrografía 9.6 M), sin embargo el efecto de la hepatectomía en el hígado fibrótico en regeneración se hace presente hasta el día 3 post hepatectomía donde su $p \leq 0.05$ frente a los grupos sanos y fibróticos, por otro lado su elevación (7.97×10^4) es significativa a pesar de que no alcanza el límite de intensidad que representa el sano en regeneración (Gráfica 9.6.2), además este nivel de intensidad es representado en un 12% de área del tejido, el aspecto morfológico representado en la micrografía 9.6N indica que hay hepatocitos en fase G1 y en S. Finalmente en la vena central el porcentaje de área es de 9.9% y es menor comparado con el área de tejido en el parénquima y la vena porta, este porcentaje no cambia con el tiempo durante la primera fase (Gráfica 9.7.1), pero la intensidad de PCNA si se eleva significativamente hasta el día 3 post-

hepatectomía (Gráfica 9.7.2), punto en el cuál se observan hepatocitos en fase G1 en su mayoría hepatocitos en fase S y G2 (micrografía 9.7N).

La vena porta es la que alcanza una segunda ronda de la fase S dentro de la primera fase de la regeneración, y por lo tanto reduce la duración de su ciclo celular. El parénquima del hígado sano en regeneración cumple la proliferación durante el primer día post-hepatectomía, y en el caso del parénquima del hígado fibrótico en regeneración la intensidad es continua hasta culminar los 3 días para entrar en la segunda fase del proceso regenerativo. A diferencia de las estructuras anteriores, la vena central presenta distribuciones de área elevadas sin diferencia significativa entre el hígado sano en regeneración y el hígado fibrótico en regeneración durante la primera fase, posteriormente el aumento adicional que provee la hepatectomía es reflejado hasta después de los 3 días post-hepatectomía por lo que la vena central presenta rondas posteriores de proliferación después de los 3 días post hepatectomía siendo la última estructura en completar los ciclos celulares, es decir, la hepatectomía parcial aumenta la onda de proliferación a través del lobulillo (79).

La segunda fase de la regeneración involucra la terminación de la respuesta proliferativa, de manera que el 32% del tejido total no cambia su intensidad (1.4×10^5) desde el día 7 hasta el día 30 post-hepatectomía debido al efecto de la fibrosis remanente en las zonas perivasculares, zonas donde el área y al intensidad se estabilizan debido a que no hay diferencia significativa entre el grupo fibrótico y el grupo fibrótico en regeneración en el tiempo límite del estudio. La contribución del parénquima abarca un 9% de área siendo la intensidad similar (2.22×10^4) a los niveles normales hasta el día 7 post-hepatectomía. El efecto significativo que prevalece desde el día 7 post-hepatectomía hasta los 30 días post-hepatectomía es el de la fibrosis puesto que no hay diferencia significativa entre los grupos fibróticos en su intensidad y área. De acuerdo a las micrografías 9.5 O y 9.5 P se observa la presencia de hepatocitos en fase G1 y algunos en fase S, y es hasta el día 30 post-hepatectomía donde pueden verse a su vez hepatocitos en fase G0, es decir con un marcaje tenue y sin definir, lo cual no se haya en el hígado sano en regeneración donde los núcleos a pesar de tener de marcaje débil, éstos se contrastan con el resto de las células (micrografía 9.5G y 9.5H). La contribución de la vena porta durante la segunda fase es de 11% de área en el grupo fibrótico en regeneración, y esta proporción se mantiene constante desde los 7 días hasta los 30 días post-hepatectomía ya que no hay diferencia significativa entre este intervalo de tiempo, de esta manera el efecto significativo se da por la fibrosis. En cuanto a la intensidad de PCNA (5.85×10^4) hay una disminución desde los 7 días post-hepatectomía pero permaneciendo elevada en comparación con el grupo de hígados sanos. No se observan efectos significativos entre los grupos hepatectomizados pero si lo hay frente el grupo sano y el fibrótico sin hepatectomía por lo que el efecto de la hepatectomía continúa hasta el día 30 en la vena porta. Los hepatocitos que se presentan en la vena porta son hepatocitos en sus fases de crecimiento y control, es decir en la fase G1 y G2, por lo que son susceptibles a un arresto y disminución de la proliferación excesiva (micrografías 9.6 O y 9.6 P) a partir de este intervalo de tiempo. Finalmente la proporción de área que responde en la segunda fase en la vena central es de 10% y el efecto interviene en la distribución de PCNA y la intensidad son tanto la fibrosis como la hepatectomía,

esto es debido a que el grupo fibrótico en regeneración es diferente significativamente frente al grupo fibrótico y los grupos sanos hasta el día 30 post-hepatectomía, el área y la intensidad se mantienen elevadas sin cambios en el intervalo de tiempo entre el día 7 y 30 post-hepatectomía, la elevación de área se detecta hasta el día 7 post-hepatectomía lo cual indica una respuesta tardía en la vena central. Una diferencia morfológica que presenta la vena central frente al parénquima y la vena porta es que el hígado fibrótico en regeneración presenta en su mayoría hepatocitos en fase G1 y fase S en el periodo de terminación (9.7 O y 9.7 P) pues su marcaje es fuerte y definen perfectamente su núcleo, distinguiendo la respuesta de este grupo frente a los dos grupos sanos que contienen hepatocitos en fase G0 al final de las observaciones (micrografías 9.7D y 9.7H). Además el marcaje de PCNA de los hepatocitos en el hígado fibrótico en regeneración durante el proceso de terminación es semejante al del hígado fibrótico (micrografías 9.7L y 9.7P) por lo cual el efecto de la fibrosis y la hepatectomía generan una respuesta rezagada debido a que la localización de la vena central es distante a la vena porta y el parénquima.

La regeneración por la combinación del estado fibrótico y la hepatectomía obliga al tejido fibrótico en regeneración proseguir con el crecimiento de la masa hepática manteniendo un promedio del 32% del tejido activo. Datos de modelos animales indican que el tejido hepático puede incluso extender el tamaño de los lóbulos debido a que puede haber un exceso en el número de hepatocitos producidos con respecto a la cantidad original, por lo que el hígado debe activar mecanismos de apoptosis al término de la segunda fase(80). En este caso se ha investigado la participación de factores de crecimiento como el TGF β y otros factores profibróticos que emplean una deposición de matriz extracelular para inhibir la proliferación(81) por otro lado se inducen cambios intracelulares como la cantidad de hepatocitos binucleados cuya capacidad proliferativa es reducida.

10. 3 Distribución e Intensidad del marcador de estrés oxidante: P22

El mecanismo de regeneración en un órgano como el hígado es un proceso que requiere demasiada energía para poder reestablecer la homeostasis y también para controlar las poblaciones celulares que se replican. Durante la primera fase el estrés oxidante marcado por la señal de P22 revela que la hepatectomía parcial induce el estrés oxidante, de la misma forma que hace el daño crónico al desarrollar las bandas de fibrosis, pero la hepatectomía parcial redirige el estrés oxidante hacia la regeneración.

Durante la primera fase de la regeneración el marcaje de estrés oxidante representa un área de cubierta por p22 del 5% que responde al efecto de la fibrosis ya que no hay una diferencia significativa entre los grupos fibróticos ($p \geq 0.05$) en el día 1 post-hepatectomía, no es hasta el día 3 post-hepatectomía donde la fibrosis reduce su área progresivamente en el grupo fibrótico mientras que el grupo fibrótico en regeneración mantiene una elevada proporción de área debido a la hepatectomía, por otro lado la intensidad (1.67×10^5) de P22 difiere entre los grupos fibróticos debido a los efectos de la hepatectomía y la fibrosis en el día 1 post-hepatectomía al presentar el grupo de hígados fibróticos en regeneración diferencias significativas frente a los grupos sanos y al grupo fibrótico. Posteriormente conforme se reduce el área a partir del día 3 post-hepatectomía,

inclusive la intensidad tiende a disminuir progresivamente hasta el término de la primera fase o fase primaria (Gráficas 9.12.1 y 9.12.2). El parénquima hepático contribuye con un área de tejido del 2% cubierta por la señal de P22 donde la elevación de área y su intensidad (6.08×10^4) es gracias a los efectos de la fibrosis y la hepatectomía en el hígado fibrótico en regeneración durante el día 1 post-hepatectomía puesto que tiene una $p \leq 0.05$ que marca la diferencia significativa frente al hígado fibrótico y al grupo sano. En efecto P22 abarca una respuesta dispersa entre los sinusoides en el hígado sano en regeneración (micrografía 9.9E) y al haber septos fibróticos extensos en el hígado fibrótico en regeneración (micrografía 9.9M) hay una mayor concentración de la respuesta junto a las bandas de fibrosis y en los sinusoides vecinos, esto es debido a las infiltraciones de macrófagos y la expresión de estrés oxidante de células endoteliales residentes en las paredes de los sinusoides respectivamente. El efecto de la fibrosis y la hepatectomía continúa hasta el día 3 post hepatectomía donde disminuye el área (1.51%) y la intensidad de todos los grupos manteniendo al hígado fibrótico en regeneración por arriba de las condiciones normales (Gráficas 9.9.1 y 9.9.2). La vena porta contribuye con un área de 1.84% de P22 en el hígado fibrótico en regeneración, y dado que no es diferente significativamente en comparación con el grupo fibrótico, la respuesta es detectada gracias a los efectos de la fibrosis frente a los grupos sanos durante el día 1 post-hepatectomía, y se concentra en ambos grupos de hígados alrededor de los bordes de la vena porta (9.10I y 9.10M), a diferencia del área tanto la fibrosis como la hepatectomía influyen en la intensidad (5.12×10^4) presente en los sinusoides pues en este caso si hay diferencias reportadas entre grupos sanos y entre grupos fibróticos. En el día 3 post-hepatectomía los efectos de la fibrosis y la hepatectomía actúan por igual en la prevalencia del estrés oxidante sobre el grupo fibrótico en regeneración (Gráficas 9.10.1 y 9.10.2). La vena central contribuye a un 1.32% de área cubierta por el marcaje de P22 concentrado en los bordes y en los sinusoides periféricos de la vena central del hígado fibrótico en regeneración (micrografías 9.11M y 9.11N). En la primera fase es la estructura con menor área de respuesta frente a la vena porta y el parénquima del hígado fibrótico en regeneración, sin embargo la intensidad es similar a la de la vena porta, por lo que el parénquima se ve más afectado en la elevación del estrés oxidante. Los cambios en el área marcada por P22 en la periferia de la vena central no presenta diferencias significativas entre los grupos fibróticos por lo que el efecto que mantiene elevado al grupo fibrótico en regeneración es la fibrosis durante el día 1 post-hepatectomía, pero tanto la hepatectomía y la fibrosis son efectos que influyen en la intensidad frente a los grupos sanos y entre los grupos fibróticos, puesto que en estos últimos hay diferencias significativas durante el día 1 post-hepatectomía. Nuevamente la contribución de ambos efectos se ve reflejada en el área y la intensidad por igual en el día 3 post-hepatectomía (Gráficas 9.11.1 y 9.11.2)

La observación de la primera fase de la regeneración indica que el parénquima y la vena porta son las principales zonas en las que actúa el estrés oxidante ya que el porcentaje de área son más elevados que los encontrados en la vena central, e indica que la intensidad de P22 presenta una elevación mayor del nivel de expresión del estrés oxidante en el parénquima hepático frente a las zonas perivasculares, por lo que las modificaciones estructurales proporcionados por la hepatectomía son efectivas durante el remodelamiento de la fibrosis hepática. Dado que el efecto

de la hepatectomía se prolonga hasta el día 3 post-hepatectomía probablemente influya en los mecanismos que estimulan la proliferación de los hepatocitos durante este intervalo de tiempo.

Las zonas perivasculares sufren cambios estructurales y por lo tanto cambian los patrones del flujo sanguíneo después de que se realiza la hepatectomía parcial. Una de los cambios anatómicos que provee la hepatectomía es la contribución de la sangre oxigenada al tejido, la contribución venosa se triplica por parte de la vena porta (82), y por lo tanto genera un cambio en la tensión de oxígeno entre la vena porta, el parénquima y la vena central, el cambio a un ambiente hiperoxigénico a menudo conlleva a la generación de radicales libres que provocan daño (83), por otro lado se sabe que las células progenitoras de las células endoteliales de los sinusoides responden ante agresiones como el estrés oxidante y para mantener la homeostasis secretan mitógenos como el HGF (84), el cual ayuda a la proliferación de los hepatocitos.

Durante la segunda fase de la regeneración el estrés oxidante abarca un área total de 2.12% de forma generalizada en el hígado fibrótico en regeneración y al final de la fase de terminación se presume una intensidad idéntica a la del hígado fibrótico (1.5×10^4) pues entre ellos no presentan diferencias significativas, esto implica que el último efecto que estimula el estrés oxidante es la fibrosis remanente distribuida en las diferentes zonas del lobulillo. En el parénquima hepático a partir del día 7 post-hepatectomía la marca de P22 se ha diluido o disperso (micrografía 9.9 O) y el área sinusoidal de respuesta del hígado fibrótico en regeneración se ha reducido significativamente hasta un 0.77% a la vez que su intensidad se redujo a 1.75×10^4 , la disminución prosigue hasta el día 30 post-hepatectomía donde el área del hígado fibrótico en regeneración prevalece frente a los grupos sanos y el grupo fibrótico conteniendo una intensidad y una mayor dispersión de su marca (micrografía 9.9P) similares a la del hígado fibrótico (1.03×10^4), esto quiere decir que el efecto de la hepatectomía ha cesado y el efecto de la fibrosis influye en una fracción reducida de área al final del proceso de regeneración. El área de la vena porta del hígado fibrótico en regeneración es de 0.84% a partir del día 7 post-hepatectomía, y se mantiene sin una reducción significativa hasta el día 30 post-hepatectomía concentrándose en las bandas que rodean a la vena porta (micrografías 9.10O y 9.10P) así como se concentra en el hígado fibrótico (micrografías 9.10K y 9.10L), conteniendo una intensidad de 1.76×10^4 que continua disminuyendo progresivamente hasta no presentar diferencias con la intensidad del hígado fibrótico (8.64×10^3). Viendo la tendencia de área e intensidad se puede decir que el último efecto que influye en esta fracción de área es el de la fibrosis ubicada en la periferia de la vena porta. Por otro lado el marcaje de p22 de la vena central del hígado fibrótico en regeneración presenta un área sinusoidal de 1.2% detectada principalmente en los bordes de la vena (micrografía 9.11O y 9.11P) a partir del día 7 post-hepatectomía, a pesar de la disminución progresiva que presenta el hígado fibrótico en regeneración hasta los 30 días post-hepatectomía, su área permanece arriba en comparación de los grupos sanos y el grupo fibrótico junto con una concentración de la marca de P22 (micrografías 9.11K y 9.11L) e intensidad final idénticas a la del grupo fibrótico (7.02×10^3). Nuevamente el último efecto que influye en el estrés oxidante en un hígado fibrótico en regeneración es la fibrosis remanente en la periferia de la vena central.

La segunda fase del proceso regenerativo también denominada como fase de terminación presenta modificaciones del estrés oxidante conforme la hepatectomía estimula la remodelación de la fibrosis hepática, a partir del día 7 post-hepatectomía los efectos de la resección quirúrgica cesan y permanecen los efectos de las fibrosis remanentes debido a que las intensidades son similares al grupo fibrótico de cada segmento correspondiente, en particular las zonas perivasculares son las que presentan estas intensidades en un área más amplia en comparación al parénquima.

El estrés oxidante promueve un control sobre el exceso de células que pueden proliferar, y es que este mecanismo tiene 3 formas de ayudar a controlar la proliferación, la primera es que al estar expuesto a una acumulación de radicales, estos pueden tener efectos intracelulares que frenen la capacidad de proliferar de los hepatocitos, se sabe que el estrés oxidante puede inducir la poliploidia de los hepatocitos después de haber acelerado su ciclo celular, una característica de este efecto es la aparición de hepatocitos binucleados, esto es a menudo una señal de senescencia, por lo que limita la capacidad proliferativa de los hepatocitos en la terminación de la proliferación (85). Por otro lado al observar los cambios en la remodelación de la fibrosis, en el parénquima del tejido fibrótico en regeneración (Figura 9.9M) comienza teniendo bandas muy gruesas, pasando los primeros 3 días van progresivamente, mientras que en el caso de la vena porta aún se ve con algunas fibras de colágeno a su alrededor (Figura 9.10P), es evidente que los mecanismos de fibrosis involucran la secreción de TGF- β , el cual interviene en la generación de estrés oxidante ya que activa a la NADPH oxidasas, y por medio del estrés oxidante se promueve la senescencia de las células y la apoptosis, por otro lado el TGF- β también actúa en la activación de receptores del factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés EGFR) lo cual puede proveer la supervivencia de los hepatocitos (86).

Comprobación de la hipótesis

El efecto de la hepatectomía sobre el hígado fibrótico estimula la señal de los marcadores de proliferación y de estrés oxidante (PCNA y P22) durante la primera fase de la regeneración y se amplifican en el tejido hasta el día 3 post hepatectomía, a partir de ahí se modera en el día 7 post hepatectomía en el parénquima y vena porta persistiendo en las zonas de venas centrales (debido a la respuesta tardía). En el caso del marcador antiapoptótico (Bcl-2) el aumento de su nivel de expresión (intensidad) inicia después del día 3 post-hepatectomía en una fracción de área menor a la inicial durante la fase de terminación, por lo que el efecto de Bcl-2 no depende de la hepatectomía directamente sino de los mecanismos que intervienen en la remodelación de matriz extracelular que sufre el tejido fibrótico.

XI. CONCLUSIÓN

La hepatectomía parcial es un estímulo agudo que remodela la matriz extracelular e induce los mecanismos de regeneración, lo cual involucra procesos de control de apoptosis y de la proliferación para que el hígado establezca la homeostasis. Se observó que la regeneración comprende 2 fases en los cuales tanto la apoptosis y la proliferación entran en conjunto. Durante la primera fase de la regeneración los mecanismos que favorecen la proliferación de los hepatocitos interviene una expresión discreta de Bcl-2 en la mayoría de los hepatocitos por lo que la apoptosis apoya controlando el incremento de la población que está proliferando ya que la expresión de PCNA se encuentra aumentada. Posteriormente la segunda fase de la regeneración se observa una disminución de la expresión de PCNA después de los 3 días post hepatectomía en el hígado fibrótico en regeneración, a su vez Bcl-2 aumenta su expresión. En este caso Bcl-2 además de actuar como un agente protector y antioxidante también ayuda al retraso del ciclo celular para proseguir con la fase de terminación y evitar la proliferación excesiva. Los mecanismos de apoptosis y proliferación probablemente son estimulados por un mecanismo versátil como el estrés oxidante promovido (detectado por el marcador de P22) por la hepatectomía parcial, ya que permanece elevado durante la primera fase de regeneración estimulando tanto la apoptosis como la proliferación compensatoria presente durante los primeros 3 días post hepatectomía. Posteriormente sus niveles descienden hasta alcanzar los niveles normales durante la segunda fase o fase de terminación. De acuerdo a los cambios, un probable mecanismo es que el estrés oxidante arreste a los hepatocitos para permanecer en un estado de senescencia o reducir su capacidad proliferativa produciendo hepatocitos binucleados, así como también liberar factores de crecimiento provenientes de los procesos fibróticos para controlar la proliferación y la apoptosis.

El hígado establece una coordinación espacial para la regeneración, dado a que su estructura principal tiene direcciones definidas en el lobulillo, la regeneración comienza desde la vena porta y su actividad termina en la vena central similar a una onda que se expande hasta su límite. Las actividades de la regeneración muestran un orden, ya que después de las primeras 24 horas el tejido ha terminado su primera fase de regeneración. La localización donde se presentan los cambios del marcador p22 phox hace suponer que el estrés oxidante es un factor intermediario a nivel estructural de respuesta zonalizada y de efectos intracelulares.

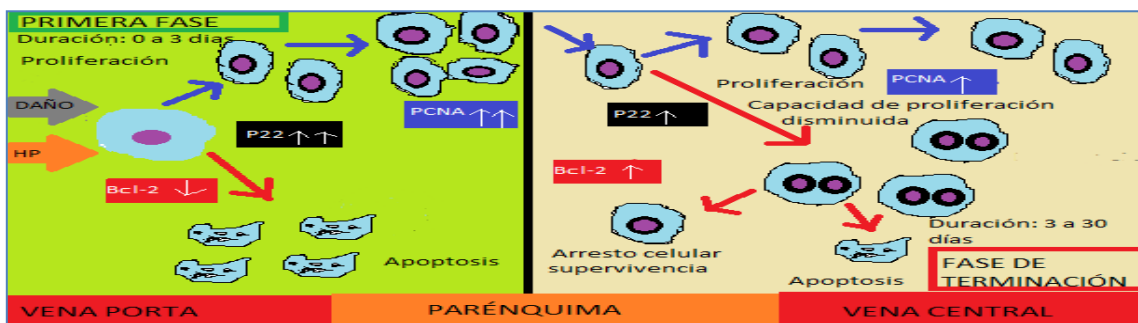


Figura 11.1 Integración de proliferación, apoptosis y estrés oxidante de los hepatocitos en dos fases generales en el hígado fibrótico en regeneración

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Bismuth H. Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. *World J. Surg.* 6: 6, 1982
- 2) Möller Bredo, Richard & Vazquez Odo, Noelia. Anatomy of the liver in Wistar Rat (*Rattus norvegicus*). *Int. J. Morphol.*, 29(1):76-79, 2011.
- 3) José Hib. *Histología de Di Fiore*. Editorial El Ateneo, 200. Pág. 238-243
- 4) Eddie Wisse, Diamzhong Luo. On the function of pit cells: The liver specific natural killer cells. *Semin Liver Dis* 1997; 17(4): 465-286
- 5) De leeuw A.M, Brower A, Knook D.L. Sinusoidal endothelial cells of the liver. Fine structure and function in relation to age. *Electron microscopy technology*. 1990. Mar, 14 (3):218-36
- 6) Phillips M, Powell S, Patherson J. *An Atlas and text of ultrastructural pathology*. Liver 1987: 1-32
- 7) Fox ES. Thomas P-Broitman. Comparative studies of endotoxin uptake by isolated rat kupffer and peritoneal cells. *Infect Immun* 5: 2962-6, 1987
- 8) Geoffrey M. Cooper. *La célula*. 3ª edición. Editorial Marbán, 2007 523
- 9) Arief A. Suriawinata. *Liver pathology, an atlas and concise guide*. Editorial Demos Medical, N.Y. 2010 6
- 10) Iñaki Día Sanz. Efecto de la resección hepática sobre el comportamiento de las células tumorales residuales y utilidad del ATRA para controlar dicho efecto en un modelo experimental. Departamento de cirugía y radiología. Facultad de Medicina. Universidad del país vasco. Mayo 2011.
- 11) Bucher NLR, Swaffield MN. The rate of incorporation of labeled thymidine into deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised. *Cancer*. 1964; 24:1611-1625
- 12) James J, Frederick. Detection of metabolic changes in hepatocytes by quantitative cytochemistry. *Histochemistry* 186; 84:308-316.
- 13) Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver. *Cancer* 1962; 22:842-849
- 14) Bucher NRL. *Regeneration of liver and kidney*. Boston: Little, Brown and company, 1971
- 15) Weinbren K. Regeneration of the liver. *Gastroenterology*. 1959; 37:657-668
- 16) Friedman JM, Chang EY, Darnell JE Jr. Gene expression during liver regeneration. *J.Mol.Biol* 171 (1):37-53, 1984
- 17) Khon D, Hickman R, Terblanche J. Von Sommgoy ST. Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs- The response to different resection sizes. *J. Surg* .45: 176-180, 1988
- 18) Tien-Yu Lin, M.D., Chue-Shue Lee, M.D. Regeneration of human liver after hepatic lobectomy studied by repeated liver scanning and repeated needle biopsy. *Ann surg*. 1979 Jul; 190(1):48-53.
- 19) Palestin-Dominguez Mayrel, Gómez- Quiroz Luis Enrique. El factor de crecimiento de hepatocitos y su receptor c-met en la protección ante el daño hepático inducido por el alcohol. *REB* 31 (4):118-126, 2012
- 20) Antolja N., Topic E., Hepatocyte growth factor levels in healthy and alcoholic liver cirrhosis patients. *Coll Antropol* 25: 341-348.

- 21) Nagy, L.E. Recent insights into the role of the immune system and alcoholic liver disease. *Exp. Biol. Med.* 2003, 228. 882-890
- 22) Bode C. & Bode T.C. Activation of the immune system and alcoholic liver disease: Effects of ethanol per se or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol? *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2005. 29. 1665-1715.
- 23) Fiers W. Tumor Necrosis Factor (TNF): Characterization of the molecular, cellular and in vivo levels. *FEBS Lett.* 1991, 285, 192-212.
- 24) Lieber C.S. Cytochrome P-450 2E1: It's physiological and pathological role. *Physiol. Rev.* 77: 517-544 1997
- 25) Wa X, Amos Cl. Zhu Y. Zhao H, Grossman BH, Shay JW. Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *J. Natl Cancer Inst.* 95: 1211-1218, 2003
- 26) Flemington EK. Herpes virus lytic replication and the cell cycle: arresting new developments. *J. virol.* 75 :4475-4481., 2001
- 27) Kwung HJ, Jung EY. P53-Dependent transcriptional repression of p21 (waf1) by hepatitis C virus N53. *J. Gen Virol.* 298:53-62, 2001
- 28) Park JS, Yang JM, Min MK. Hepatitis C virus non-structural protein N54B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene. *Biochem. Biophys. Res.* 267: 581-587, 2000
- 29) Ghosh AK, Steele R. Meyer K. Ray R. Ray R.B. Hepatitis C virus N55A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999; 80:1179-1183
- 30) Arima N. Kao CY, Lich T, Padmanabhan R, Sasaguri Y. Padmanabhan R. Modulation of cell growth by the hepatitis C virus.
- 31) Aileen Marshall, Simon Rushbrook. Relation between hepatocyte G1 arrest: Impaired hepatic regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2005; 128:33-42.
- 32) R. Ramachandran, S. Kakar. Histological patterns in drug-induced liver disease. *J Clin Pathol.* 62: 481-492, 2009
- 33) Muriel Pablo. NF- κ B in liver diseases: a target for drug therapy. *Journal of applied toxicology* 1393, 2008
- 34) Fortún Jesús, Martín-Dávila Pilar. Prophylaxis with caspofungin for invasive fungal infections in high-risk liver transplant recipients. *Transplantation* 87: 424-435, 2009
- 35) Scheen André. Thiazolidinediones and liver toxicity. *Diabète & Métabolisme* 27: 305-313, 2001
- 36) EM Migoya, SH Stevens. Effect of moderate hepatic insufficiency on the pharmacokinetics of sitagliptin. *Can J Clin Pharmacol* Vol 16: 165-169, 2009
- 37) E.M. Fernández-Marcote Menor, Pérez-Bedmar Delgado. Hepatitis aguda tóxico-medicamentosa inducida por metildopa. *Rev. Esp. Enferm.* 97: 1130-0108, 2005
- 38) Assy N. Hussein O, Khalil A. The beneficial effect of aspirin and enoxaparin on fibrosis progression and regenerative activity in a rat model of cirrhosis. *Dig. Dis. Sci* 52:1187-1193, 2007

- 39) Chanda S, Mangipudy RS, Warbriton A, Bucci TJ. Stimulated hepatic tissue repair underlies heteroprotection by thioacetamide against acetaminophen-induced lethality. *Hepatology* 21:477-586,1995
- 40) Harper & Row. *Histologic and histochemical staining methods*. Ed. Atica 1968
- 41) Rojkind M.Greenwel P. Animal models of liver fibrosis. *Adv Vet Sci Comp Me* 37:333-335, 1993.
- 42) Suarez-Cuenca, Juan A. Partial hepatectomy- induced regeneration accelerates reversion of liver fibrosis involving participation of hepatic stellate cells. *Exp. Med Biol.* 2007.
- 43) Parola Maurizio, Robino Gaia. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *Journal of hepatology* 35(2001) 297-306.
- 44) Jörg Plümpe, Nisar P. Malek. NF-Kb determines apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration. *Gastrointestinal and liver physiology.* 2000J Jan; 278(1): G173-83
- 45) Kamata H., Honde S.Maede. Reactive oxygen species promote TNF- α Induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120: 649-661 (2005)
- 46) H, Nakano. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kB and JNK. *Cell death and differentiation* (2006) 13, 730-737.
- 47) Adams, J.M. y Cory, S., *TIBS*, 26:61-66, 2001
- 48) Frédéric Charlotte, Aurore L'Herminé. Immunohistochemical detection of Bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *American journal of pathology*, Vol.144(3), 1994
- 49) Reed, J.,J. *Cell Biol.*, 124(1,2): 1-6, 1994
- 50) Shie-Pan Tzung. Expression of Bcl-2 family during liver regeneration and identification of Bcl-x as a delayed early response gene. *American Journal of pathology* Vol. 150(6) 1997
- 51) Foley-Julie, Ton-Thai. Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes rats. *Environmental health perspectives* Vol. 10, 1993 (199-206)
- 52) Maga-Giovanni, Hübscher-Ulrich. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of cell science* 116, 2003
- 53) Waga S.Bauer. Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J.Biol.Chem* 269, 1994
- 54) Koun Drioukoff-S., Hansen-S. A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen and Cdk2 targets PCNA- interacting proteins for phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2001. 275, 22882-22887
- 55) Waga-S., Hamong-G. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* (1994) 369, 594-578
- 56) Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxyxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271:C1424-C1437, 1996
- 57) Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Amm Rev Biochem* 58:79-110, 1989
- 58) Reth M. hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol* 3: 1129-1134, 2002
- 59) Paik YH, Leaisako K, Seki E, Inokuchi S, Schnabl B. The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) homologues NOX1 and NOX2/gp91 (phox) mediate hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 53: 1730-1741, 2011

- 60) Teufelhoer Olga, Parzefell Wolfram. Superoxide generation from Kupffer cells contributes to hepatocarcinogenesis: Studies on NADH oxidase knockout mice. *Carcinogenesis* 26 (2): 319-329, 2005
- 61) Paronetto F, Popper C. Chronic liver injury induced by immunologic reactions. Cirrhosis following immunization with heterologous sera. *Am J Pathol* 49; 1087-1101, 1966
- 62) Mabuchi A, Mullaney I. Role of hepatic stellate cell/hepatocyte interaction and activation of hepatic stellate cells in the early phase of liver regeneration in the rat. *J Hepathol* 40:910-916, 2004
- 63) Hernandez-Muñoz R, Diaz-Muñoz M, Suárez- Cuenca JA. Adenosine reverses pre-established CCl₄- induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* 34:677-687, 2001
- 64) Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Chagoya de Sanchez V. Possible role of cell redox state on collagen metabolism in carbon tetrachloride- induced cirrhosis as evidenced by adenosine administration to rats. *Biochim Biophys Acta* 1200:93-99, 1994
- 65) Hernández-Muñoz R, Sánchez –Sevilla L. Changes in mitochondrial adenine nucleotides and in permeability transition in two models of rat liver regeneration. *Hepatology* 37: 842-851, 2003
- 66) Morimoto T, Isselhard W. Absence of mitochondrial enhancement in the remnant liver after partial hepatectomy in cirrhotic rat rats. *Res Exp Med (Berl)* 192:89-97, 1992
- 67) Chijiwa K, Nakano K, Kameoka N, Nagai E. Tanaka M. Proliferating cell nuclear antigen, plasma fibronectin, and liver regeneration rate after seventy percent hepatectomy in normal and cirrhotic rats. *Surgery* 116: 544-549, 1994
- 68) Laemli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 2005
- 69) Rockey DC. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis* 10:459-479, 2006
- 70) Mabuchi A, Mullaney I. Role of hepatic stellate cell/hepatocyte interaction and activation of hepatic stellate cells in the early phase of liver regeneration in the rat. *J Hepathol* 40:910-916, 2004
- 71) Aguilar-Delfin I, Lopez Barrera F, Hernandez-Muñoz R. Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CCl₄ administration. *Hepatology* 24:657-662, 1996.
- 72) Trejo-Solis C, Chagoya de Sanchez V, Aranda- Fraustro A. Inhibitory effect of vitamin e administration on the progression of liver regeneration induced y partial hepatectomy in rats. *Lab Invest* 83: 1669-1679, 2003.
- 73) Vollmar B, Siegmund S, Richter S, Menger MD. Microvascular consequences of Kupffer cell modulation in rat liver fibrogenesis. *J Pathol* 189:85-91, 1999
- 74) Fausto, N. (2000) *J. Hepatol.* 32, 19–31.
- 75) Michalopoulos, G. K. & DeFrances, M. C. (1997) *Science* 276, 60–66.
- 76) Michalopoulos, G.K. Liver regeneration after partial hepatectomy : critical analysis of mechanistic dilemmas. *American journal of pathology.* Vol. 176, No. 1 (2010)

- 77) Shie-Pon, Tzung. Expression of Bcl-2 family during liver regeneration and identification of Bcl-x as a delayed response gene. *AJP* (1997), Vol. 150; No. 6
- 78) E. Vail, Mary. Bcl-2 expression delays Hepatocyte cell cycle progression during liver regeneration. *Oncogene* (2002) 21, 1548-1555
- 79) Rabes HM. Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver. *Ciba Foun Simp* (1997) pag 31-53.
- 80) Sakamoto T, Liu. Mitosis and apoptosis in the liver of IL-6 deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* (1999) 29: 403-411.
- 81) Rana B, Mischoulon D. Cell extracellular matrix interaction can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: Reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors. *Mol. Cell.Biol* (1994) 14:5858-5869.
- 82) Marubashi S, Sakon M. Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portohepatic shunt rat model. *Surgery* 136:1028:1037.
- 83) Martinez Inigo. The influence of oxygen tension on the structure and function of isolated liver sinusoidal endothelial cells. *Comparative hepatology* 2008, 7:4
- 84) D.DeLeve, Laurie. Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration. *The journal of clinical investigation* (2013) 5: 1861-1866.
- 85) Giridhar R. Gorla. Polyploid associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. *Journal of cell science* (2001) 114; 1943-2951
- 86) M. Murillo, Miguel. Activation of NADPH oxidase by transforming growth factor- β in hepatocytes mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor ligands through a nuclear factor-k-B-dependent mechanism. *Biochem J.*(2007) 405, 251 -259.