



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Evaluación de la capacidad regenerativa hepática, en diferentes estadios de salud, en ratas Wistar.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNOSTICA

PRESENTA

FIDEL SALVADOR SILVA AGUILERA

ASESORES:

DR. JOSELÍN HERNÁNDEZ RUIZ

CO-ASESOR: MVZ. ÁNGEL GERMÁN MARTÍNEZ SOSA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación de la capacidad regenerativa hepática, en diferentes estadios de salud, en ratas Wistar.

Que presenta el pasante: **Fidel Salvador Silva Aguilera**

Con número de cuenta: **309205830** para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 31 de Enero de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Lidia Rangel Trujano	
VOCAL	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er. SUPLENTE	Dra. Jazmín Flores Monroy	
2do. SUPLENTE	M. en E. Ma. Verónica Vázquez Cianca	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos

A mi familia que siempre me ha apoyado, orientado y motivado a lo largo de la vida en todo aspecto; en educación, amistad, relaciones. Por sus valores inculcados, sus enseñanzas, sus pláticas, sus consejos, sus desvelos. Porque sin ellos no sería la persona de hoy, ni habría logrado llegar tan lejos en la vida. No tengo palabras suficientes para expresar mi agradecimiento por lo que han hecho por mí, les estoy eternamente agradecido.

A mis tutores Dr. Joselín y el M. en C. Adolfo por hacerme crecer como persona en el ámbito personal y social; abrir mi mente a posibilidades académicas y laborales que no creía posibles. Pero sobre todo por sus enseñanzas, consejos y motivaciones hacia la vida.

A mi Co Asesor el profesor Ángel por sus enseñanzas a lo largo de la carrera, porque siempre me motivo a ser más curioso en la vida, en jamás dejar de conocer, de aprender.

Al grupo de personas del CCADET la Dra. Celia y la M en C Nathalie con el que tuve el placer de colaborar, conocer y compartir momentos de diversa índole. Que sin ellas no hubiera sido posible terminar mi proceso de titulación.

A mis amigos de la carrera Alexis, Lenin, Diego, Ricardo, Cesar y a la “banca”, por enseñarme que la vida no solo es trabajar o estudiar, sino que consiste en disfrutar los pequeños y grandes momentos de la vida; por motivar mi forma de ser, de pensar.

A mis amigos del laboratorio Javier, Miriam, Yun, Yareth, Thalia, por apoyarme en las cosas que no sabía, por dedicarme tiempo para enseñarme de sus conocimientos, por hacerme reír, por todo.

Al laboratorio HIPAM por permitirme realizar mi Servicio Social y tesis en su laboratorio, por los conocimientos aprendidos desde el ámbito académico, científico y social

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por brindarme las bases del conocimiento, por permitirme conocer a personas que marcaron mi vida; por los momentos alegres y de tensión. Por recordarme que se pueden lograr cambios grandes en el mundo con un poco de unión

A la UNAM por abrirme sus puertas y aceptarme en sus aulas, por el apoyo que me ofreció a lo largo de la carrera, por enseñarme una ciudad llena de personas con diferentes formas de pensar, de ser, de actuar; y todo dentro de otra ciudad más pequeña.

A mi Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica que a pesar de ser nueva en la UNAM me dió las bases de mi vocación, por abrirme las posibilidades en la vida, por las personas que me permitió conocer, por forjar las bases de mis conocimientos.

Al personal del bioterio Memo, Dany, Chava, Alex, Sr Ricardo por ayudarme con innumerables proyectos, por sus consejos de vida.

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del laboratorio de Hígado Páncreas y Motilidad de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, ubicada en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” bajo la dirección del Dr. Joselín Hernández Ruiz.

Contenido

Glosario.....	III
Índice de Figuras.....	V
Índice de Tablas.....	VII
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Objetivos.....	5
3.1. Objetivo general.....	5
3.2. Objetivos Específicos.....	5
4. Hipótesis.....	5
5. Justificación.....	6
6. Marco Teórico.....	7
6.1. Anatomía del hígado.....	7
6.1.1. Lobulillos hepáticos.....	8
6.1.2. Funciones metabólicas del hígado.....	9
6.1.3. Células Estelares (HSC).....	10
6.2. Fibrosis.....	11
6.3. Cirrosis.....	14
6.3.1. Patogenia de la cirrosis.....	15
6.3.2. Características clínicas.....	16
6.3.3. Matriz extracelular.....	17
6.3.4. Evaluación del daño hepático por fibrosis. Escala METAVIR.....	20
6.4. Inducción de fibrosis hepática con Tetracloruro de carbono (CCl ₄).....	21
6.5. Regeneración hepática.....	22
6.5.1. Métodos Experimentales que evalúan la regeneración hepática.....	24

6.5.2. Características de la regeneración hepática	25
6.5.3 PCNA	30
7. Tipo y diseño del estudio.....	32
7.1. Criterios de inclusión.....	32
7.2. Criterios de exclusión.....	32
7.3. Criterios de eliminación.....	32
8. Metodología.....	33
8.1. Materiales.....	33
8.2. Inducción de la cirrosis hepática.....	34
8.3. Hepatectomías Parciales (Hpx)	34
8.4. Sacrificios	36
8.5. Evaluación de la progresión de la fibrosis.....	37
8.6. Inmunohistoquímica.....	37
8.6.1. Desparafinación:	37
8.6.2. Protocolo de tinción.....	38
8.7. Microfotografía óptica	38
8.8. Definición de variables.....	39
8.9. Análisis Estadístico	39
9. Resultados	40
10. Análisis de Resultados	58
11. Conclusiones.....	61
12. Bibliografía	62

Glosario

- α -SMA: Alfa actina de músculo liso, por sus siglas en inglés *Alfa Smooth Muscle Actin*
- CCl₃: Triclorometilo
- CCl₄: Tetracloruro de carbono
- CHCl₃: Cloroformo
- CHI₃: Yodoformo
- CK: Células de Kupffer
- CYP: Citocromo
- DAMP: Patrones moleculares asociados a daño, por sus siglas en inglés *Damage Associated Molecular Patterns*
- EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico
- H.E.: Tinción Hematoxilina Eosina:
- HGF: Factor de crecimiento hepático, por sus siglas en inglés *Hepatocyte Growth Factor*
- Hpx: Hepatectomía parcial
- HSC: Células estelares, por sus siglas en inglés *Hepatic Stellate cell*
- HybHP: Hepatocito híbrido, por sus siglas en inglés *Hybrid Hepatocyte*
- IL: Interleucina
- KS: Kolmogorov-Smirnov
- LC: Lóbulo caudado
- LD: Lóbulo derecho
- LI: Lóbulo izquierdo
- LM: Lóbulo medio
- LPC: Células progenitoras hepáticas, por sus siglas en inglés *Liver Progenitor Cells*
- LPC: Lóbulo papilar caudal
- MS: Tinción Tricrómica de Masson
- MEC: Matriz Extra celular
- MMPs: Metaloproteinasas de Matriz, por sus siglas en inglés *Matrix metalloproteinase*
- NO: Óxido nítrico

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos, por sus siglas en inglés

Pathogen Associated Molecular Patterns

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular, por sus siglas en inglés

Proliferation Cell Nuclear Antigen

TGF β 1: Factor de crecimiento Transformante b1, por sus siglas en inglés

Transforming Growth Factor β 1

TIMPs: Inhibidores Tisulares de las Metaloproteinasas, por sus siglas en inglés

Tissue Inhibitors of Metalloproteinases

TNF: Factor de necrosis tumoral, por sus siglas en inglés *Tumor Necrosis*

Factor

Índice de Figuras

Figura 1. Anatomía quirúrgica más común del hígado de rata y humano.	7
Figura 2. Arquitectura del hígado.	9
Figura 3. Conceptos clave involucrados en la activación se células estelares hepáticas.	11
Figura 4. Cascada de señales después de una lesión hepática.	13
Figura 5. Cambios en la arquitectura hepática asociados con la fibrosis hepática.	14
Figura 6: Historia natural de la enfermedad hepática crónica.	16
Figura 7. Alteración celular de la matriz extracelular durante la fibrosis hepática.	19
Figura 8. Clasificación de la fibrosis, de acuerdo a la escala de METAVIR	21
Figura 9. Representación de la fase inicial de “purgado” de los hepatocitos, ..	26
Figura 10. Representación esquemática del patrón replicativo secuencial de células epiteliales hepatocitos, colangiocitos y mesenquimales tras una hepatectomía.	27
Figura 11. Propuesta de células involucradas en la regeneración hepática durante lesiones hepáticas.	30
Figura 13. Metodología resumida.	33
Figura 12. Visualización quirúrgica del hígado.	36
Figura 14: Hígados expuestos previos a la Hepatectomía parcial.	40
Figura 15: Esquema de zonas del mismo lóbulo.	41
Figura 16. Total de datos analizados mediante la escala Metavir sin hacer distinción en el Grupo experimental al que pertenecen.	43
Figura 17. Resultados de los datos basados en la escala Metavir, agrupados de acuerdo a los estados de salud (Sanos, enfermos y cirróticos).	44
Figura 18: Muestras histológicas a 10x de los 3 grupos sacrificados a las 12 hrs posterior a la Hpx, teñidas con H.E.	45
Figura 19: Muestras histológicas a 10x de los 3 grupos sacrificados a las 24 hrs posterior a la Hpx, teñidas con H.E.	46
Figura 20: Muestras histológicas a 4x de los 3 grupos sacrificados a las 12 hrs posteriores a la Hpx, teñidas con T.M.	47

Figura 21: Muestras histológicas a 4x de los 3 grupos sacrificados a las 24 hrs posteriores a la Hpx, teñidas con T.M.	48
Figura 23: Comparación del porcentaje de Fibrosis entre los grupos de trabajo	50
Figura 24: Muestras histológicas a 4x de los 3 grupos teñidas con T.M. a las 12hrs. de la Hpx.	51
Figura 25: Muestras histológicas a 4x de los 3 grupos teñidas con T.M. a las 24 hrs. de la Hpx con enfoque en la zona de Regeneración	52
Figura 26: Control negativo de pruebas para el anticuerpo PCNA.....	53
Figura 27: Control positivo de pruebas para el anticuerpo PCNA.	54
Figura 28: Muestras histológicas a 4x del grupo sano teñidas con H.E. a las 12 hrs. de la Hpx	55
Figura 29: Muestras histológicas a 4x del grupo sano teñidas con H.E. a las 24 hrs. de la Hpx	56
Figura 30. Diagrama de caja y bigote para el área total de los hepatocitos en individuos sanos enfermos y cirróticos.....	57
Figura 31: Diagrama de caja y bigote para el para el área total de los hepatocitos (A_{hep})	58

Índice de Tablas

Tabla 1. Modelo de regeneración hepática en animales modificados genéticamente.....	24
Tabla 2: Principales citocinas inductoras de la regeneración hepática y sus fuentes.	28
Tabla 3. Materiales utilizados en el desarrollo experimental	34
Tabla 4. Clasificación de grupos de trabajo según escala Metavir	37
Tabla 5. Definición de las variables definidas en el estudio.	39
Tabla 6. Comparación de cantidad de animales al inicio y posterior a las inducciones de CCL4 y Hepatectomías parciales	41
Tabla 7. Resultados de imágenes analizadas en el estudio clasificadas en base a la escala Metavir	42

1. Resumen

La fibrosis hepática es una respuesta del hígado para reparar las lesiones provocadas por un daño, que de ser persistente, conduce a cirrosis y falla hepática.¹ Se desarrolla debido a un aumento en la síntesis y deposición de colágena fibrilar, asociada a la remodelación insuficiente de la matriz extracelular. La cirrosis hepática se conoce como el estadio final de todas las enfermedades hepáticas crónicas progresivas.^{2,3} Es una alteración histopatológica del hígado caracterizada por la formación de septos fibrosos y nódulos de regeneración, estructuralmente anormal.⁴

La fibrosis hepática es reversible si se trata y se erradica la causa de la enfermedad y si las lesiones no son demasiado graves, es decir, si el diagnóstico es oportuno y se da un tratamiento efectivo, el hígado puede recuperar su estructura normal. En este sentido, cabe resaltar que la alta capacidad de regeneración hepática posterior a una hepatectomía de 2/3 de su él y su recuperación funcional, son propiedades exclusivas de este órgano, donde el inicio y final de la regeneración se encuentran estrictamente regulados.⁵

Para evaluar esta regeneración existen diversos métodos, siendo la cuantificación del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) uno de los más usados por muchos años al ser una proteína sintetizada en el núcleo que funciona como cofactor de la ADN polimerasa delta, y expresa picos en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular.⁶

Para contribuir con el desarrollo del conocimiento en función a la regeneración estructural hepática bajo ciertas condiciones, se evaluó la proliferación hepática en 3 grupos de 6 ratas *Wistar* cada uno (Sanos, Enfermos y cirróticos) posterior a una hepatectomía menor al 30%, esto con la finalidad de encontrar alguna señal o indicio de regeneración. Este parámetro se midió aplicando una herramienta morfométrica para la cuantificación de hallazgos histopatológicos que entrega una medida cuantitativa en una escala continua del problema que se estudió (cuantificación del área de los núcleos de los hepatocitos y porcentaje de fibrosis). Con esta cuantificación se realizó una prueba para la comparación de medias con los datos agrupados en función a

diferentes variables. Los resultados obtenidos al cuantificarse el área de los núcleos de los hepatocitos y el porcentaje de la fibrosis se tuvo una diferencia significativa entre cada uno de los grupos, en el caso del área de los hepatocitos el de mayor cantidad correspondió al grupo de ratas sanas y el de menor el grupo de ratas cirróticas; mientras que en el porcentaje de la fibrosis resultó menor el grupo sano y mayor en el grupo cirrótico. Sin embargo, posterior a la hepatectomía (12 y 24 hrs), no hubo diferencias entre cada grupo.

Concluyendo, en el presente estudio se observó que la regeneración hepática posterior a una hepatectomía menor al 30% se llevó a cabo en los hígados cirróticos por una hipertrofia compensatoria, mientras que en los hígados sanos no se llevó a cabo este proceso.

2. Introducción

El hígado ejecuta un gran número de funciones propias del organismo como la de almacenamiento, síntesis y biotransformación de diversos compuestos, entre otras. Además de sus funciones homeostáticas y metabólicas, el hígado es el mayor órgano sólido del organismo y un filtro natural para microorganismos (bacterias, virus y moléculas potencialmente tóxicas (xenobióticos) procedentes del torrente circulatorio y el sistema portal.⁷ Toda afección crónica del hígado tendrá como resultado una cicatriz fibrosa del tejido hepático, esta impide el buen funcionamiento del órgano y no presenta ningún síntoma específico. La fibrosis hepática constituye un proceso de cicatrización que sustituye las células del hígado dañadas; es reversible si se trata y erradica la causa de la enfermedad y si las lesiones no son demasiado graves, en ese caso, el hígado puede recuperar una estructura normal. Cuando el hígado es sometido a un daño grave (físico, químico o biológico) las células estelares hepáticas se activan al ser las encargadas de producir fibras de colágena, causando su deposición en la matriz extracelular (MEC) del parénquima hepático (fibrosis). Al ser retirado el insulto, el hígado tiene la capacidad de revertir el daño, recuperar su arquitectura normal y sus funciones⁸. Sin embargo, si la lesión persiste o aumenta, se produce una elevación en la cantidad y densidad de la MEC en el parénquima, lo cual progresa hasta convertirse en cirrosis y una vez establecida una cirrosis avanzada, revertir este proceso en humanos de forma natural no es posible actualmente⁸. En este sentido, la regeneración hepática representa una de las formas más extraordinarias de respuesta al daño tisular. La rápida restauración del volumen y de la función hepática posterior a una hepatectomía mayor al 70% es una propiedad exclusiva de este órgano.⁵

En cuanto al proceso de regeneración hepática, cabe mencionar que los hepatocitos permanecen en la fase G0 del ciclo celular en condiciones normales, pero a diferencia de otros tejidos, mantienen la capacidad de reiniciar el ciclo celular ante cualquier lesión, pérdida de tejido hepático o estímulos exógenos. Este proceso de proliferación es muy rápido ya que se

inicia en segundos y termina en pocos días⁹, y puede ser evaluado por la expresión del PCNA, el cual es un indicador de actividad mitótica.¹⁰

Hay dos formas principales mediante las cuales se lleva a cabo la regeneración hepática:

- 1) Por incremento de número (Hiperplasia) y/o tamaño (hipertrofia) de las células maduras preexistentes (Hepatocitos).^{2,11}
- 2) Por activación y proliferación de células progenitoras del hígado (LPC, por sus siglas en inglés Liver Progenitor Cells).^{2,11}

La participación de uno, otro o ambos mecanismos depende del daño hepático.^{2,11}

Varios factores determinan el proceso de regeneración. Entre ellos, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), es un potente mitógeno específico para los hepatocitos¹²; y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) el cual se cree que es un factor clave en revertir a los hepatocitos al estado basal estado quiescente y terminar la regeneración hepática.^{7,13}

Treinta minutos después de una hepatectomía parcial (independientemente del volumen retirado), se ha descrito un aumento de los factores de transcripción que estimulan la síntesis de proteínas y la expresión de los genes necesarios para iniciar el ciclo celular. En la rata, ocurre un incremento en la síntesis de DNA (fase S) a las 24 horas de la hepatectomía, y en ratón a las 36 horas.⁹

La cirrosis es el desarrollo de nódulos de regeneración rodeados por septos fibrosos en respuesta a una lesión hepática crónica, donde el número y la capacidad de proliferación de los hepatocitos se ve disminuida^{2,3}, por lo que el estudio de los mecanismos de regeneración en el hígado cirrótico, pueden ayudar a encontrar tratamientos que mejoren la capacidad regenerativa y como consecuencia, mejorar la función hepática.²

La cirrosis hepática es una de las causas más importantes de la pérdida de salud a nivel mundial. Según el estudio *Global Burden of Disease 2010*, la cirrosis hepática causó 31 millones de discapacidades (*DALY, Disability Adjusted Life Years, "años de vida ajustados por discapacidad"*), o 1.2% de los DALY globales, y un millón de muertes, lo que representa el 2% de todas las muertes a nivel mundial. Ocupando la quinta causa de muerte a nivel mundial.¹⁴, por lo que es indispensable entender de mejor manera la

patología y diseñar mejores estrategias de prevención y control. Debido a lo anterior, en el presente trabajo se utilizó un modelo animal para evaluar la capacidad regenerativa y la proliferación celular analizando la expresión de PCNA en tejido en proceso de regeneración, posterior de 12 y 24 horas de una hepatectomía parcial en los diferentes estadios de evolución de la fibrosis.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar la regeneración del hígado de rata en diferentes estadios de salud y a diferentes tiempos, después de una hepatectomía parcial, para encontrar marcadores de proliferación celular que ayuden a encontrar tratamientos que mejoren la regeneración hepática.

3.2. Objetivos Específicos

1. Inducir diferentes grados de fibrosis en ratas (Sanos, Enfermos y Cirróticos) con tetracloruro de carbono (CCl₄).
2. Realizar hepatectomías parciales en los diferentes grupos de fibrosis.
3. Evaluar y comparar la capacidad regenerativa en distintas etapas de fibrosis a las 12 y 24 horas posteriores a una hepatectomía.
4. Evaluar y comparar la proliferación celular en distintas etapas de la fibrosis a las 12 y 24 horas posteriores a la hepatectomía

4. Hipótesis

Si la capacidad de proliferación hepática posterior a una hepatectomía parcial aumenta en ratas sanas, entonces al incrementar el grado de fibrosis la capacidad regenerativa disminuirá.

5. Justificación

La fibrosis hepática es un padecimiento a nivel mundial con una alta tasa de morbilidad y mortalidad en su etapa final que es la cirrosis¹⁵. En México, la morbilidad por cirrosis hepática en 2005 fue de 11.7 casos por cien mil habitantes y en 2006 de 12.4, lo que representando un incremento del 6% anual. Por lo que respecta a la mortalidad, la cirrosis hepática se posiciona como la tercera causa de muerte en el país; en el año del 2006 la tasa de mortalidad estandarizada para esta causa fue de 28.9 defunciones por cien mil habitantes, observando que el riesgo de morir por esta causa entre los hombres es 3 veces mayor que el de las mujeres.¹⁶

Aproximadamente el 90% de las causas de cirrosis hepática en países occidentales son el abuso de alcohol, la enfermedad por hígado graso no alcohólico (NAFLD por sus siglas en inglés, *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*) y la hepatitis crónica vírica. A escala mundial, la hepatitis crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC), con más de 400 millones de enfermos infectados, representa la etiología más importante.¹⁷

A pesar que existen tratamientos paliativos para la cirrosis, como inhibidores de la respuesta inflamatoria; antiinflamatorios esteroideos, reductores de la actividad de células productoras de matriz extracelular, etc., en la actualidad no existe tratamiento eficaz para revertir la cirrosis.⁸

Hoy en día la única alternativa de solución en caso de cirrosis es el trasplante de hígado, presentando múltiples limitantes; es una cirugía de alto riesgo, son escasas y el tiempo de vida posterior a un trasplante no es muy alentador¹⁴. Por lo que es indispensable entender de mejor manera la patología y diseñar mejores estrategias de prevención, control y/o cura.

Se trabajó con ratas Wistar, ya que éstas son el modelo experimental más utilizado en la investigación quirúrgica y uno de los modelos experimentales más usados para investigaciones biomédicas, biológicas y moleculares debido a muchos factores, en particular, porque se tiene un enorme conocimiento sobre su fisiología, existen una gran cantidad de anticuerpos, es de fácil manejo y bajo costo.^{18,19}

6. Marco Teórico

6.1. Anatomía del hígado

El hígado se clasifica como un órgano accesorio del aparato gastrointestinal. Siendo el órgano visceral más grande del organismo. En ratas, la masa hepática representa aproximadamente el 5% del peso corporal total, mientras que en seres humanos adultos representa el 2,5%.¹⁸

Desde la perspectiva anatómica, el hígado humano se divide en 2 lóbulos grandes (lóbulo derecho e izquierdo) y 2 lóbulos más pequeños (lóbulos caudado y cuadrado), como se ilustra en la Figura 1^{18,20}. Mientras que el hígado de las ratas tiene 6 lóbulos divididos en: lóbulo medial (ML) siendo el más grande al representar aproximadamente del 38% del peso total del hígado, tiene una curvatura por la mitad lo que da la apariencia de un lóbulo puntiagudo anexo (LML, porción izquierda del lóbulo medial); lóbulo lateral izquierdo (LLL) representando el 30% del peso total, lóbulo superior lateral derecho (SRL) con el 12% del peso, lóbulo lateral inferior derecho (IRL) muy pequeño representando el 10 % y el proceso caudado (PC) el cual se encuentra subdividido en el lóbulo caudado anterior (AC) y el lóbulo caudado posterior (PC) con el 4% del peso total cada uno.^{18,20}

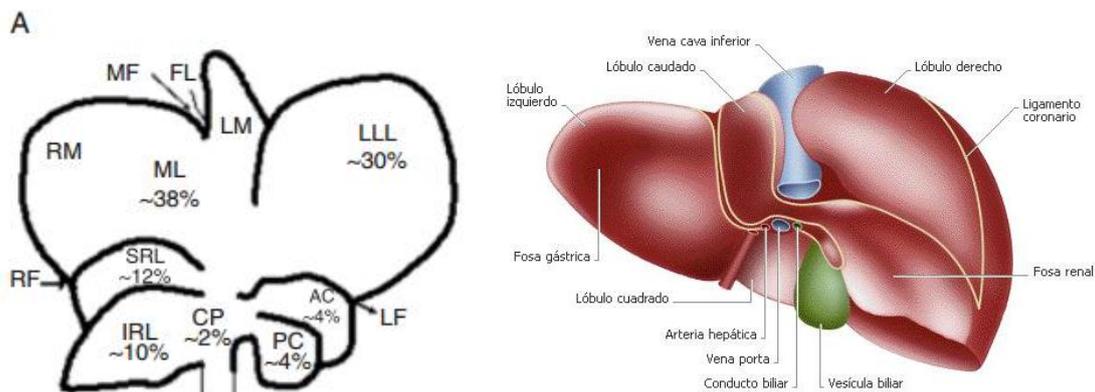


Figura 1. Anatomía quirúrgica más común del hígado de rata y humano. A) Hígado de rata: CP, proceso caudado; AC, lóbulo caudado anterior; PC, lóbulo caudado posterior; SRL, lóbulo superior lateral derecho; IRL, lóbulo lateral inferior derecho; ML, lóbulo medial; RML, porción derecha del lóbulo medial; LML, porción izquierda del lóbulo medial; LLL, lóbulo lateral izquierdo; MF, fisura principal o mediana (fisura umbilical); LF, fisura izquierda; RF, fisura derecha; FL, ligamento falciforme. B) Hígado de humano^{18,20}

El hígado recibe el 25% del gasto cardíaco en reposo. Entre los órganos abdominales es el único que tiene una irrigación sanguínea doble, constituida por una irrigación venosa que llega por la vena porta hepática y representa el 80% de la sangre que recibe; se conoce como una irrigación funcional, caracterizándose por tener altas cantidades de nutrientes provenientes del tubo digestivo y de los órganos abdominales principales, como el páncreas y el bazo, llevando nutrimentos y materiales tóxicos que se absorben en el intestino, células hemáticas y sus productos de degradación a partir del bazo e insulina y glucagón del páncreas. La segunda vía de irrigación se conforma por una irrigación arterial derivada de la arteria hepática, representando el 20% de la sangre en circulación, esta se conoce como circulación nutricia, por su alta carga en oxígeno proveniente del corazón.^{21,18,22} El flujo venoso de salida del hígado tiene lugar a través de las venas hepáticas que carecen de válvulas y drenan en la vena cava inferior justo por debajo del diafragma.^{18,22}

6.1.1. Lobulillos hepáticos

Los lobulillos son las unidades funcionales del hígado. Existen alrededor de 50 000 a 100 000 lobulillos en el hígado humano y cada uno se organiza en torno a una vena central que drena en las venas hepáticas y de ahí en la vena cava. Son estructuras cilíndricas que miden alrededor de 0.8 mm a 3 mm de diámetro.^{18,22}

Los conductos biliares terminales y las ramificaciones pequeñas de la vena porta y la arteria hepática se ubican en la periferia del lobulillo. En la Figura 2 es posible apreciar la arquitectura hepática, compuesta por cordones de células hepáticas que irradian en sentido centrífugo a partir de la vena central, estas placas hepáticas se encuentran separadas por capilares sinusoidales anchos de pared delgada, denominados sinusoides, que se extienden de la periferia de lobulillos hacia su vena central. Se encuentran en contacto íntimo con las células hepáticas y participan en el intercambio de sustancias entre la sangre y los hepatocitos. Están integradas con 2 tipos de células: las células endoteliales capilares típicas, con fenestraciones que

permiten el intercambio de solutos y las células de *Kupffer* (CK) cuya función es similar a los macrófagos, al fagocitar sustancias ajenas al hígado.^{23 22} *Figura 2*²². Estas últimas son células retículo endoteliales capaces de fagocitar células hemáticas viejas y defectuosas, bacterias y otros materiales extraños que llegan en la sangre portal al tiempo que fluyen por el sinusoides. Esta acción fagocítica elimina los bacilos entéricos y otras sustancias lesivas que se filtran hacia la sangre a partir del intestino.^{24,25}

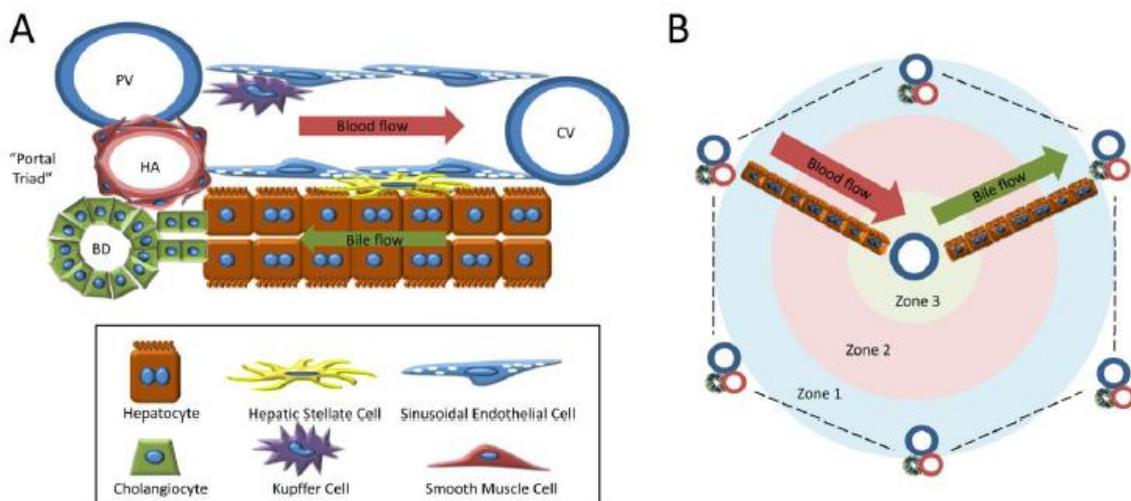


Figura 2. Arquitectura del hígado. (A) Esquema que representa la arquitectura y la composición de tipo celular del sinusoides hepático. La sangre entra en el lóbulo de las ramas de la vena porta (PV) y la arteria hepática (HA) y progresa a través de los capilares sinusoidales, hasta las venas centrales (CV). La bilis fluye en dirección opuesta hacia la tríada portal y sale por los conductos biliares (BD). Los hepatocitos están alineados a lo largo de los sinusoides en "placas" de hepatocitos. Las células estrelladas hepáticas residen entre las células endoteliales sinusoidales y los hepatocitos en el "espacio de Disse" (B) Diagrama que ilustra la organización del lóbulo hepático, incluyendo las estructuras vasculares y la zonalidad relativa del lóbulo. Esta unidad se repite en todo el hígado. Se muestran placas representativas de hepatocitos para orientación; Estas hileras de hepatocitos llenan todo el lóbulo y son revestidas con sinusoides²²

6.1.2. Funciones metabólicas del hígado

El hígado es uno de los órganos más versátiles y activos del organismo, metaboliza hormonas y fármacos; sintetiza proteínas, glucosa y factores de la coagulación; almacena vitaminas y minerales; transforma en urea el amoníaco que se produce por la desaminación de los aminoácidos y convierte los ácidos grasos en cetonas. También degrada los nutrientes

excedentes y los convierte en sustancias esenciales para el organismo. En su capacidad para metabolizar los fármacos y las hormonas, el hígado funge como un órgano excretor. En este sentido, la secreción de la bilis se da por pequeños canales tubulares, denominados canalículos biliares, ubicados entre las membranas celulares de los hepatocitos adyacentes transportan los productos finales de las sustancias que se metabolizan en el hígado, fluyendo hacia los canalículos y luego hacia la periferia de los lobulillos, para drenar en conductos cada vez mayores. Con frecuencia los conductos biliares intra hepáticos y extra hepáticos en conjunto se denominan, árbol hepatobiliar.²²

6.1.3. Células Estelares (HSC)

La principal fuente del exceso de colágena en la cirrosis es producida por las células estelares (en el pasado llamadas células de *Ito*), localizadas en el espacio de *Disse*. Aunque en condiciones normales se comportan como células de depósito de la vitamina A, durante el desarrollo de la fibrosis se activan y transforman en miofibroblastos. Entre los estímulos responsables de la activación de las células estelares y la producción de colágena se encuentran las especies reactivas de oxígeno, los factores de crecimiento y algunas citocinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleucina I(IL1) y las linfoquinas, que pueden ser elaboradas por los hepatocitos lesionados o por células de *Kupffer* y células endoteliales sinusoidales dañadas como se ilustra en la Figura 3.¹ Las propias células estrelladas activadas pueden elaborar factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, que aumentan todavía más la proliferación e inducen la síntesis de colágeno, en particular el Factor de crecimiento Transformante β (TGF. β).^{2,26}

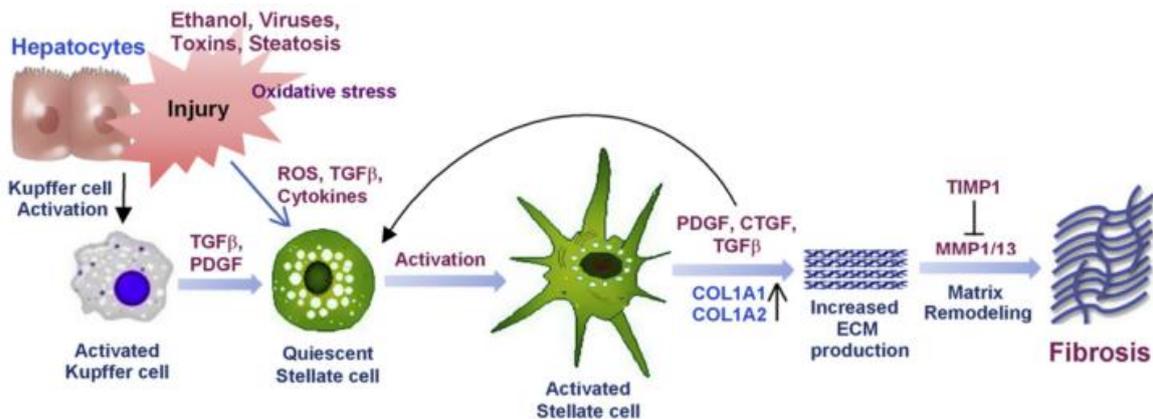


Figura 3. Conceptos clave involucrados en la activación de células estelares hepáticas. Breve mención de los factores involucrados en la activación de células estelares y formación de la fibrosis¹

6.2. Fibrosis

La fibrosis hepática es una respuesta del hígado para reparar las lesiones provocadas por un daño, que, si persiste, conduce a cirrosis y a falla hepática.¹

En el momento que ocurre una lesión en el hígado se ocasiona una necrosis y/o apoptosis de las células en el parénquima, ocasionando la liberación de contenido celular y especies reactivas de oxígeno activando a las células estrelladas, atrayendo y activando macrófagos tisulares mediante la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (CCL2) y su receptor CCR2. Las células estrelladas y macrófagos secretan mediadores pro-inflamatorios y reclutan células T y neutrófilos. La secreción del factor de crecimiento transformante β (TGF β) en particular conduce a la transdiferenciación de células estrelladas hepáticas en miofibroblastos y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) estimula la proliferación de estos mismos.⁸ Como se observa en la Figura 4.⁸

Durante la evolución de la enfermedad o contacto con el agente dañino se desarrolla un aumento en la síntesis y deposición de colágeno, asociada a una remodelación insuficiente de la matriz extracelular,²⁷ modulada por el equilibrio variable entre las metaloproteinasas de la matriz extracelular (por sus siglas en inglés MMP's) y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (por sus siglas en inglés TIMP's). Las metaloproteinasas son una familia de enzimas proteolíticas dependientes de zinc que degradan los componentes de la matriz extracelular. Se activan por diversos factores tales como: estrés oxidativo,

agentes químicos, citocinas, interacciones con la matriz extracelular, etc. Por otra parte, los TIMP's son una familia de proteínas que regulan a las MMP's, modulando la proteólisis que se lleva a cabo en la matriz extracelular. Se asocian a cambios patológicos y bioquímicos que conducen a anomalías estructurales, y a un aumento en la cicatrización hepática.^{8,28} Como se observa en la Figura 5.²⁹

Las principales lesiones vasculares que contribuyen a los defectos de la función hepática son la pérdida de las fenestraciones de las células endoteliales sinusoidales y el desarrollo de fibras de colágena entre triadas hepáticas, entre estas y la vena porta o entre venas portas.^{18,30}

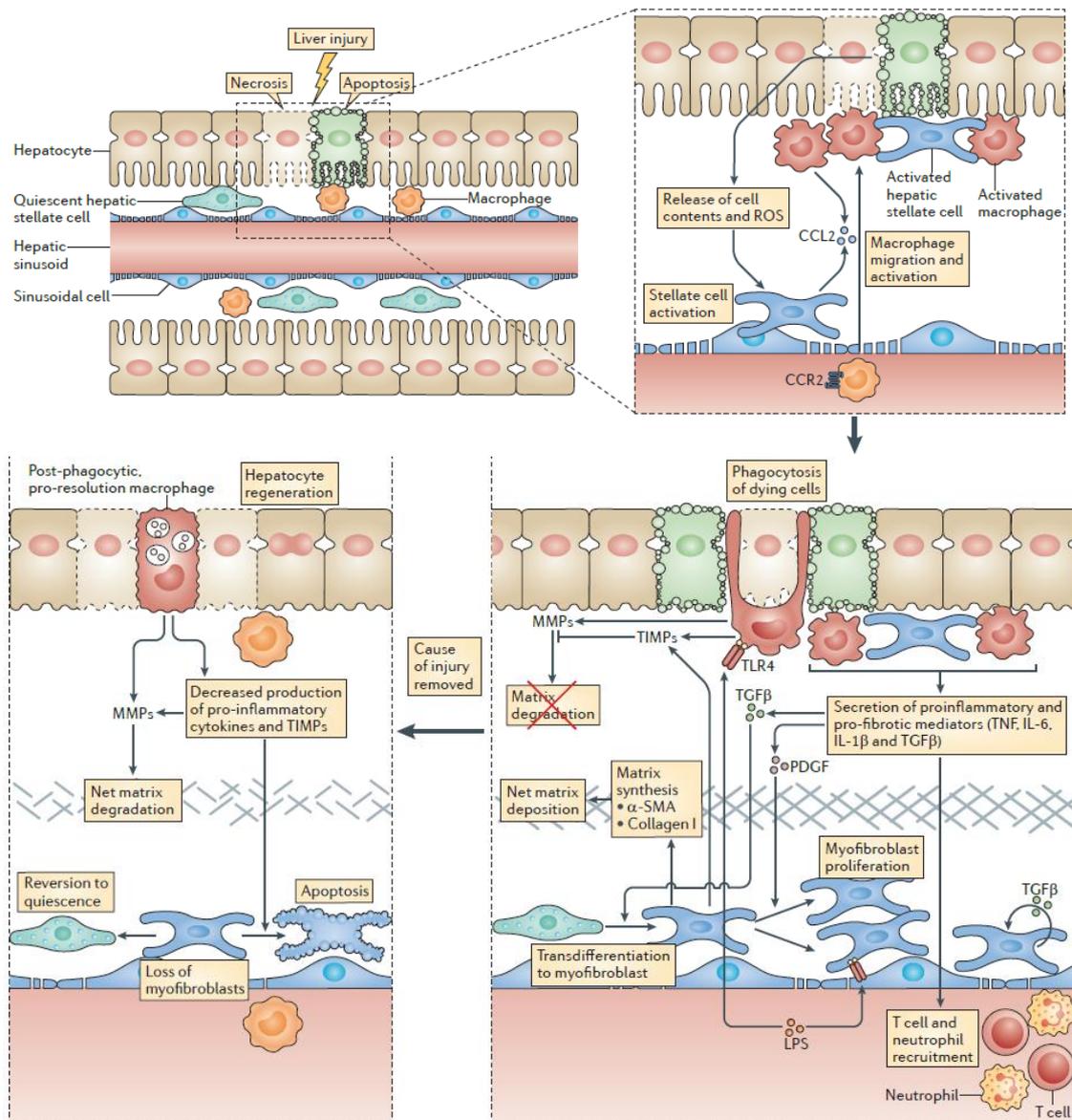


Figura 4. Cascada de señales después de una lesión hepática.⁸ La lesión hepática causa la necrosis de células de parénquima y / o apoptosis. La liberación de los contenidos celulares y especies reactivas de oxígeno (ROS) activa las células estrelladas hepáticas y atrae y activa los macrófagos del tejido a través del ligando de quimiocinas CC 2 eje (CCL2) receptor de quimioquinas -CC-2 (CCR2). Los macrófagos y las células estrelladas hepáticas fagocitan las células necróticas y apoptóticas. Los macrófagos activados y células estrelladas hepáticas secretan mediadores pro-inflamatorios, y reclutan células T y neutrófilos. La secreción de factor de crecimiento transformante- β (TGF) en las derivaciones particulares a la transdiferenciación de las células estrelladas hepáticas en miofibroblastos. El PDGF estimula la proliferación de miofibroblastos. Miofibroblastos derivados de células estrelladas hepáticas expresan α -actina de músculo liso (α SMA) y el colágeno I. Los macrófagos tienen una capacidad latente para degradar la matriz cicatriz recién sintetizada a través de la secreción de MMP's, pero la actividad de la proteasa es inhibida por la producción concurrente de TIMP por miofibroblastos y macrófagos, lo que resulta en la deposición de matriz progresiva y la acumulación de la cicatriz. Si se elimina el irritante subyacente, macrófagos post-fagocíticos se someten a un interruptor fenotípico que favorece la resolución de la fibrosis. Los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y de TIMPs disminuyen, lo que facilita la pérdida de miofibroblastos hepáticos y aumenta la degradación de la matriz y la reparación tisular.⁸

Mientras que los sinusoides normales tienen células endoteliales fenestradas que permiten un intercambio libre de solutos entre el plasma y los hepatocitos, la pérdida de fenestraciones y el aumento de la membrana basal convierten a los sinusoides de pared delgada en un canal vascular de presión más elevada con flujo rápido sin este intercambio de solutos observándose en la Figura 4²⁹. En concreto, el desplazamiento de las proteínas (p. ej., albúmina, factores de la coagulación, lipoproteínas) entre los hepatocitos y el plasma sufre alteraciones importantes. Estos cambios funcionales resultan agravados por la pérdida de las microvellosidades en las superficies de los hepatocitos, lo que reduce todavía más su capacidad de transporte. Las derivaciones vasculares provocan presiones vasculares anómalas dentro del hígado, y contribuyen a la disfunción hepática y a la hipertensión portal.^{30,31}

La deposición progresiva de la matriz en el parénquima hepático aumenta la permeabilidad intestinal y en conjunto con el lipopolisacárido hepático (LPS) ocasiona que la señalización a través de los receptores tipo Toll 4 (TLR4) promuevan la fibrogénesis, en la cual las células estrelladas hepáticas activadas por TLR4 producen quimiocinas y expresan moléculas de adhesión que reclutan macrófagos residentes en el sitio de la lesión.⁸

La ventaja de esta etapa es que, incluso en estadios avanzados de la enfermedad, si se detiene o elimina el proceso patológico, se podría observar una reversión significativa a nivel estructural e, incluso, la recuperación total de la función hepática (regresión de la fibrosis).³⁰ Donde los macrófagos post-

fagocíticos se someten a un cambio fenotípico que favorece la resolución de la fibrosis. Los niveles de citocinas proinflamatorias y TIMP disminuyen, lo que facilita la pérdida de miofibroblastos hepáticos y mejora la degradación de la matriz y la reparación del tejido.⁸

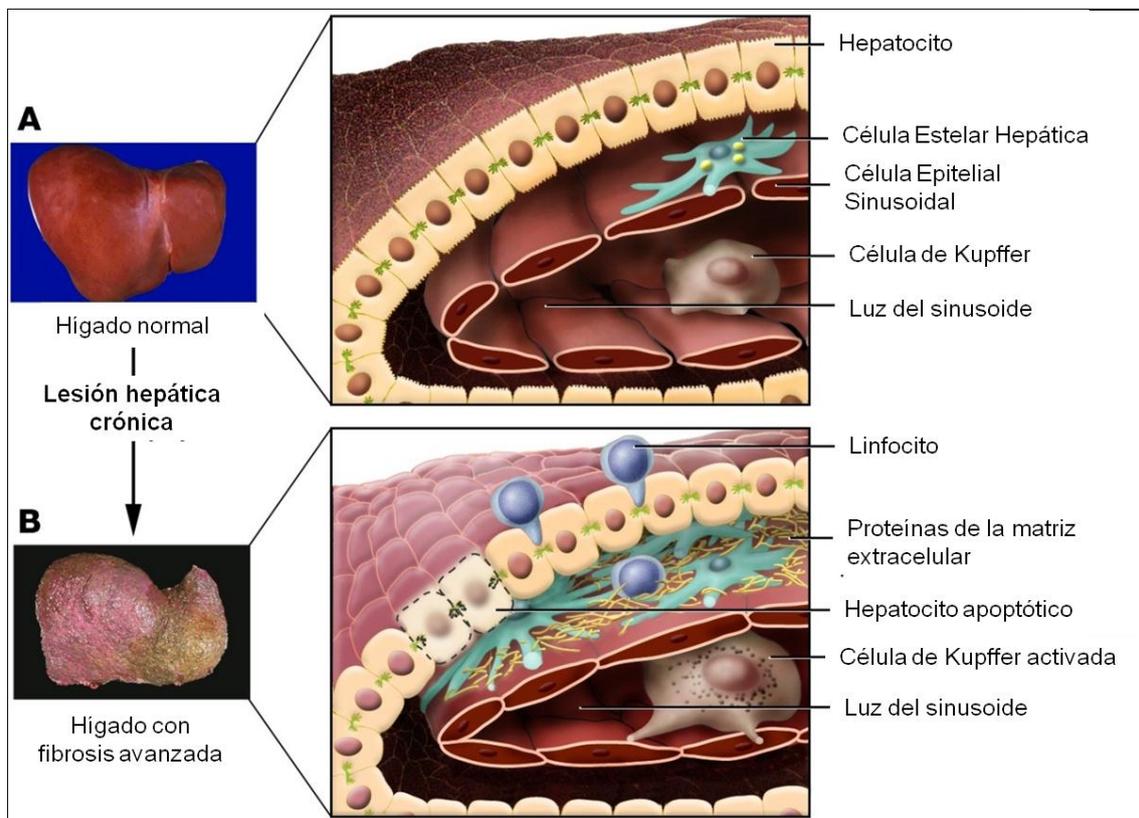


Figura 5. Cambios en la arquitectura hepática asociados con la fibrosis hepática. A) Hígado en condiciones normales B). Hígado enfermo. Después de una lesión hepática crónica se da el reclutamiento y estimulación de células inflamatorias; (incluyendo células de Kupffer), que se infiltran en el parénquima hepático. Factores liberados por estas células, conducen a la transformación de HSC en miofibroblastos secretando grandes cantidades de proteínas de matriz extracelular. La presencia de una MEC fibrilar en el espacio de Disse afecta la función de los hepatocitos; hay pérdida de micro vellosidades y pérdida de fenestraciones en las células endoteliales sinusoidales.²⁹

6.3. Cirrosis

La cirrosis hepática ocupa el quinto lugar de muerte a nivel mundial y el tercero en México³². Siendo un problema desestimado a favor de otros tipos de padecimientos y a pesar de ser considerada un problema de salud, no se ha estudiado apropiadamente. Sus principales causas son las infecciones virales

crónicas, la esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica y las enfermedades auto inmunitarias que afectan a los hepatocitos y/o los conductos biliares.³³

La cirrosis hepática es el estadio final de todas las enfermedades hepáticas crónicas progresivas. Es una alteración histopatológica difusa del hígado caracterizada por pérdida del parénquima hepático, formación de septos fibrosos y nódulos de regeneración estructuralmente anormales, dando lugar a una distorsión de la arquitectura hepática normal y a una alteración de la anatomía de la vascularización hepática y de la microcirculación.³⁴

6.3.1. Patogenia de la cirrosis

Las causas de las lesiones hepatocelulares que pueden ocasionar una cirrosis son variadas y dependen de la etiología (viral, alcohólica, farmacológica)³¹ (Figura 6)⁸. Los siguientes mecanismos fisiopatológicos son importantes en el desarrollo de cirrosis hepática de cualquier etiología: a) necrosis o lisis de hepatocitos con pérdida del parénquima hepático e inflamación; b) fibrogénesis (depósito de matriz extracelular); c) cambios en el crecimiento celular (hiperplasia, regeneración) y d) alteraciones vasculares y circulatorias.^{34,35,36,}

La necrosis, lisis de hepatocitos e inflamación crónica y continua constituyen un estímulo y factor perpetuador de proliferación y crecimiento de los hepatocitos y del proceso de fibrogénesis. En la cirrosis se producen citocinas profibrogénicas tales como TGF- β 1 que inician y perpetúan la activación de las células estrelladas hepáticas transformándolas en un fenotipo diferente: miofibroblastos. Los cuales se contraen, proliferan y producen colágeno y otros componentes de la matriz extracelular.^{34,35,36,}

Inicialmente la cirrosis aparece en las zonas periportales y pericentrales. Si la fibrogénesis se perpetúa se producen puentes o septos de fibrosis que conectan los espacios portales con las venas centro lobulillares alterando la arquitectura hepática y formando nódulos de regeneración.³ El depósito de matriz extracelular y colágeno en el espacio de *Disse* conlleva la formación de pseudo-membranas localizadas en el endotelio sinusoidal, lo que se conoce como “capilarización de los sinusoides”. Esto produce una barrera adicional creada entre la luz sinusoidal y los hepatocitos que impide el

intercambio de sustancias entre la sangre sinusoidal y las células parenquimatosas, siendo los hepatocitos los más vulnerables al daño isquémico y nutritivo. Un proceso de angiogénesis acompaña al proceso fibrogénico produciendo en el hígado “neo-vasos” que pueden desempeñar un papel en la patogénesis de la hipertensión portal. La destrucción del parénquima combinada con la regeneración e hiperplasia de células parenquimatosas, la estrangulación fibrótica del tejido hepático y las alteraciones vasculares contribuyen a la transformación nodular del hígado.^{34,35,36} La progresión de esta patología se ilustra en la figura 5.^{8,8}

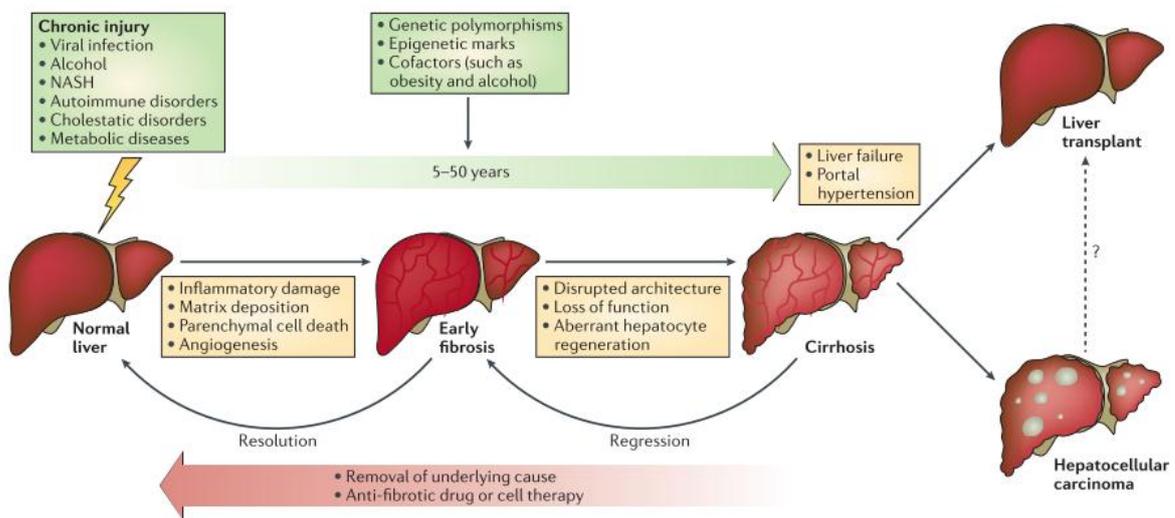


Figura 6: Historia natural de la enfermedad hepática crónica. La fibrosis hepática es la respuesta de cicatrización a heridas del hígado para muchas causas de lesión crónica. Polimorfismos genéticos, marcas epigenéticas y cofactores (como la obesidad y el alcohol) pueden modular el riesgo de progresión de la fibrosis. Si la causa de la fibrosis se elimina, puede ocurrir resolución (reversión completa de la arquitectura hepática a normal) de la fibrosis hepática temprana. Una vez establecida la cirrosis el potencial para revertir este proceso se reduce y las complicaciones se desarrollan. El carcinoma hepatocelular está aumentando en incidencia mundial y es una causa importante de muerte relacionada con el hígado en pacientes con cirrosis.⁸

6.3.2. Características clínicas

Todas las formas de cirrosis pueden ser clínicamente silenciosas. Cuando aparecen síntomas, son inespecíficos; se pueden encontrar anorexia, pérdida de peso, debilidad, y en los casos evolucionados, debilitamiento franco. Puede aparecer una insuficiencia hepática incipiente o franca, La hipertensión

portal es una de las complicaciones más importantes de la cirrosis descompensada e interviene en la aparición de ascitis y hemorragia por varices esofagogástricas. La disfunción hepatocelular origina ictericia, trastornos de la coagulación e hipoalbuminemia y contribuye a la encefalopatía porto-sistémica.^{1,31}

A pesar de que existen tratamientos paliativos para la cirrosis, como inhibidores de la inflamación y la respuesta inflamatoria, antiinflamatorios esteroideos, reductores de la actividad de células productoras de matriz extracelular, etc, en la actualidad no existe tratamiento no quirúrgico eficaz para revertir la cirrosis.⁸

Actualmente, la única alternativa viable en caso de cirrosis es el trasplante de hígado el cual presenta varias limitantes al ser una cirugía de alto riesgo, los trasplantes de este órgano son muy escasos, el tiempo de vida posterior a un trasplante es limitado y su calidad de vida disminuye; el organismo tarda de 3-6 meses posterior a la cirugía para recuperar la rutina; actividades y dieta se encuentran limitadas y puede ocurrir rechazo al injerto.^{6,28,28}

6.3.3. Matriz extracelular

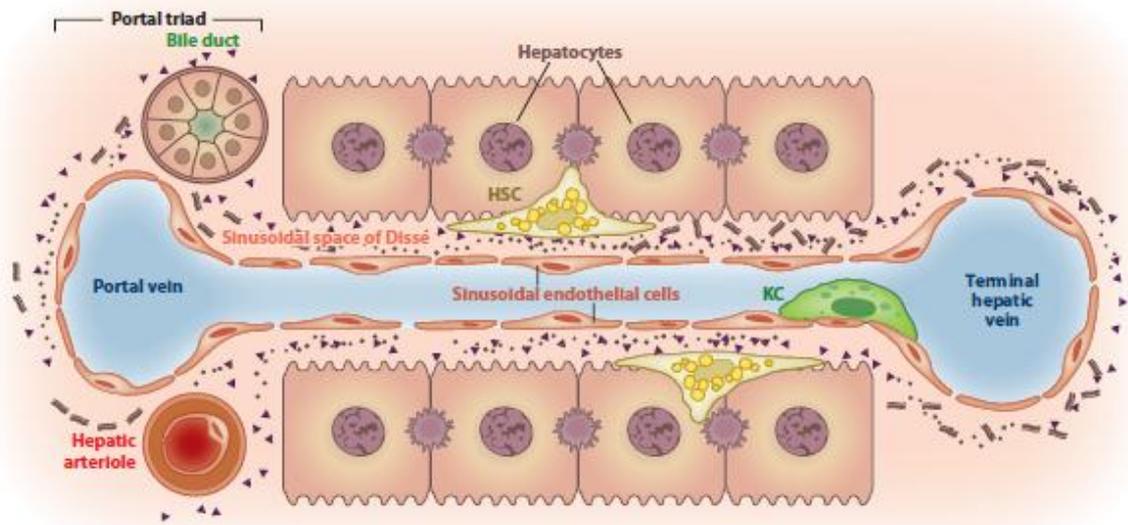
Los cambios del tejido conjuntivo y de la MEC son comunes a todas las formas de la cirrosis. La matriz extracelular ocupa un pequeño porcentaje del volumen del hígado normal, sin embargo, juega un papel desproporcionadamente importante en la función hepática. Tiene funciones de señalización y elementos arquitectónicos del hígado, responsables de mantener el estado diferenciado de los hepatocitos normales y las células no parenquimatosas.³⁰

En el hígado normal, la MEC está constituida por una variedad de tipos de colágena y se localizan en la cápsula hepática, en los espacios portales y alrededor de la vena central.³⁷

Durante la fibrosis se produce un aumento de casi 10 veces en la expresión de proteínas de la matriz en el hígado. El cambio más notable es la capilarización de los sinusoides, en el que la matriz se dispersa de forma atípica en el espacio de Disse, perdiéndose las fenestraciones del endotelio

sinusoidal. Este proceso se inicia con un aumento de fibronectina en el espacio de Disse, seguido por el aumento de los colágenos tipo I, III y IV. Además, el aumento de la ECM afecta el intercambio normal de las proteínas y los fluidos entre la sangre y las células hepáticas. En cirrosis, la arquitectura normal del hígado se pierde con la formación de septos fibrosos cada vez más densos de fibronectina y colágenos tipo I, III, V y VI. Figura 7 ³¹: Estas bandas de matriz pueden quedar estabilizadas progresivamente (por ejemplo, mediante entrecruzamiento del colágeno) y resisten a agentes como a la proteasa, impidiendo la remodelación y la resolución de la cirrosis.³⁷

a Normal liver



b Fibrotic liver

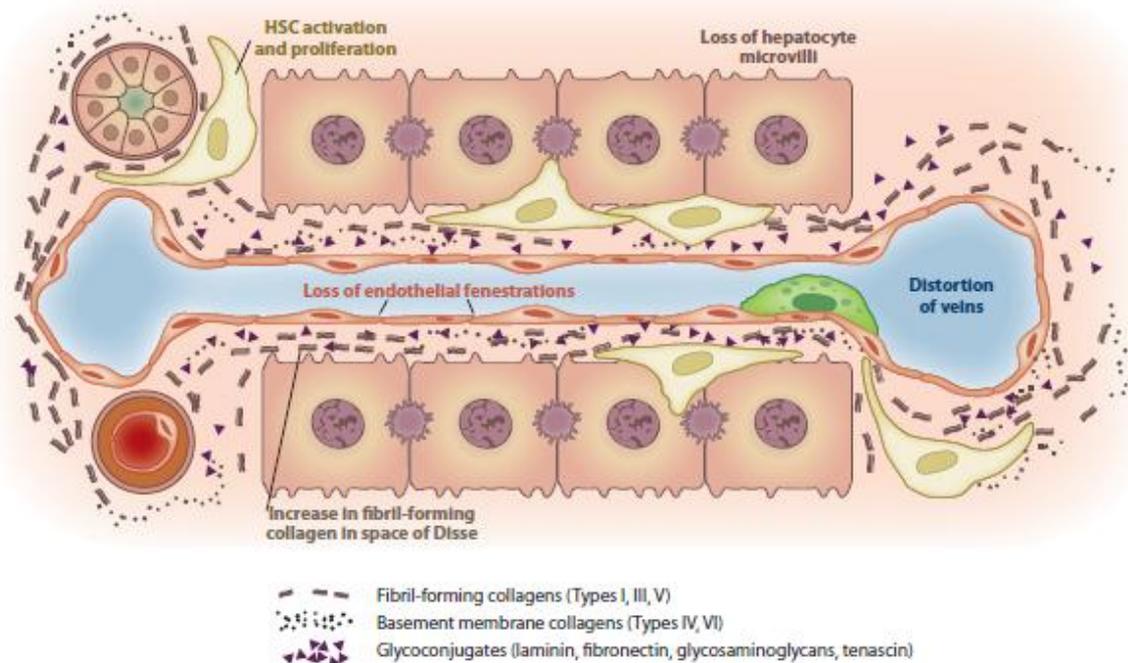


Figura 7. Alteración celular de la matriz extracelular durante la fibrosis hepática. A) El tejido hepático normal contiene hepatocitos y células no parenquimatosas: endotelio sinusoidal fenestrado, células estrelladas hepáticas (HSC) y células de Kupffer (KCS). B) Tras la lesión, las HSC se activan y secretan grandes cantidades de matriz extracelular (ECM) en el espacio de Disse, que resulta en el engrosamiento progresivo de los septos, pérdida de fenestraciones endoteliales y microvellosidades hepáticas, deterioro de intercambio metabólico bidireccional normal entre el flujo portal y venoso, y el desarrollo de hipertensión portal.³¹

6.3.4. Evaluación del daño hepático por fibrosis. Escala METAVIR

La biopsia hepática en la actualidad se considera como el estándar de oro para el diagnóstico de diversas patologías que afecten al hígado (hepatitis C, fibrosis, cirrosis, etc.). Sin embargo, el valor de una biopsia depende de la posibilidad de evaluar características histológicas usando una clasificación reproducible estandarizada.^{38,39}

Con el descubrimiento del virus de la hepatitis C y su difusión por todo el mundo, los patólogos se enfrentaron a un creciente número de biopsias de hígado que presentaban esta patología. Este fenómeno puso de manifiesto la necesidad de crear una terminología y clasificación histológica estandarizada de hepatitis C. En 1996 se llevó a cabo un estudio para proponer y aprobar la exactitud de un simple algoritmo que generaba una actividad de puntuación única basada en la fibrosis hepática. El nombre adoptado fue: Escala METAVIR. Para probarla, se reunieron 10 destacados patólogos de Francia y con base en su experiencia evaluaron de manera independiente 363 muestras histológicas de hígado de pacientes con Hepatitis C crónica, obteniendo una gran similitud en sus resultados.⁴⁰

Hoy en día es una escala mundialmente utilizada por su simplicidad, reproducibilidad y su fácil aplicación a un gran número de muestras hepáticas.

La escala METAVIR abarca 5 estadios, que se describen a continuación y son ilustrados en la Figura 8.⁴¹

F0= Hígado sano (ausencia de fibrosis).

F1= Fibrosis portal, sin presencia de septos.

F2 = Fibrosis portal con presencia de septos incipientes y/o pocos septos.

F3= Fibrosis portal, con presencia nódulos incompletos

F4 = Fibrosis portal, acompañada de nódulos bien definidos⁴²

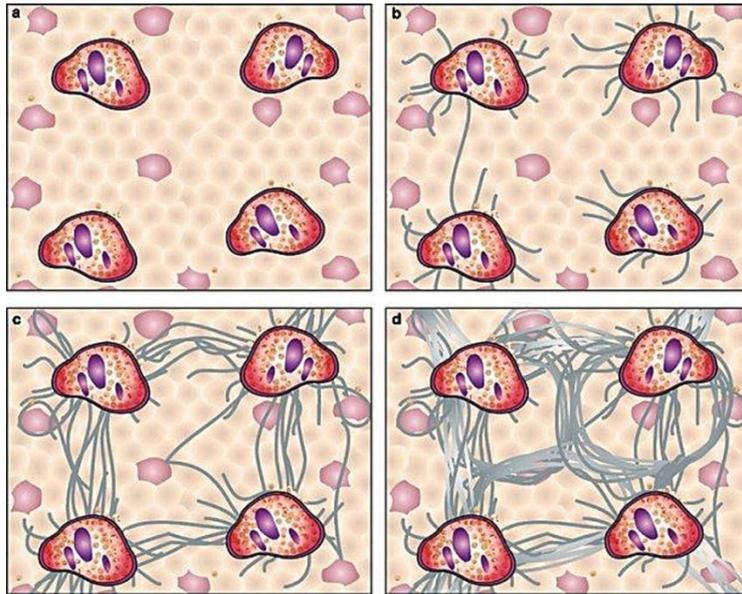


Figura 8. Clasificación de la fibrosis, de acuerdo a la escala de METAVIR: a) F1: sin presencia de septos b) F2: poca cantidad de sepros c) F3: inicio de nódulos incipientes d) F4: presencia de nódulos definidos. ⁴¹

6.4. Inducción de fibrosis hepática con Tetracloruro de carbono (CCl₄)

El uso de muchos alcanos halogenados tales como tetracloruro de carbono (CCl₄), cloroformo (CHCl₃) o yodoformo (CHI₃), han sido prohibidos o rigurosamente restringidos en actividades industriales y comerciales debido a su toxicidad. Sin embargo, el CCl₄ hoy en día se utiliza, de manera experimental debido a que sirve como una sustancia modelo para entender los mecanismos de acción hepatotóxicos; efectos tales como la degradación de grasa, fibrosis, muerte hepatocelular, y carcinogenicidad; y es un halogenado estudiado desde hace muchos años. El daño inducido por CCl₄ depende de la dosis y la duración de la exposición, abarcando una variedad de efectos tóxicos. ^{13,43}

El CCl₄ es metabolizado por el citocromo (CYP) 2E1, CYP2B1 o CYP2B2, y posiblemente CYP3A, para formar el radical triclorometilo, (CCl₃). Este radical puede unirse a moléculas celulares (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos), afectando procesos importantes tales como el metabolismo de lípidos, con el resultado potencial de acumulación grasa (esteatosis). ⁴⁴

La intoxicación con CCl₄ también conduce a la hipometilación de los componentes celulares; en el caso de RNA el resultado se cree que es la

inhibición de la síntesis de proteínas y en el caso de los fosfolípidos afecta el papel que desempeñan en la inhibición de la secreción de lipoproteínas.^{19,27}

A nivel molecular, el CCl₄ activa la transcripción del TNF- α , TGF- β y la NO sintasa inducible en la célula, procesos que parecen dirigir a la célula principalmente hacia su destrucción (necrosis) o apoptosis⁴³ induciendo así una necrosis centro lobulillar aguda que desencadena una respuesta de reparación de heridas (reclutamiento de células fagocíticas e inflamatorias para eliminar zonas necróticas, activación de la fibrogénesis y aumento de MEC, proliferación de células parenquimatosas y no parenquimales para reemplazar células dañadas o crear un efecto de hipertrofia). Cuando se repite el insulto, se producen ciclos sucesivos de cicatrización de heridas antes de la resolución anterior, dando como resultado la acumulación de fibrosis. A nivel histológico, la fibrosis se desarrolla progresivamente (a partir de la primera administración) dando una fibrosis visible después de 2 a 4 semanas, fibrosis de puente después de 5-7 semanas, y cirrosis de 10 a 15 semanas de administración, apareciendo progresivamente una fibrosis peri-celular, hipertensión portal y ascitis. El tiempo para esas lesiones variará dependiendo de la especie, cepa, dosis, ruta y frecuencia de administración.^{19,27}

A dosis bajas los efectos transitorios prevalecen, como el secuestro de Ca⁺², alteración de la homeostasis de los lípidos, la liberación de citocinas nocivas y eventos apoptóticos, seguido de la regeneración hepática. Otros efectos con exposiciones altas o largas, son graves y permanentes, tales como la degeneración de grasa, fibrosis, cirrosis, e incluso cáncer. Cuando el daño hepático excede la capacidad regenerativa puede darse lugar a cáncer⁴⁴

6.5. Regeneración hepática

La regeneración hepática representa una de las formas más extraordinarias de respuesta al daño tisular, siendo un proceso muy complejo y estrictamente regulado. La rápida restauración del volumen y de la función hepática posterior a una hepatectomía mayor al 70 %, así como su estricta regulación en el inicio y final de la regeneración, es una propiedad exclusiva de este órgano.⁵

Se ha estudiado en múltiples modelos experimentales; desde cultivos celulares, a modelos “*in vivo*” de hepatopatía inducidos por tóxicos (siendo el CCl₄ el principal), productos bacterianos (LPS), virus, y en modelos quirúrgicos como la hepatectomía del 70 %, o el trasplante hepático parcial. También se ha estudiado en animales modificados genéticamente en los que se ha sobre-expresado un gen (knock-in) o en animales knock out (KO) en los que se ha inducido la delección específica o condicional de un gen.^{20,45} Otros autores han realizado estudios transcripcionales analizando la expresión de miles de genes, tratando de obtener un patrón representativo de la regeneración.^{46,47,48} En la Tabla 1⁹ se muestran estudios analizando la expresión de genes, tratando de obtener un patrón representativo de la regeneración evidenciando las moléculas que juegan un papel importante durante el inicio de la regeneración, tal como el TNF- α esencial para iniciar el ciclo celular en las células hepáticas, participar en diversas funciones como la inflamación la proliferación y el cese de la misma mediante la participación de TGF- β , mismo que también se encuentra involucrado en diferentes ceses de regeneración donde se ve involucrada la inflamación y por consecuente algún daño.⁴⁵ La sobre expresión o anulación de un gen ha sido de gran utilidad para el entendimiento de las funciones a del organismo para obtener resultados más claros y concisos sobre lo que se desea.⁴⁵

De los modelos referidos, destacan los que evalúan la restauración del volumen hepático, la función hepática y la supervivencia de los animales. El modelo más utilizado es la hepatectomía del 70 % en roedores, ya que representa el mayor estímulo de regeneración y garantiza la respuesta sincrónica y homogénea del hígado remanente sin causar la muerte al animal.

45

Tabla 1. Modelo de regeneración hepática en animales modificados genéticamente⁹

Gen modificado	Hallazgos referidos
Fase inicial	
Interleucina-6 (IL-6)	Necrosis hepática. Alteración en la regeneración severa. Papel IL-6 en fase G0
STAT3	Reducción síntesis de DNA. Alteraciones en la regulación del ciclo
TNF- α	Estímulo para la transición G0 a G1 del ciclo
Gp 130	Alteración en la RH tras la administración de LPS
IKK2	Delección del inhibidor IKK2. Induce la respuesta innata y la proliferación de hepatocitos
Complemento C3a/C5a	Factores del complemento son cruciales en las fases iniciales de la RH
Farnesoid X receptor (FXR)	Ratones deficientes en FXR sufren un retraso en la RH y aumento en la mortalidad
Fase proliferación	
C-met	HGF y receptor MET son esenciales en la entrada del ciclo tras una HP
FosM1b	Sobreexpresión estimula entrada en la mitosis de hepatocitos
EGF	Aumento mortalidad tras HP. Demora en la división de hepatocitos en ratones KO
ILK inhibidora	Ratones KO aumento de la proliferación y hepatomegalia
TGF- α	La sobreexpresión desarrolla hepatomegalia. Aumento de síntesis de ADN
Fase cese y regulación	
TGF- β	Animales transgénicos sufren demora en proliferación celular
TGF- β R2	Ratones KO muestran síntesis precoz de DNA
p53	Ratones KO desarrollan alto grado de ploidía. p53 regula las tres fases de la RH

En condiciones basales los hepatocitos permanecen en estado "quiescente" o fase G0 (G cero) del ciclo celular, pero a diferencia de otras células, tienen la capacidad de entrar al ciclo celular de ser requerido. Este proceso de proliferación es muy rápido que se inicia en segundos y termina en pocos días.⁹

6.5.1. Métodos Experimentales que evalúan la regeneración hepática

Hay dos formas principales en que se lleva a cabo la regeneración hepática:

- 1) Por incremento de número (Hiperplasia) y/o tamaño (hipertrofia) de las células maduras preexistentes (Hepatocitos). Se ha descrito que tras una hepatectomía del 70 % se da una "hiperplasia compensatoria", donde los hepatocitos duplican su tamaño celular en las primeras 24

horas y se dividen 1,5 veces, mientras que tras una hepatectomía menor ($\leq 30\%$), el hígado remanente aumenta de tamaño celular en 1,4 veces; sin acompañarse de división celular.

- 2) Por activación y proliferación de células progenitoras del hígado (LPC) activadas mediante diversas señales y factores de crecimiento, lo que lleva a la recuperación funcional y estructural del órgano.^{2,11}

La participación de una, otra o ambas formas depende del mecanismo de daño hepático. Si dicho daño compromete la capacidad mitótica de los hepatocitos, la regeneración no podrá llevarse a cabo mediante hipertrofia ni hiperplasia, y el hígado recurrirá a la vía de las LPC ²

6.5.2. Características de la regeneración hepática

Algunas características de la regeneración hepática son:

- Se inicia con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) o de los patrones moleculares asociados al daño celular (DAMP, por sus siglas en inglés); generando una activación de la respuesta inmune innata. Observándose en la Figura 9. ^{9,49}
- Es un proceso muy rápido que se inicia en segundos y termina en pocos días (5,7 días) con la restauración del volumen hepático, y en el que intervienen mecanismos de señalización autocrinos, paracrinos y endocrinos, los genes responsables de la proliferación celular, la morfogénesis y la “zonalización” hepática.^{5,50}
- En ella se reproducen las fases del ciclo celular, lo que ha suscitado un gran interés en conocer la expresión génica, los mecanismos de regulación y su traslación a otras situaciones, como el cáncer.⁵¹ La división celular se observa raramente en hepatocitos en el hígado normal del adulto, ya que estas células están en la fase G0 del ciclo celular. Sin embargo, tras una hepatectomía del 70 %; el 95 % de los hepatocitos pasan en 4 horas de la fase G0 a la fase G1 del ciclo celular; al término de la cual existe el punto crítico de control, llamado de restricción (“R”), que determina si las células se dividen de forma irreversible. ⁴⁷

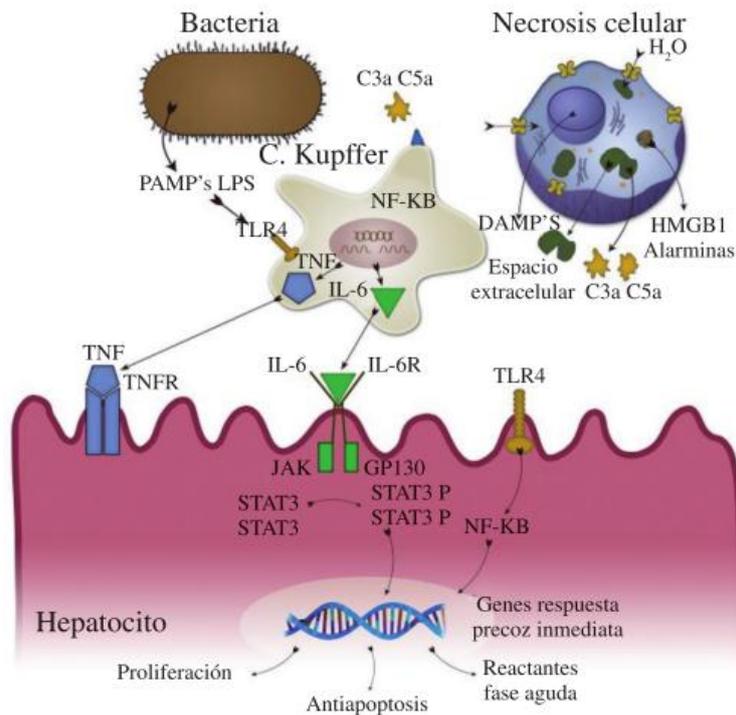


Figura 9. Representación de la fase inicial de “purgado” de los hepatocitos, mediada por la activación del sistema inmune innato, por PAMP o DAMP. LPS: lipopolisacárido. C3a, C5a: fragmentos proteolíticos de las proteínas C3 y C5 del complemento. HMGB1: proteínas de alta movilidad del grupo de caja 1. TLR4: receptores tipo toll-4. IL-6: interleucina 6. TNF: factor de necrosis tumoral. IL-6R: receptor de la IL-6. JAK: cinasa tipo Janus. GP130: glicoproteína 130 receptor de IL-6. NF-K β : factor de transcripción nuclear Kappa- β . STAT-3: activador de la transcripción y transductor de la señal 3. TNF-R: receptores del factor de necrosis tumoral).^{9,49}

- En el hígado de rata, la velocidad de síntesis de ADN de los hepatocitos comienza a aumentar después de aproximadamente 12-16 horas, ocurriendo un incremento en la síntesis de ADN en la fase de Síntesis a las 24 en la región periportal (Zona 1), continuando en la región pericentral (Zona 3) después de 36-48 h.^{7,52,44,53}. Sin embargo, la inducción de la síntesis de ADN se produce más tarde en las células no parenquimatosas; a las 48 hrs. en células de Kupffer, mientras que las células estelares y del epitelio biliar tienen su fase de síntesis a las 48 horas proliferando de forma más lenta. Las células endoteliales inician su proliferación a los 3 días, expresando un pico a los 5 días de la hepatectomía ilustrándose en la Figura 10⁹. Los niveles subsiguientes de síntesis de ADN en los hepatocitos son más bajos, ya que la restauración completa de la masa hepática requiere un promedio de 1.6 ciclos de replicación en todas las células. A diferencia en la síntesis de ADN en los

ratones, que se produce más tarde; 36-40 horas después de la hepatectomía parcial, variando entre cepas.^{7,9,44}

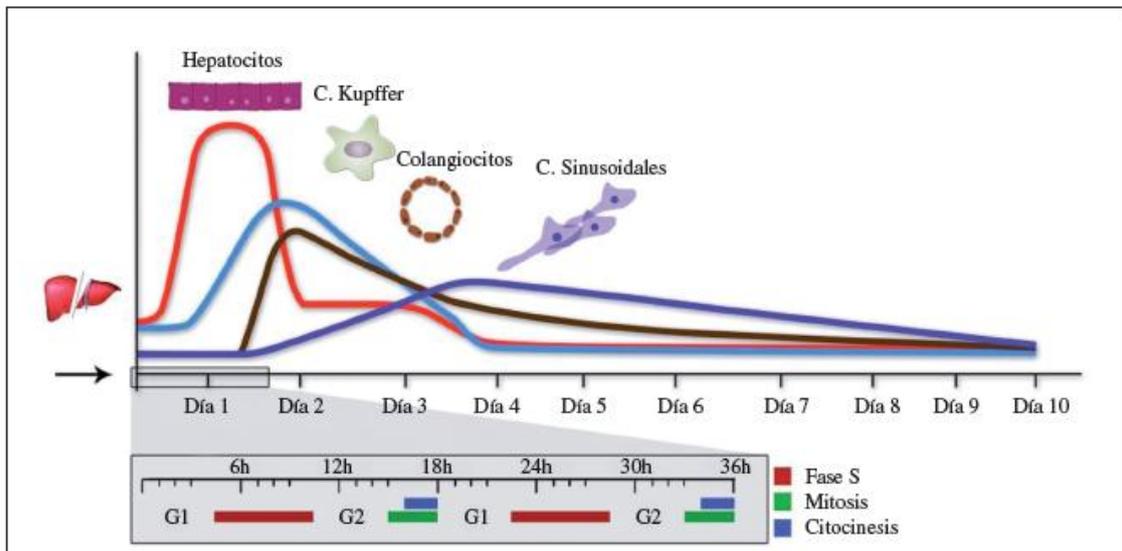


Figura 10. Representación esquemática del patrón replicativo secuencial de células epiteliales hepatocitos, colangiocitos y mesenquimales tras una hepatectomía.^{9,7}

- La capacidad regenerativa del hígado es enorme. Se han descrito hasta siete hepatectomías del 50 % consecutivas en la rata, sin provocar insuficiencia hepática ni disminuir su potencial regenerativo.^{9,7}
- La inflamación juega un papel esencial controlando los procesos regenerativos a través de varias citocinas y factores de crecimiento. Las células mesenquimales, especialmente los macrófagos, una vez activadas por los DAMP, sintetizan citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β ; el TNF- α , la IL-6, el interferón-gamma (IFN- γ) y prostaglandinas con funciones proliferativas y anti apoptóticas²⁴
- Una de las primeras citocinas implicadas en la reparación tisular es la IL-6, que promueve la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial o lesión inducida por CCl₄. El TNF inhibe la muerte celular apoptótica mediante la activación de NF- κ B. La activación de NF- κ B también inhibe la necrosis, y aumenta la expresión de TNF e IL-6 estimulando fuertemente la regeneración hepática, incluso después de una hepatectomía al 90%. Otra citocina regenerativa importante es IL-22, un miembro de la familia IL-10, es producida por linfocitos, especialmente por células T cooperadoras 17 (TH

17) y células linfoides innatas (iLCs), y por ciertos subconjuntos mieloides, pero a diferencia de la mayoría de las citocinas, no se dirige a otros leucocitos. En su lugar, actúa sobre células epiteliales y fibroblastos para estimular la proliferación, inhibir la muerte y retrasar la diferenciación terminal. La acción de IL-22 se dedica principalmente al control inmune de la reparación tisular.¹²²⁴ En la tabla 2²³ se ilustran de forma resumida las principales citocinas en la reregeneración²⁴

Tabla 2: Principales citocinas inductoras de la regeneración hepática y sus fuentes.²³

Citocinas	Fuente
TNF	Linfocitos T, macrófagos y células epiteliales
IL-6	Linfocitos, células mieloides, fibroblastos y células epiteliales
IL-22	Células T _H 17, iLCs y algunas células mieloides
IL-17	Células T _H 17 y iLCs.

- El HGF también destaca al tener actividad mitogénica sobre los hepatocitos y la mayor parte de las células epiteliales. Se produce en forma inactiva como una cadena única (pro-HGF) por fibroblastos, células mesenquimales, células endoteliales y células del hígado (excepto parénquima) y se almacena como forma precursora pro-HGF en la matriz extracelular (MEC). Se activa por serin proteasas liberadas en los tejidos dañados y su receptor es c-MET que se encuentra en los hepatocitos

Tras una lesión hepática aguda se produce un aumento brusco de 10 a 20 veces del HGF plasmático; Dicha elevación se debe a la liberación del HGF almacenado en la MEC a la síntesis de HGF por los macrófagos estimulados por la IL-6 y TNF- α .

- El factor de crecimiento transformante beta 1, (TGF- β 1) es una proteína relacionada con el desarrollo y la cicatrización hepática. Es una proteína que lleva a cabo diversas funciones en la célula, como el control del crecimiento, proliferación, procesos de diferenciación y apoptosis. Se regula positivamente durante la regeneración hepática en respuesta a la señalización de HGF y factor de crecimiento epidérmico (EGF) Este aumento de TGF- β es contrarrestado por una disminución en los receptores

de TGF- β en los hepatocitos durante las primeras 48 horas después de la hepatectomía parcial, permitiendo una rápida proliferación. Tiene un papel en la formación de la matriz extracelular y en las redes sinusoidales en el proceso de regeneración y al restablecerse la matriz extracelular posterior a un daño, se une a HGF, inhibiendo la proliferación celular e induciendo el cese de la regeneración (en la rata a los 5-7 días, y tres semanas en el cerdo).^{9,54}

En la actualidad, existen diversas teorías sobre el tipo y localización de células involucradas en la regeneración hepática mostradas en la Figura 10.⁵⁵

Los Hepatocitos híbridos (HybHP). Se denominan de esta forma por presentar una baja expresión del gen Sox 9 y cantidades normales del Factor nuclear de hepatocitos (HNF4). El gen SOX9 proporciona instrucciones para hacer una proteína que desempeña un papel crítico durante el desarrollo embrionario. Esta proteína se une a regiones específicas del ADN y regula la actividad de otros genes. Sobre la base de esta acción, la proteína SOX9 se conoce como un factor de transcripción.⁵⁶

Los hepatocitos HybHP son una subpoblación de hepatocitos periportales que están presentes en el hígado sano y que experimentan una proliferación extensa y reponen la masa hepática posterior a lesiones crónicas que agotan los hepatocitos debido a que expresan genes metabolizadores de drogas; propiedad que los protege de una lesión tóxica y reduce la probabilidad que den lugar a cáncer, a pesar de su alto potencial proliferativo. Los HybHP aislados han mostrado una capacidad única para restaurar la función hepática tras ser trasplantadas en un hígado enfermo, lo que subraya su potencial terapéutico.^{57,58}

En múltiples estudios se ha demostrado que Las células ovals actúan como progenitoras facultativas y se diferencian en hepatocitos y células biliares durante el proceso de la regeneración hepática, dependiendo del tipo de la lesión ocurrida.^{57,58}

Los hepatocitos que expresan el gen Lgr5 (repeticiones ricas en leucina contenidas en la proteína G, acopladas al receptor 5) ayudan a marcar la división activa de células madre en tejidos auto-renovables conducidos por señales Wnt^{57,58}

Y por último los propios hepatocitos los cuales se encuentran en fase G0 en circunstancias normales y entran a ciclo celular posterior a un daño (como se ha mencionado anteriormente). Apareciendo todas estas células en la Figura 11.^{57,58}

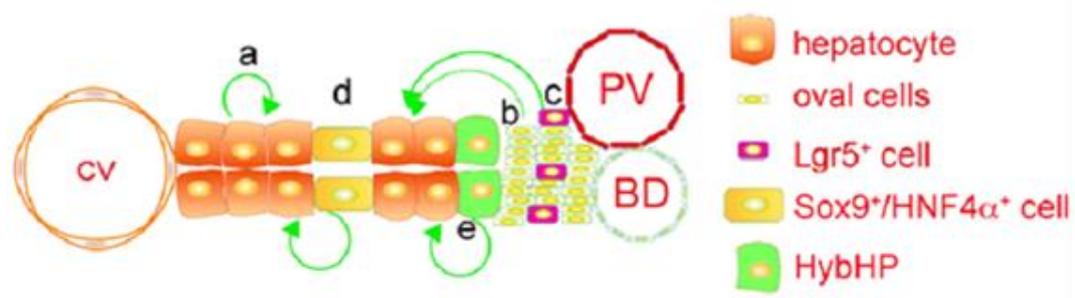


Figura 11. Propuesta de células involucradas en la regeneración hepática durante lesiones hepáticas. a) La regeneración del hígado podría lograrse mediante la proliferación de hepatocitos terminalmente diferenciados. b) Las células ovales pueden participar en la regeneración hepática durante lesiones hepáticas. c) las células Lgr5-positivas contribuyen a la restauración de la masa hepática, aunque en un porcentaje bajo. d) las células hepáticas positivas al Sox9 emergen después de una lesión hepática y generan nuevos hepatocitos. e) las células HybHP Sox9-low contribuyen a la restauración de la masa hepática en lesiones hepáticas crónicas. Estos datos se ajustan a un modelo de múltiples niveles de células progenitoras en hígados lesionados.^{57,58} Abreviaturas: CV) vena central; PV) vena porta; BD) conducto biliar.^{57,58}

La regeneración termina con la restauración de la masa hepática inicial necesaria para realizar las funciones hepáticas. La regulación estricta de dicho índice es una de las propiedades más destacables ya que representa un control estricto del cese del ciclo celular y una remodelación del tejido neoformado,⁸

El cese de la regeneración se ha relacionado con citocinas antiinflamatorias, pro-apoptóticas y con factores “hepatostáticos” como la IL-10 y especialmente el TGF- β .^{7,59,60}

6.5.3 PCNA

La evaluación experimental de la proliferación celular en tejidos de animales es esencial para estudios de toxicología, carcinogénesis y también para evaluar la eficacia de fármacos citotóxicos. Por muchos años, el método más común para identificar las células proliferantes en secciones de tejido ha

sido la detección inmunohistoquímica de PCNA también llamada ciclina, inicialmente descrito por Miyachi y col. en 1978.⁶ cuantificándose en líneas celulares y en esplenocitos de ratón in vitro, inducidos a proliferar con mitógenos.⁶¹ Ha sido ampliamente utilizado para la investigación básica y como herramienta pronóstica en la patología quirúrgica.^{6,61}

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es una proteína sintetizada a nivel nuclear y que expresa picos en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular, mientras que para la fase G2 y M disminuye. Esta proteína se localiza en el núcleo y favorece la síntesis de ADN, ya que es un cofactor de la ADN polimerasa delta. Cuando existen daños en el ADN, la proteína PCNA se reubica y participa en la vía de reparación del ADN dependiente de RAD6.⁶

El antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA) tiene un papel central en la promoción de la replicación del ADN, proporciona una plataforma molecular que facilita interacciones proteína-proteína y proteína-ADN que se producen en la bifurcación de replicación. Numerosas proteínas asociadas a PCNA compiten por la unión a una superficie común en PCNA; por lo tanto, estas interacciones necesitan ser estrictamente reguladas y coordinadas para asegurar la correcta replicación e integridad. Este marco regulador permite a las células mantener un equilibrio fino entre la fidelidad de replicación y la progresividad en respuesta al daño del ADN.^{6,61}

7. Tipo y diseño del estudio

Este trabajo es de tipo experimental, prospectivo, ya que se intervino con una maniobra controlada, y se observaron sus efectos y resultados en el tiempo siguiente.

7.1. Criterios de inclusión

Ratas Wistar jóvenes sanas, de 8-10 semanas de edad y de entre 250 y 300g de peso.

7.2. Criterios de exclusión

Ratas de diferente cepa a la Wistar, ratas mayores o menores a 10 semanas de edad, procedencia desconocida (biotério ajeno al usado habitualmente).

7.3. Criterios de eliminación

Manifestaciones clínicas de enfermedad e infecciones.

8. Metodología

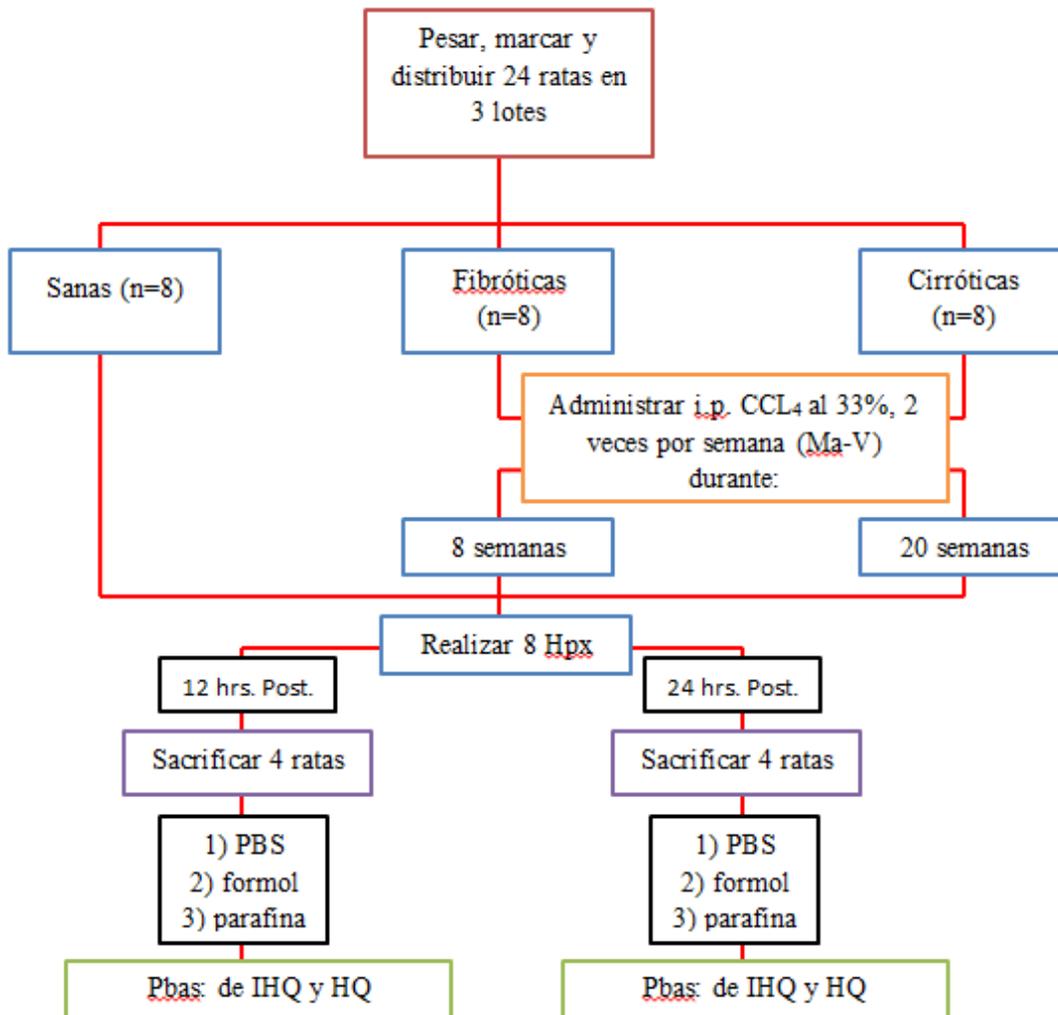


Figura 13. Metodología resumida

8.1. Materiales

Para el desarrollo experimental de este trabajo se emplearon los materiales mostrados en la Tabla 3, siguiendo cuidadosamente las indicaciones y sugerencias de uso de los fabricantes.

Tabla 3. Materiales utilizados en el desarrollo experimental

Materiales quirúrgicos	Materiales de recolección	Tinciones	Anticuerpo
Xilazina Ketamina Agujas Suturas de nylon Suturas de seda Ketoprofeno	PBS Formol Parafina Agua Destilada	Hematoxilina Eosina (H.E.) Tricómica de <i>Masson</i> (T.M.)	PCNA

8.2. Inducción de la cirrosis hepática

Se administró a cada rata, por vía intra-peritoneal, una dosis 1:1 en relación a su peso de CCl_4 al 33% disuelto en aceite de oliva, este actúa como vehículo, a una concentración de $0.25 \mu\text{M}$. Éste suministro se realizó en los grupos de ratas seleccionados como fibróticos y cirróticos, por 8 y 20 semanas, respectivamente. Cada semana la dosis se ajustó conforme la ganancia de peso.

Ejemplo: Si la rata pesó 320 [g] se le administraron 320 μL de CCL_4 al 33% en aceite de oliva.

8.3. Hepatectomías Parciales (Hpx)

Para la realización de las hepatectomías parciales se usó como base el modelo propuesto por Anderson y Higgins en 1931. Es decir, se indujeron los diferentes estadios de la enfermedad, de la forma descrita en el punto previo. Al llegar a la semana establecida de inducción, las ratas se someten a cirugía, la cual se realizó conforme al siguiente procedimiento:

- Se anestesió la rata con 0.8 ml de Xilazina/Ketamina 1:1.
- Una vez alcanzado el plano quirúrgico de anestesia, se colocó a la rata en posición decúbito dorsal y sujetando sus extremidades con hilo a una tabla de cirugía.
- Se rasuró la piel de la pared abdominal, embrocando con yodopividona la parte rasurada. Se preparó un campo operatorio
- Se le realizó una incisión de aproximadamente 3 cm paralela a la línea media, cerca de 1 cm a la derecha, bajo el borde costal de. Se realizó disección por planos para acceder a la cavidad abdominal.

- Una vez visualizado - el hígado, se protruyó presionando con delicadeza la pared abdominal de la rata con los dedos hasta exponerlo.
- Utilizando sutura de seda calibre 2-0, se realizó una ligadura al lóbulo medial izquierdo (LML) (porción izquierda del lóbulo medial), evitando ligar el medial derecho (RML) por su fácil accesibilidad quirúrgica, para una evaluación de la regeneración más óptima al estar anexada al RML y su tamaño de gran representación de masa.
- Se cortó la parte externa del lóbulo a 1 cm de distancia del nudo realizado en el punto anterior.
- Con una sutura de Ácido Poliglicólico calibre 3-0 se procede a suturar la capa muscular, por medio de puntos de sutura tipo Sarnoff continuos.
- Con sutura de Nylon calibre 3-0 se realiza sutura con puntos separados en la piel.
- Se administran 100 µl vía peritoneal de Ketoprofeno (Analgésico), para una mejor recuperación de la rata.
- Finalmente, se coloca a la rata en una caja de bioterio individual con aserrín y una lámpara como fuente de calor para favorecer la recuperación.
- Todos los cortes se realizaron al lóbulo LML, obteniendo un promedio del 18-20 % del total del hígado
- La rata se mantuvo en observación constante posterior a la cirugía
- El lóbulo cortado se lava en un buffer de fosfato salino (PBS) y se recolecta en formol al 3.8%.

La razón por la cual se usa seda, a pesar de no ser muy recomendable debido a su mala absorción para la ligadura del hígado a retirar es que permite una mayor tracción y por lo tanto más seguridad en su función hemostática.

Ejemplificando los pasos anteriores, se muestra la Figura 12.

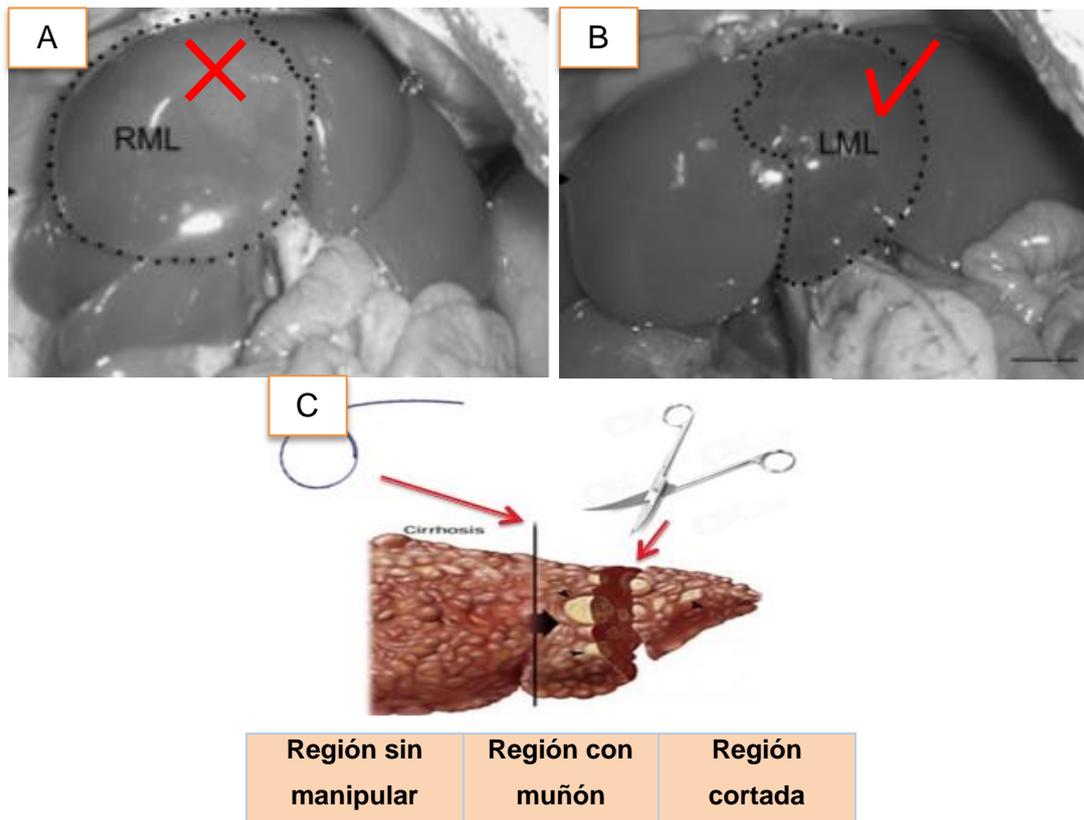


Figura 12. Visualización quirúrgica del hígado A) vista del hígado completo haciendo énfasis en la porción derecha del lóbulo medial B) Porción izquierda del lóbulo medial que se cortó en todas las ratas C) Ejemplo de la forma en que se realizó la maniobra, dejando 1 cm. entre la ligadura y el corte aprox.

8.4. Sacrificios

Al tener 8 ratas por grupo, se sacrificaron 4 de ellas a las 12 hrs. y otras 4 a las 24 hrs, posterior a la hepatectomía con 1 a 3 ml de Pentobarbital Sódico en función del peso.

- Una vez que el animal cae en paro respiratorio, se cortan las suturas, se accede a la cavidad abdominal y se extrae el hígado
- Los hígados obtenidos se enjuagaron en PBS y almacenaron en Formol al 3.8% por 48 hrs
- Se depositó una porción del hígado colectado en parafina y se realizaron cortes para tinciones de Hematoxilina Eosina (H.E) y Tricómica de Masson (T.M.) y cortes en blanco de cada muestra de hígado para Inmunohistoquímica

En la Figura 13 se resume la metodología de inducción de fibrosis.

Los grupos fueron separados en cajas de acrílico para bioterio, asegurando así que reciban las mismas condiciones de alimentación y sobrevivencia.^{62,44} Los animales permanecieron controlados y monitoreados en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental (UME), del Hospital General de México tratando de reducir al mínimo las variables que pudieran interceder en el trabajo.

8.5. Evaluación de la progresión de la fibrosis

Se realizaron cortes histológicos de las muestras, se tiñeron con T.M. y se evaluaron por un experto, con base en la escala METAVIR. En la Tabla 4 se muestra el proceso de agrupación de las muestras una vez realizada la evaluación, de manera que aquellas muestras calificadas como F0 y F1 se asignaron en el grupo “sano”, F2 y F3 en “fibrosis” y F4 en “cirrosis”.

Tabla 4. Clasificación de grupos de trabajo según escala Metavir

<i>Evaluación según escala METAVIR</i>	<i>Grupo asignado</i>
F0	Sano
F1	Sano
F2	Fibrosis
F3	Fibrosis
F4	Cirrosis

8.6. Inmunohistoquímica

Los cortes en blanco (solamente parafinizados) se utilizaron para probar el PCNA en los 3 grupos. Siguiendo la metodología descrita a continuación.

8.6.1. Desparafinación:

- Las laminillas a utilizar se calientan en horno a 60 C° durante 45 minutos.
- Se pasan a un vaso Koplín, y se les hacen 2 lavados con Xilol de 25 min. cada uno con agitación constante.

- Se realizan 4 enjuagues con agua de la llave con agitación constante.
- Por último, se hacen 3 lavados con agua destilada con agitación constante.

8.6.2. Protocolo de tinción

- Se prepara una cámara oscura para colocar los portaobjetos con el tejido y agregarle los reactivos.
- Se agrega la solución de bloqueo y se incuba por 10 minutos.
- Se drena la solución
- Se agrega el Anticuerpo Primario de Anti-PCNA de ratón Biotinilado y se incuba por 50-60 minutos en cámara húmeda.
- Se enjuaga con PBS (2 minutos, 3 veces)
- Se agrega Streptavidina – Peroxidasa y se incuba por 10 minutos
- Se enjuaga con PBS (2 minutos, 3 veces)
- Se agrega el Cromógeno DAB protegiéndolo de la luz y se incuba por 2-5 minutos
- Se agrega Hematoxilina y se incuba por 1-2 minutos.
- Se lava el portaobjetos en agua corriente.
- Se ponen los porta objetos en PBS hasta que en los cortes aparezca el azul (aproximadamente 40-60 segundos)
- Se enjuaga en agua destilada.
- Se rehidratan los porta objetos en una serie de alcoholes graduales
- Se agregan 2 gotas de medio de montaje HISTOMUNT® y se coloca un cubreobjetos.

8.7. Microfotografía óptica

Todas las laminillas fueron observadas en un microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TE2000E ®. Las imágenes fueron procesadas digitalmente con el paquete NIS-Elements F Versión 2.2 ®. Evaluadas con el programa Image J1.50i de National Institutes of Health 2015 para determinar la cantidad de fibrosis en cada imagen.

8.8. Definición de variables

Las variables utilizadas para este estudio, su descripción y el tipo de análisis estadístico aplicado en cada una de ellas se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Definición de las variables definidas en el estudio.

Variable	Tipo	Definición Operacional	Unidad de medida	Análisis estadístico
Fibrosis en el tejido hepático	Cualitativa Ordinal Dependiente	METAVIR	Escala METAVIR 0-4	Descriptivo
Cuantificación de matriz extracelular	Cuantitativa Continua Dependiente	Área de la imagen	Área en porcentaje	ANOVA
Cuantificación de PCNA	Cuantitativa Continua Dependiente	Determinación de área de la imagen	Área en porcentaje	T de student ANOVA

8.9. Análisis Estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS, versión 21 *IBM Corporation 2012*® y la hoja de cálculo electrónica *Microsoft Excel 2007*.

Para la determinación de fibrosis en el tejido hepático, la variable asociada “METAVIR” es de tipo cualitativa, por lo que se realizó únicamente un análisis descriptivo.

Las variables contrastadas entre grupos para la cuantificación de matriz extracelular y cuantificación de PCNA, “Porcentaje de fibrosis” y “Área Total”, respectivamente, son de naturaleza cuantitativa continua. Para el análisis de ambas variables se usaron dos sub-agrupaciones, en la primera de ellas se define como factor de agrupación el estado de salud de cada individuo, que clasifica en tres grupos de trabajo: sanos, enfermos y cirróticos (Tabla 4); en la segunda se utiliza el tiempo posterior a la hepatectomía que clasifica en dos grupos: 12 y 24 horas. Para probar que estos datos siguieran una distribución normal se usó la prueba de *Kolmogorov Smirnov (KS)* en cada sub-agrupación propuesta. Para realizar una comparación entre grupos, se recurrió a la prueba t de Student o ANOVA, como el caso lo requiriera. Posteriormente se usó el estadístico de *Levene* para averiguar si existe homogeneidad de varianza entre los grupos y determinar el post-hoc adecuado.

Se utilizó el programa GraphPad PRISM Version 7.02, Graph Pad Sotmer.INc 2016 ®.

9. Resultados

El primer objetivo fue inducir los diferentes grados de fibrosis en ratas (sanas, intermedias y cirróticas) con CCl_4 conforme a los pasos descritos en el epígrafe 8.2. Una vez concluido el tiempo de inducción para cada grupo (8 y 20 semanas), se encontró que el grupo de ratas sanas (sin tratamiento alguno) no mostraron alteración física aparente ni cambios en su conducta; las ratas del grupo intermedio mostraron un comportamiento letárgico y una leve pérdida de brillo en su pelaje, mientras que el grupo de ratas cirróticas mostraron una pérdida de peso en comparación con las sanas, pelo erizado y sin brillo, estas son características típicas de anomalías en el estado de salud de la especie

Los hígados macroscópicamente mostraron diferencias más evidentes entre grupos al realizar las cirugías y sacrificios, como se observa en la figura 14. La figura 14A corresponde a un hígado sano con superficie lisa, sin lesiones aparentes y de color rojo brillante, la figura 14B muestra un hígado del grupo fibrótico donde se aprecia una textura más rugosa, cambio de coloración a café y pérdida de brillo, y finalmente en la figura 14C el hígado, correspondiente al grupo cirrótico, se visualiza con una textura totalmente rugosa, presencia de adherencias y una apariencia más opaca comparada con el hígado del grupo sano, y un color café más claro respecto al grupo intermedio.

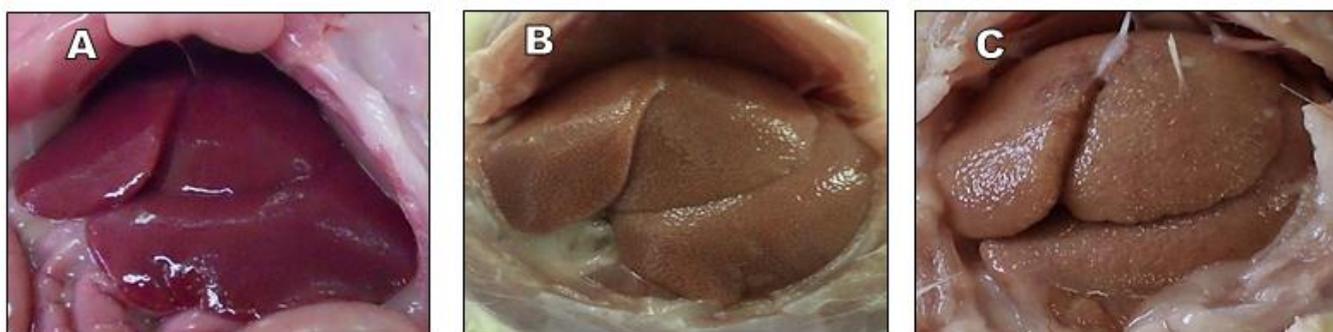


Figura 14: Hígados expuestos previos a la Hepatectomía parcial. A) Rata del grupo sano B) Hígado Fibrótico C) Hígado cirrótico

El segundo objetivo fue realizar las hepatectomías parciales en los diferentes grupos de fibrosis posterior al tiempo de inducción con CCl₄ IP establecido para cada grupo; las ratas se sometieron a la cirugía conforme al procedimiento descrito en la metodología del epígrafe 8.3. Al término de las inducciones y posterior a las hepatectomías el número de ratas se alteró, las agrupaciones se resumen en la Tabla 6. La reducción en el número de roedores conforme a la progresión de la enfermedad se justifica debido a las complicaciones propias de la fibrosis.

Tabla 6. Comparación de cantidad de animales al inicio y posterior a las inducciones de CCL4 y Hepatectomías parciales

	Grupo Sano	Grupo Fibrótico	Grupo Cirrótico
No. Inicial de roedores	8	8	8
No. De roedores final	8	6	5

Para el resto de los objetivos al término de las Hpx., la mitad de las ratas de cada grupo se sacrificó a las 12 hrs., y el resto a las 24 hrs. Los hígados obtenidos se incluyeron en parafina y se obtuvieron un total de 3 laminillas por individuo, de ellas una se tiñó con H.E. para visualizar su morfología y otra con T.M. para para evaluar los cambios histopatológicos destacando a la fibrosis tisular (MEC). Las laminillas restantes se mantuvieron en blanco (parafinizadas) para realizar pruebas Inmunohistoquímicas.

Cada laminilla se dividió en dos zonas para trabajo: Zona Control proveniente del mismo lóbulo, pero sin haber sido manipulada y Zona Experimental correspondiente a donde se realizó el corte para visualizar la regeneración. Esto se ilustra en la Figura 15.

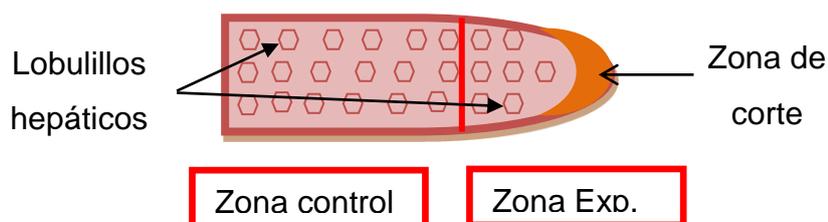


Figura 15: Esquema de zonas del mismo lóbulo.

La tinción T.M. utilizada en las fotos de la zona control, se utilizó para corroborar la clasificación de los grupos experimentales de los individuos (Sano, enfermo y cirrótico) con su clasificación de salud, basadas en la escala Metavir, como se indica en el epígrafe 8.5. El total de datos es visualizado en la Tabla 7. En la cual la frecuencia corresponde al número de fotos analizadas.

Tabla 7. Resultados de imágenes analizadas en el estudio clasificadas en base a la escala Metavir

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	F0	4	7.8
	F1	14	27.5
	F2	5	9.8
	F3	12	23.5
	F4	16	31.4

A pesar de trabajar en un ambiente controlado y monitorear constantemente las variables que pudieron afectar en la progresión de fibrosis, se puede observar, en la Figura 16, que las evaluaciones obtenidas de la patología en la escala Metavir hechas por un observador experto presentan diferencias con sus respectivas predominancias, siendo los grupos con mayor cantidad de datos el F4, seguido del F1, F3 y finalmente F2 y F0. Cuando era de esperarse que solo se observaran 4 barras (correspondientes a F1, F2-F3 y F4 con una frecuencia de tamaño similar) por el tiempo y ambiente controlado de inducción de la enfermedad.

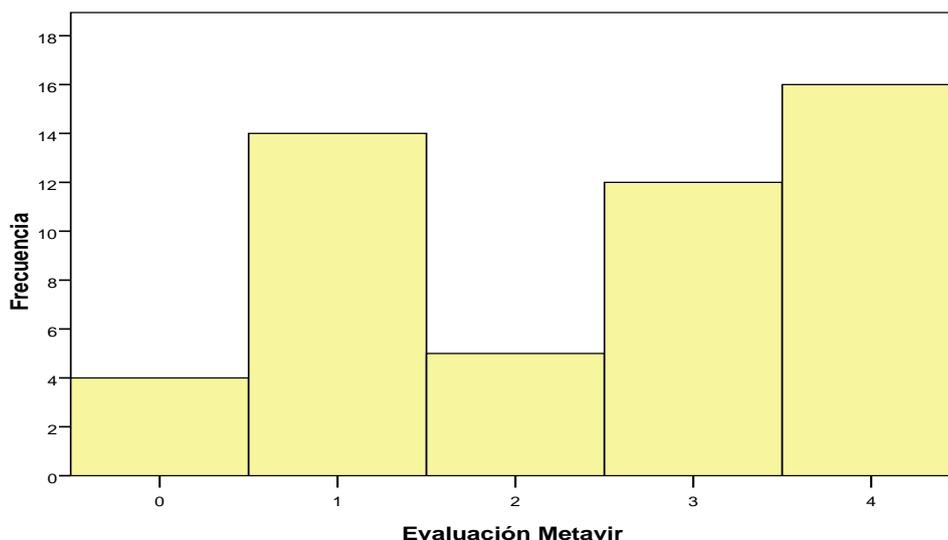


Figura 16. Total de datos analizados mediante la escala Metavir sin hacer distinción en el Grupo experimental al que pertenecen.

En la Figura 17 se observa que en el grupo Sano, la mayoría de las evaluaciones se encuentra en F1, en el grupo Enfermo en F3 mientras que para el grupo Cirrótico se observa una predominancia de casos en F4

Para el grupo cirrótico, se contabilizaron 15 casos. La moda de este grupo se encontró en el estadio esperado, es decir, en F4 con un total de 13 casos, lo que representa el 86.7%. A pesar de que se encontraron evaluaciones en F3, representan una mínima aparición del 13.3%

En el grupo enfermos se contabilizaron 18 datos, con una moda en F3. De estos datos, 5 se evaluaron como F2 y 10 como F3, dando un total de 83.4% de observaciones en uno de los dos estados esperados para este grupo. Solamente 3 evaluaciones correspondieron a F4, lo que representa el 16.6% del total del grupo.

Finalmente, para el grupo Sano se contabilizaron 18 datos de los cuales 4 se evaluaron en F0 y 14 en F1, es decir, el 100% de las observaciones se diagnosticaron en las fases esperadas para este grupo.

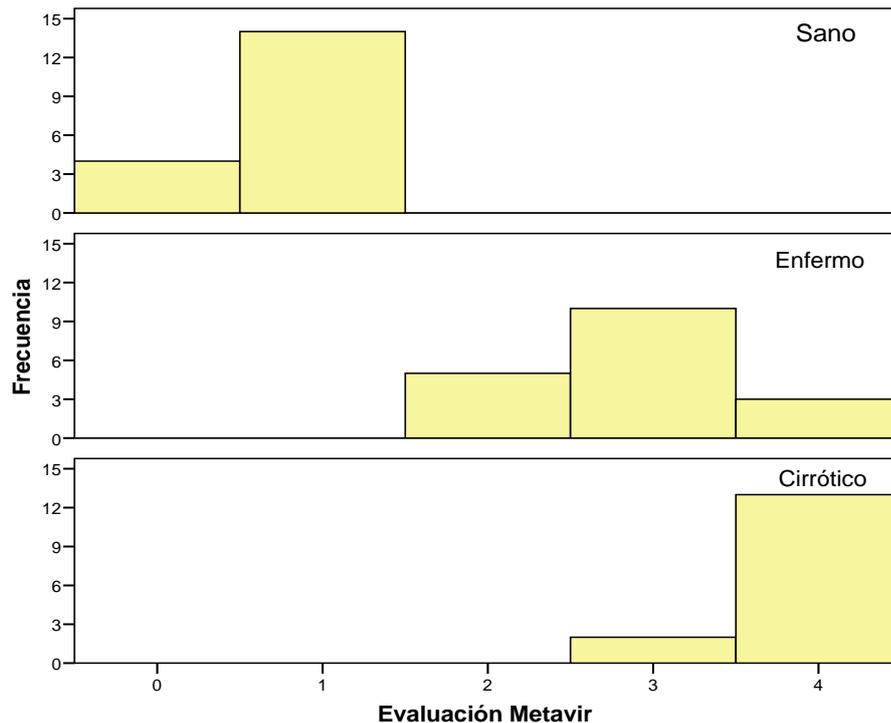


Figura 17. Resultados de los datos basados en la escala Metavir, agrupados de acuerdo a los estados de salud (Sanos, enfermos y cirróticos).

En general se puede observar que, a pesar de existir un ambiente controlado y una metodología estandarizada para la inducción usando CCl₄, el propio metabolismo, genética y la naturaleza de la enfermedad genera un cierto grado de dispersión en el progreso de la fibrosis. Por otro lado, el método de evolución estándar tiene un cierto grado de subjetividad dado que se evalúan parámetros cualitativos en una escala discreta de tan solo cinco fases de la enfermedad. Todo esto representa complicaciones y limitantes en la labor de encontrar parámetros para el diagnóstico efectivo y evaluación de esta patología.

La tinción en H.E en la zona control, reveló en el grupo sano una arquitectura celular normal: hepatocitos poliédricos bien delimitados, de 30 μm en su mayoría, con 1 o 2 núcleos, dispuestos en cordones alrededor de venas centrales, triadas portales y sinusoides sin alteraciones morfológicas. Los hígados del grupo intermedio mostraron hepatocitos con citoplasma de un tamaño mayor al normal, sinusoides con un diámetro levemente mayor al normal y parénquima un poco irregular al tener una distribución de los cordones de hepatocitos con una distribución irregular. Los hígados del grupo cirrótico

mostraron daño celular en los hepatocitos al tener una forma irregular comprada con la normal (pérdida de su morfología habitual); un citoplasma grande y con presencia de esteatosis micro-vesicular, fibras ajenas a la arquitectura normal hepática, sinusoides de diámetro mucho mayor y presencia de vacuolas de grasa (esteatosis) observándose en la Figura 18 y 19. En todos los grupos la hora del sacrificio posterior a la Hpx. no influyó en los de resultados en las zonas controles.

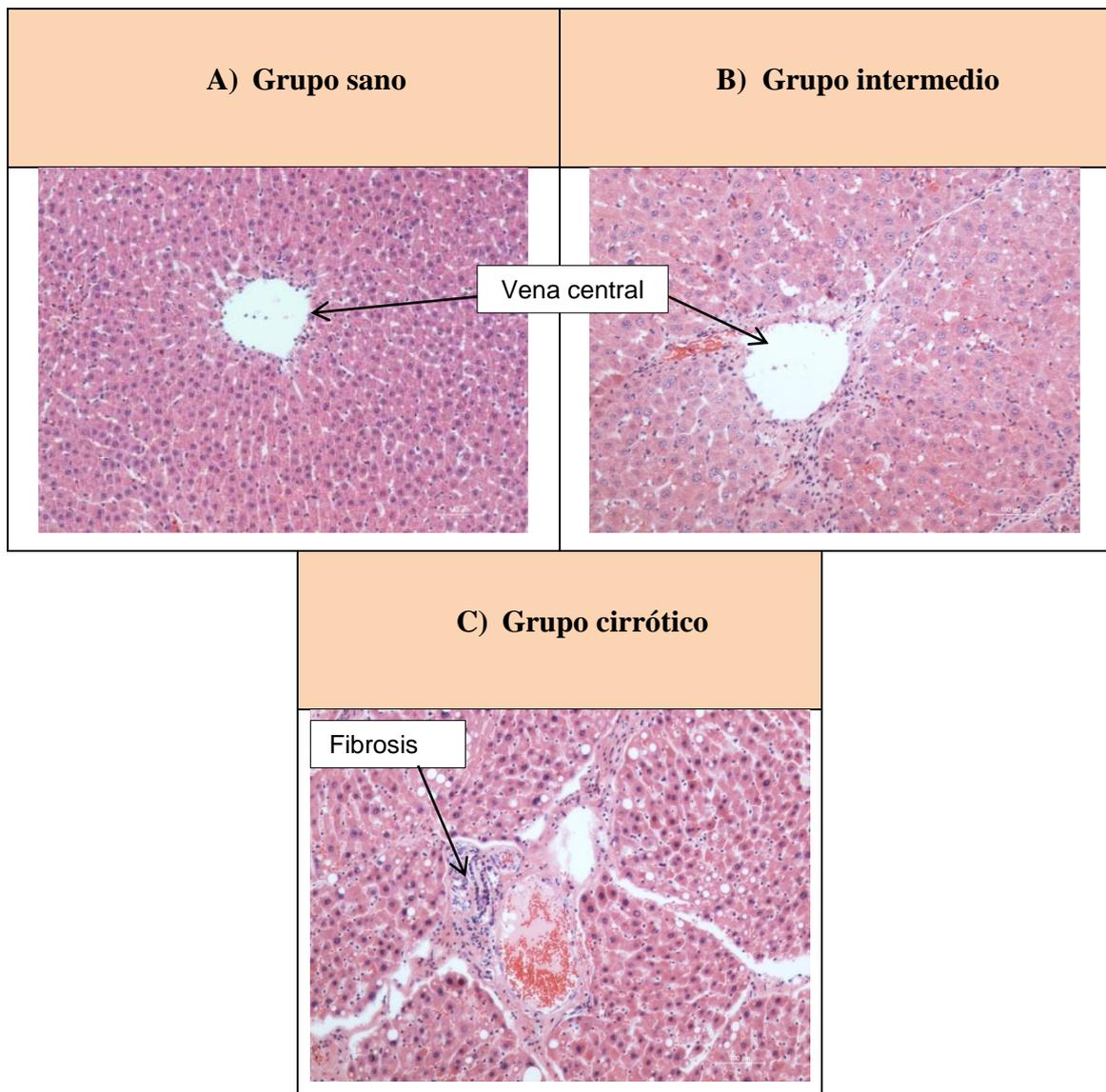


Figura 18: Muestras histológicas a 10x de los 3 grupos sacrificados a las 12 hrs posterior a la Hpx, teñidas con H.E. Visualizando la zona control. Mostrando un deterioro en la arquitectura del tejido conforme progresa la enfermedad

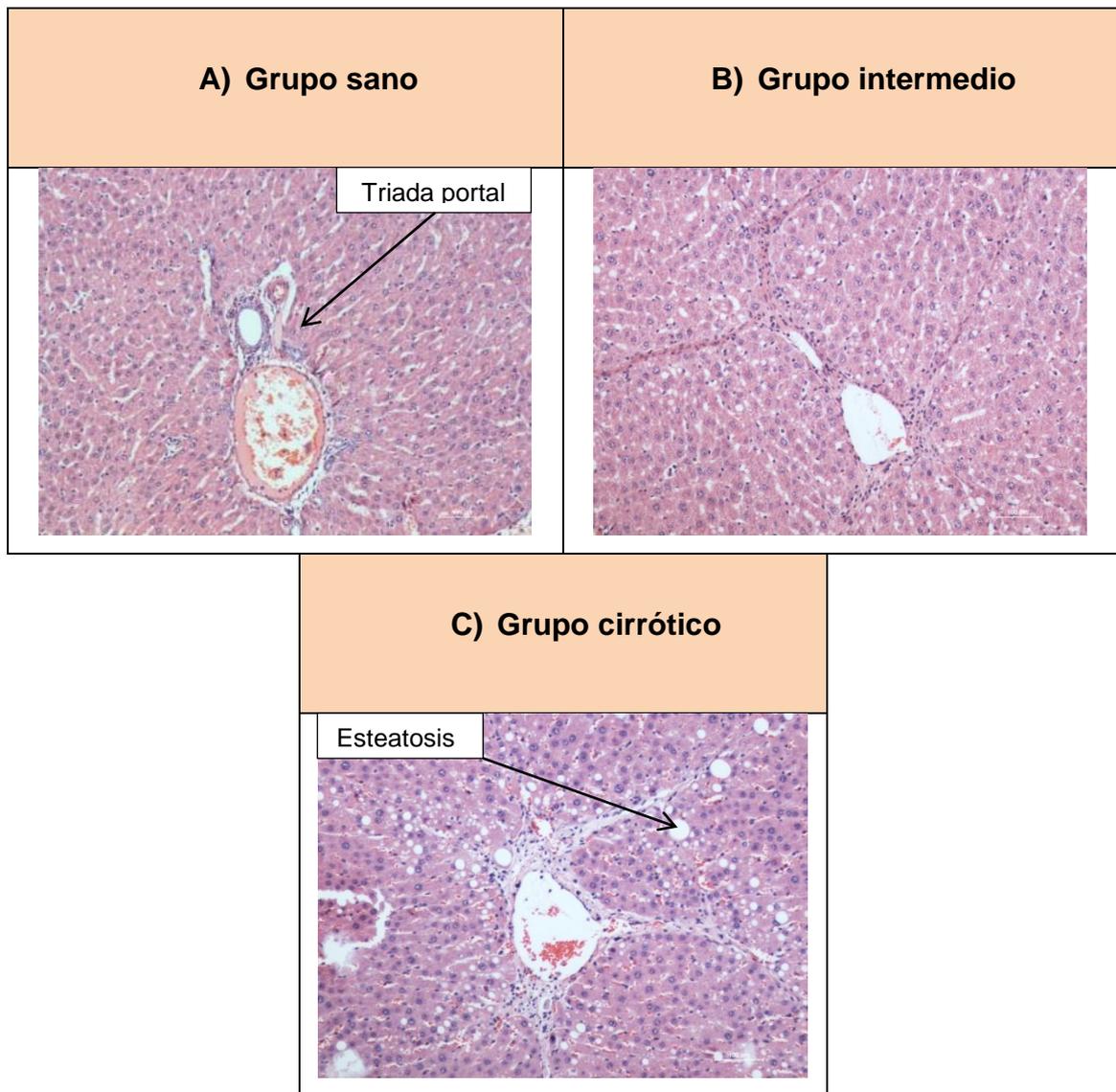


Figura 19: Muestras histológicas a 10x de los 3 grupos sacrificados a las 24 hrs posterior a la Hpx, teñidas con H.E. Visualizando la zona control. Mostrando un deterioro en la arquitectura del tejido conforme progresa la enfermedad

La tinción T.M. ilustrándose en las Figura 20 y 21 mostró en los hígados del grupo sano una escasa presencia de fibras de colágena en general, y una mínima presencia en zonas pericentrales y periportales de carácter normal por la colágena que forma parte de la composición de las paredes que recubren los vasos sanguíneos. En el grupo intermedio se evidenció fibrosis de tipo periportal, y en algunos casos septos delgados de menor tamaño; mientras que los hígados del grupo cirrótico manifestaron una gran cantidad de septos fibrosos de gran grosor y tamaño; también en algunas

laminillas se observó presencia de vacuolas de grasa dispuesta en forma de “septos”. Lo que podría sugerir que en algunos casos la esteatosis puede ser antecesora de la cirrosis. En todos los grupos la hora del sacrificio posterior a la Hpx no influye en este tipo de resultados en las zonas controles.

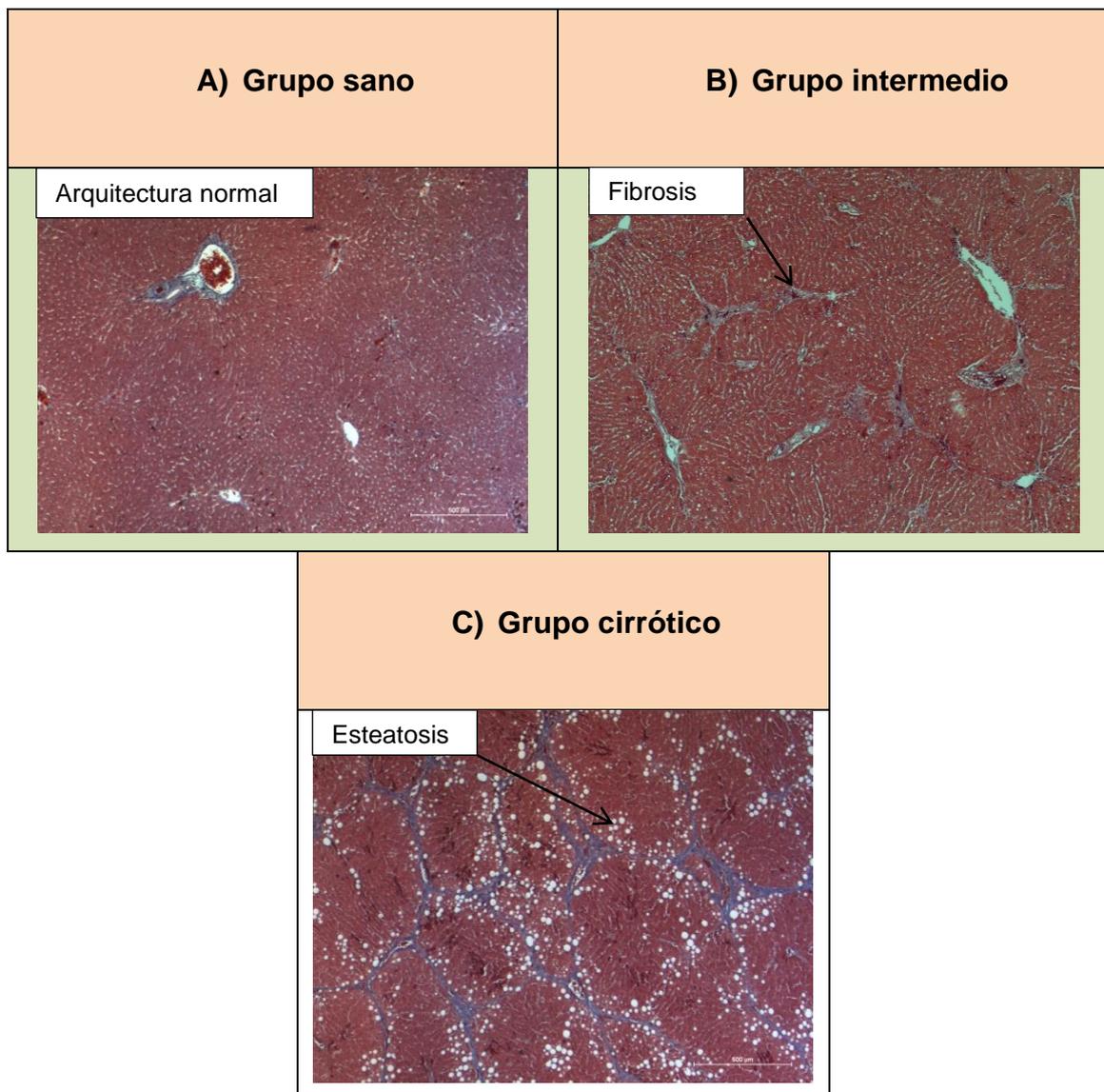


Figura 20: Muestras histológicas a 4x de los 3 grupos sacrificados a las 12 hrs posteriores a la Hpx, teñidas con T.M. Visualizando la zona control.

Estos resultados se corroboraron mediante un estudio de morfometría utilizando el programa *Image J*®. Se determinaron los porcentajes de matriz extracelular entre cada grupo, y se compararon entre grupos mediante una la

prueba estadística de KS, descrita en el epígrafe 8.9, resultando que el grupo de 12 y 24 horas tienen una distribución normal ($p=0.377$ y $p=0.566$) respectivamente, por lo que se procede a realizar una prueba ANOVA.

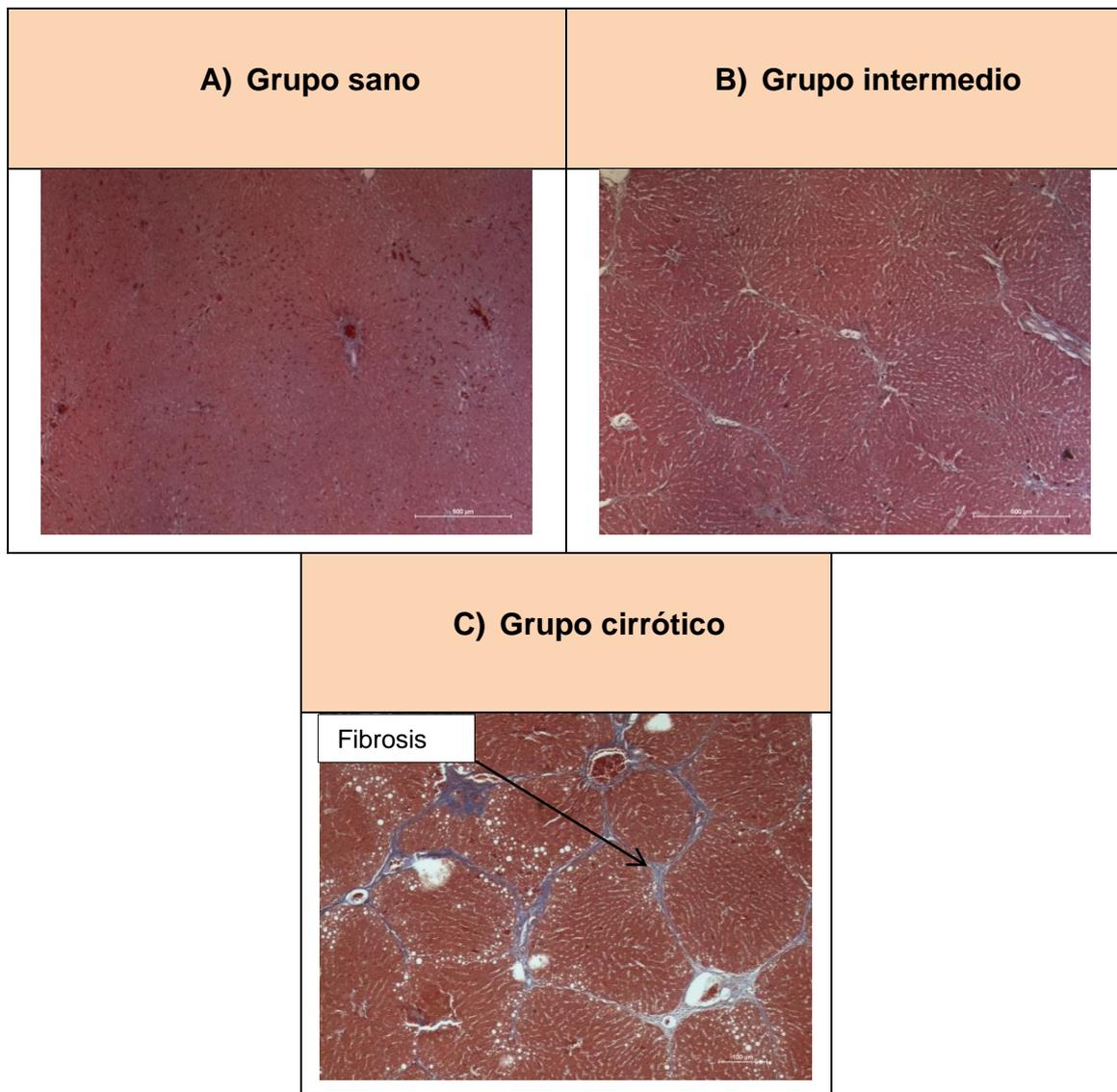


Figura 21: Muestras histológicas a 4x de los 3 grupos sacrificados a las 24 hrs posteriores a la Hpx, teñidas con T.M. Visualizando la zona control.

Los resultados del ANOVA indican que las medias de los grupos son estadísticamente diferentes en todos los casos. Usando el estadístico de *Levene* ($p<0.05$) se determinó que la varianza de los grupos no es homogénea por lo que se usó la prueba post-hoc T3 de *Dunett*, resultando que existen

diferencias estadísticas entre todos los subgrupos con una $p < 0.01$, esto es, existe una diferencia estadística entre el porcentaje de fibrosis para los grupos sanos, enfermos y cirróticos

Esto se ilustra con el diagrama de caja y bigote de la figura 22 donde se observa una diferencia entre grupos por hora de sacrificio dado que la media de uno no está contenida en el otro. Mismos resultados se pueden ver en la Figura 23, agrupados por individuo sin hacer distinción alguna de la hora de la hepatectomía. En ella se observa una diferencia significativamente diferente en la cantidad de MEC entre cada grupo obtenido, siendo el grupo cirrótico con mayor cantidad de MEC.

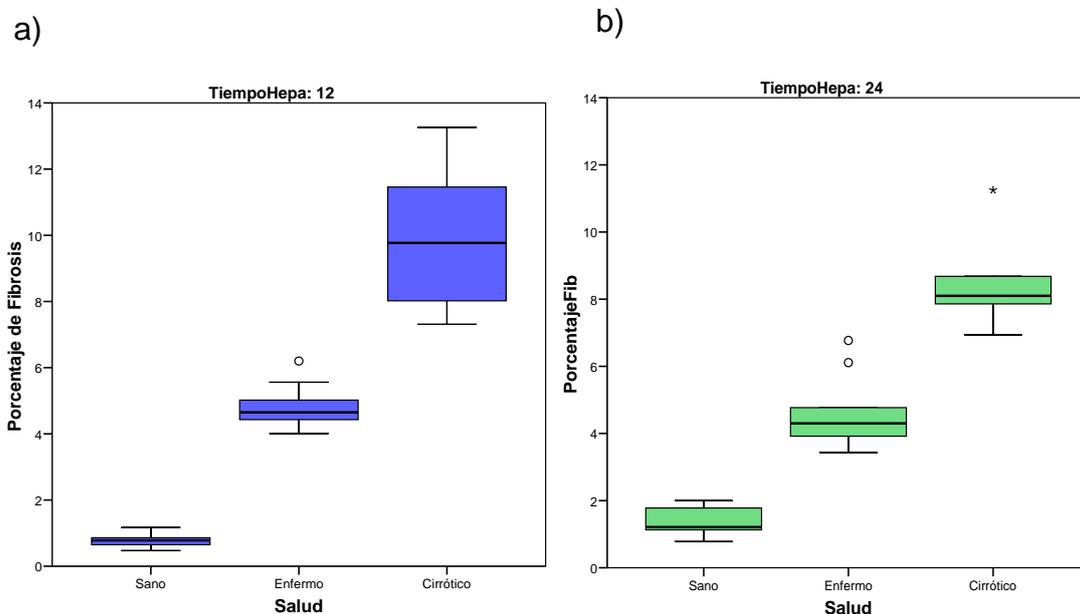


Figura 22. Diagrama de caja y bigote para % de fibrosis en individuos sanos, enfermos y cirróticos. (a) Hepatectomía a las 12 horas. (b) Hepatectomía a las 24 horas

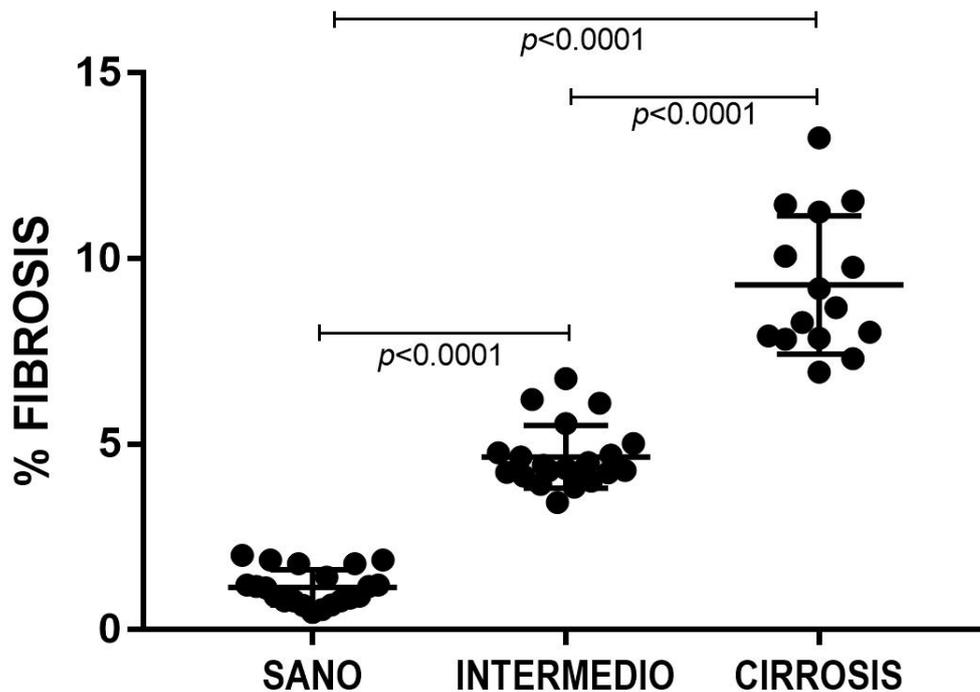


Figura 23: Comparación del porcentaje de Fibrosis entre los grupos de trabajo

Para comparar la regeneración en cada etapa de fibrosis, se usó la tinción T.M para contrastar al tejido regenerado posterior a las hepatectomías. En la figura 24 y 25 en los 3 grupos se aprecia una pequeña franja de tejido de diferente tonalidad al extremo de cada imagen; correspondiente a la zona donde se realizó el corte; en el grupo sano se aprecia que no contiene señales de fibras de colágena o daño celular; el grupo fibrótico muestra poca cantidad de fibras de colágena, mientras que en el grupo cirrótico se aprecia una gran cantidad de fibras de colágena correspondientes a la MEC.

La Zona Experimental, vista con tinción de H.E. se observa un incremento de células de apariencia nuclear y pérdida de la morfología de los hepatocitos comparada con sus zonas controles respectivamente.

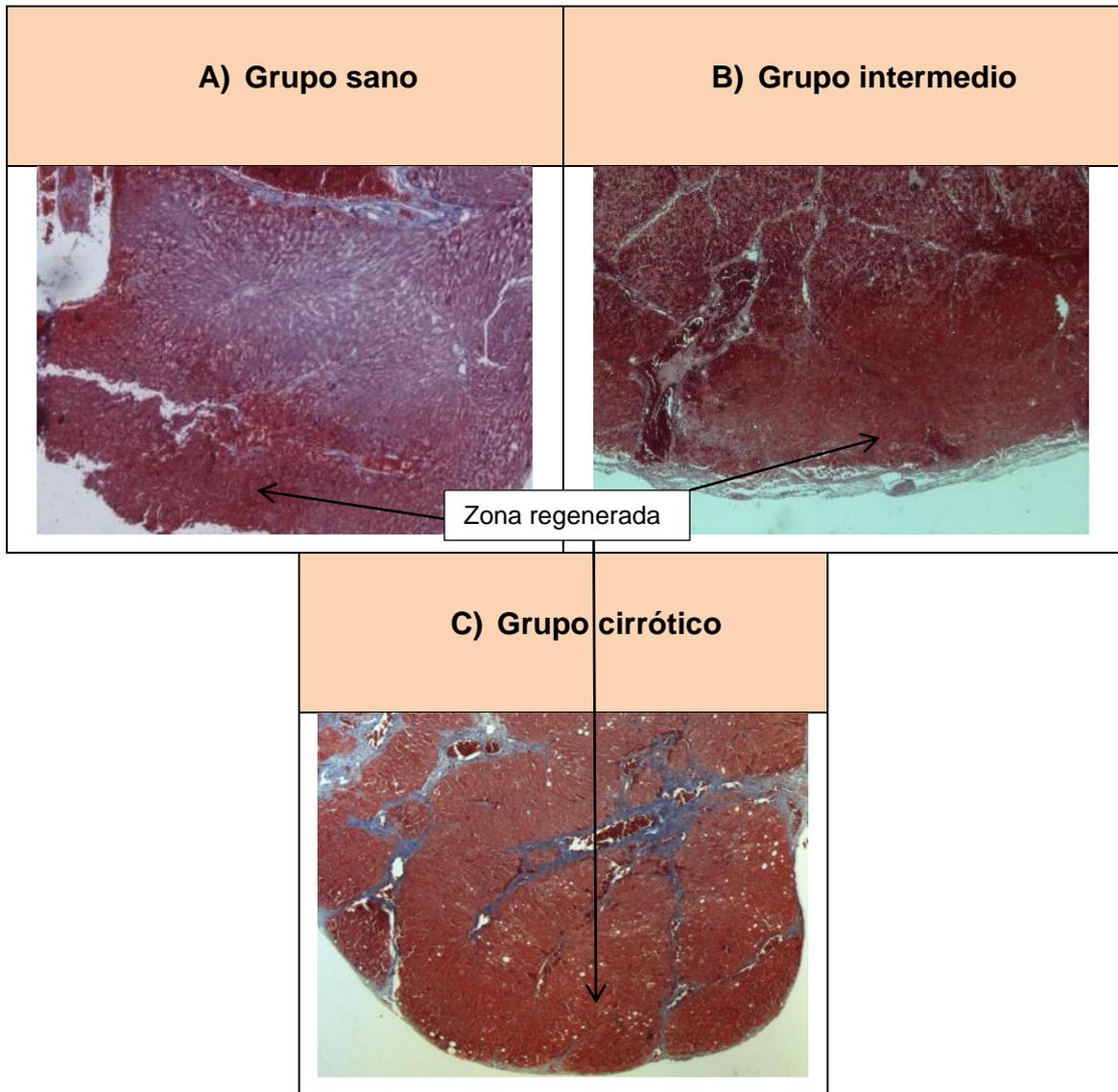


Figura 24: Muestras histológicas a 4x de los 3 grupos teñidas con T.M. a las 12hrs. de la Hpx. Visualizando la zona de Regeneración

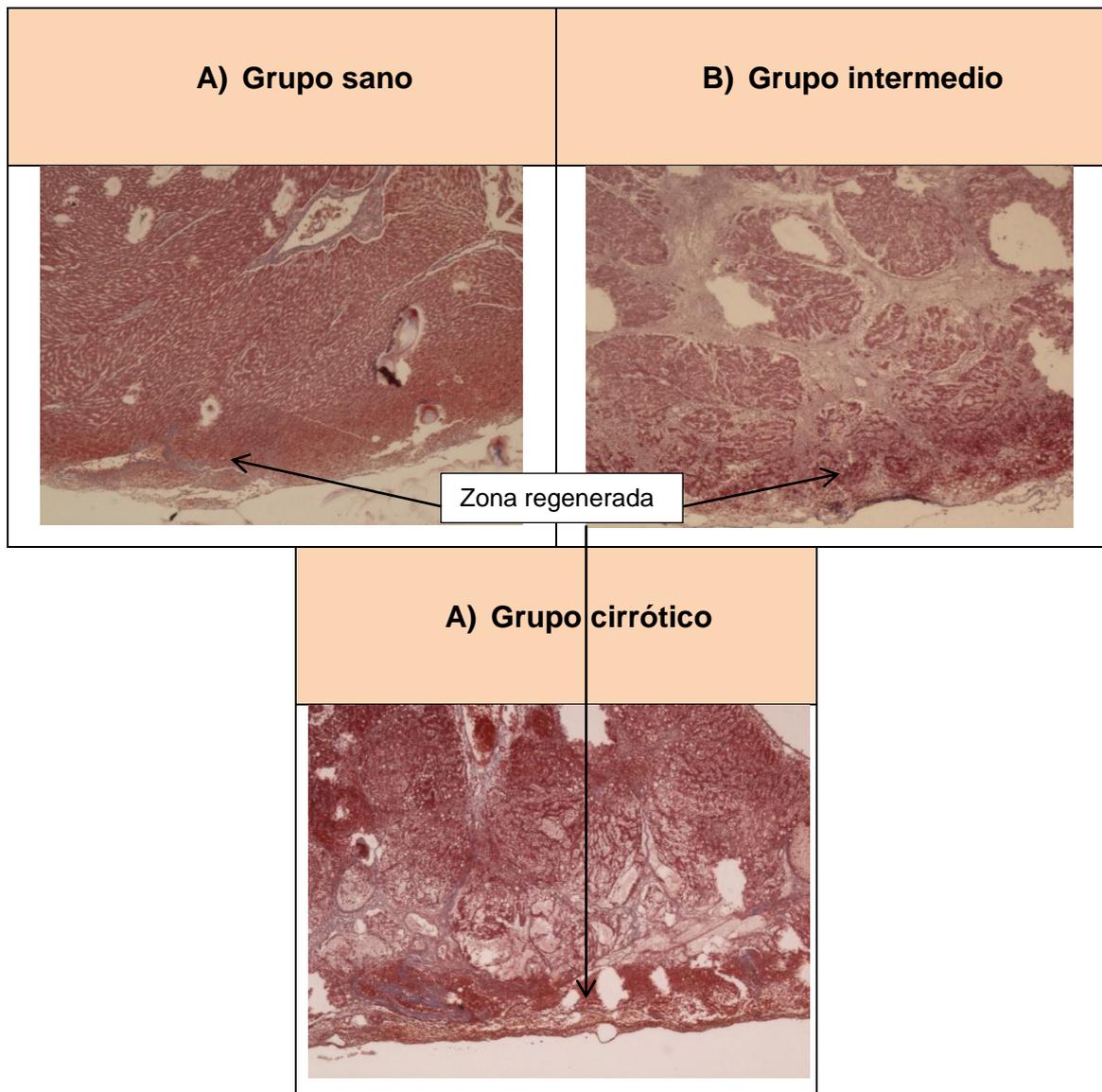


Figura 25: Muestras histológicas a 4x de los 3 grupos teñidas con T.M. a las 24 hrs. de la Hpx con enfoque en la zona de Regeneración

Para evaluar y comparar la proliferación celular en cada etapa de la enfermedad hepática se tenía pensando evaluar PCNA. Al comparar la inmunohistoquímica de los controles negativo y positivo, los núcleos de los hepatocitos mostraron diferencias evidentes; en los hepatocitos de los hígados cirróticos se nota una mayor coloración de sus núcleos haciendo referencia a un predominio del PCNA a diferencia de los hepatocitos pertenecientes a los hígados de las ratas sanas, cuyos núcleos muestran una tonalidad azul tenue. Ilustrándose en las Figura 26 y 27.

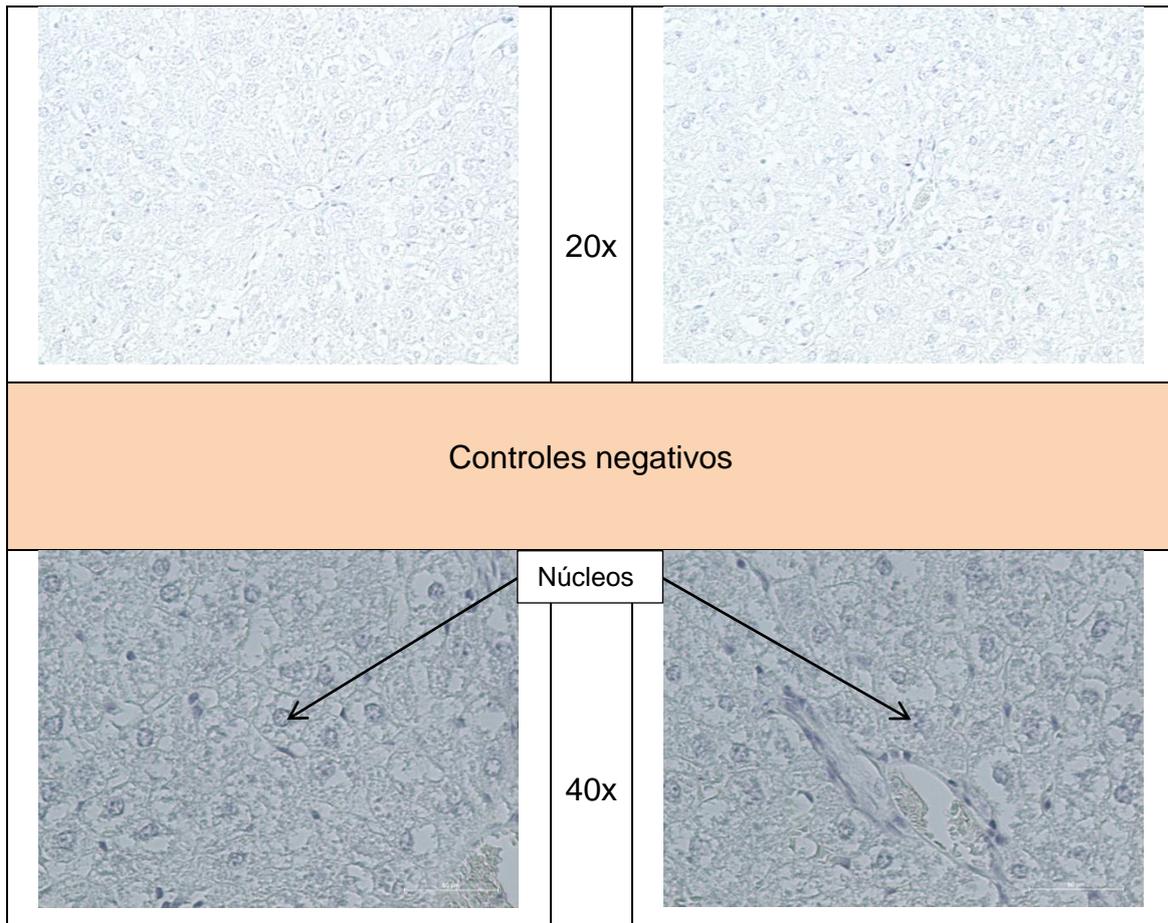


Figura 26: Control negativo de pruebas para el anticuerpo PCNA. Muestras histológicas a 20x y 40x de ratas pertenecientes al grupo sano

El tejido correspondiente al control negativo es una muestra de hígado sano evaluado en la zona control mientras que el control positivo es una muestra de hígado de rata del grupo cirrótico evaluada de la zona control obtenidas posterior a la hepatectomía.

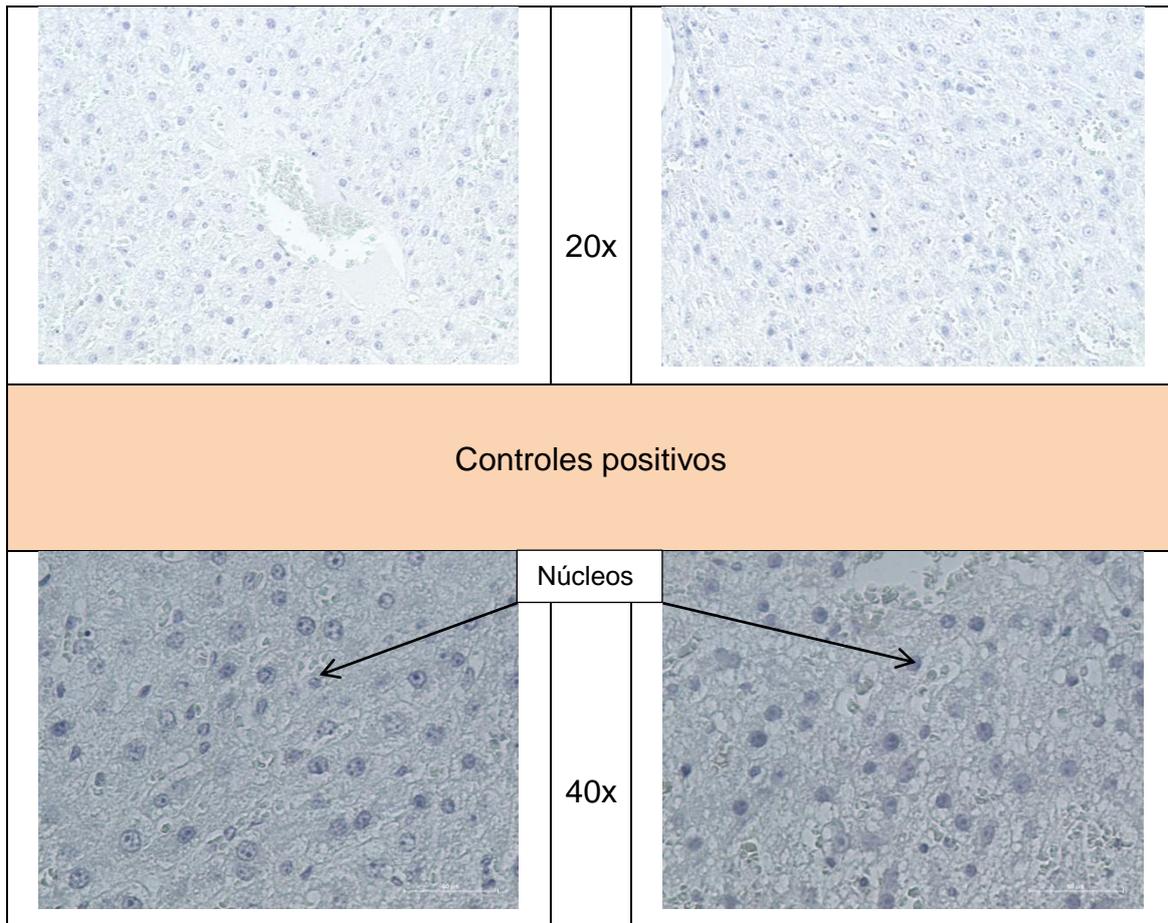


Figura 27: Control positivo de pruebas para el anticuerpo PCNA. Muestras histológicas a 20x y 40x de ratas pertenecientes al grupo cirrótico posterior a la Hpx con enfoque en la zona Control

Para analizar la consecuencia de la hepatectomía en la zona control, se realizó un análisis de las imágenes tomadas en esa zona a las 12 y 24 hrs. Para esto se utilizó como en el caso de la fibrosis, el programa *Image J*® haciendo uso de las herramientas de filtrado por color, forma y calculó del área. Dado que en las imágenes los hepatocitos tienen los contornos poco definidos como se puede ver las Figura 28 y 29 inclusive con un acercamiento mayor su definición respecto a los contornos de los hepatocitos no es clara donde se muestra la imagen original, el filtrado por color y la selección de contornos. Es de notar que las zonas seleccionadas por el programa corresponden a los núcleos de los hepatocitos, debido a que tienen una mayor definición en sus contornos.

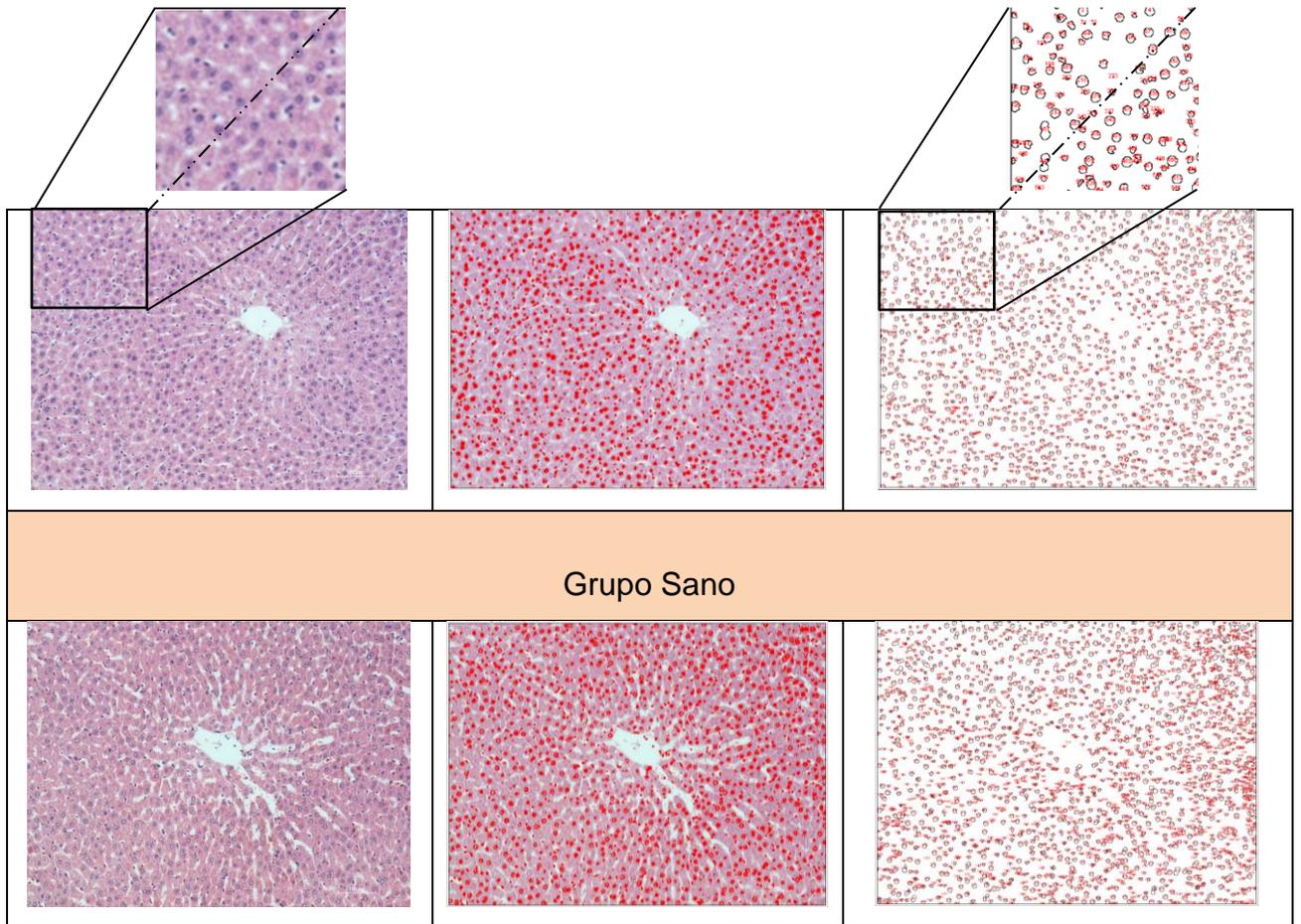


Figura 28: Muestras histológicas a 4x del grupo sano teñidas con H.E. a las 12 hrs. de la Hpx con enfoque en la zona Control

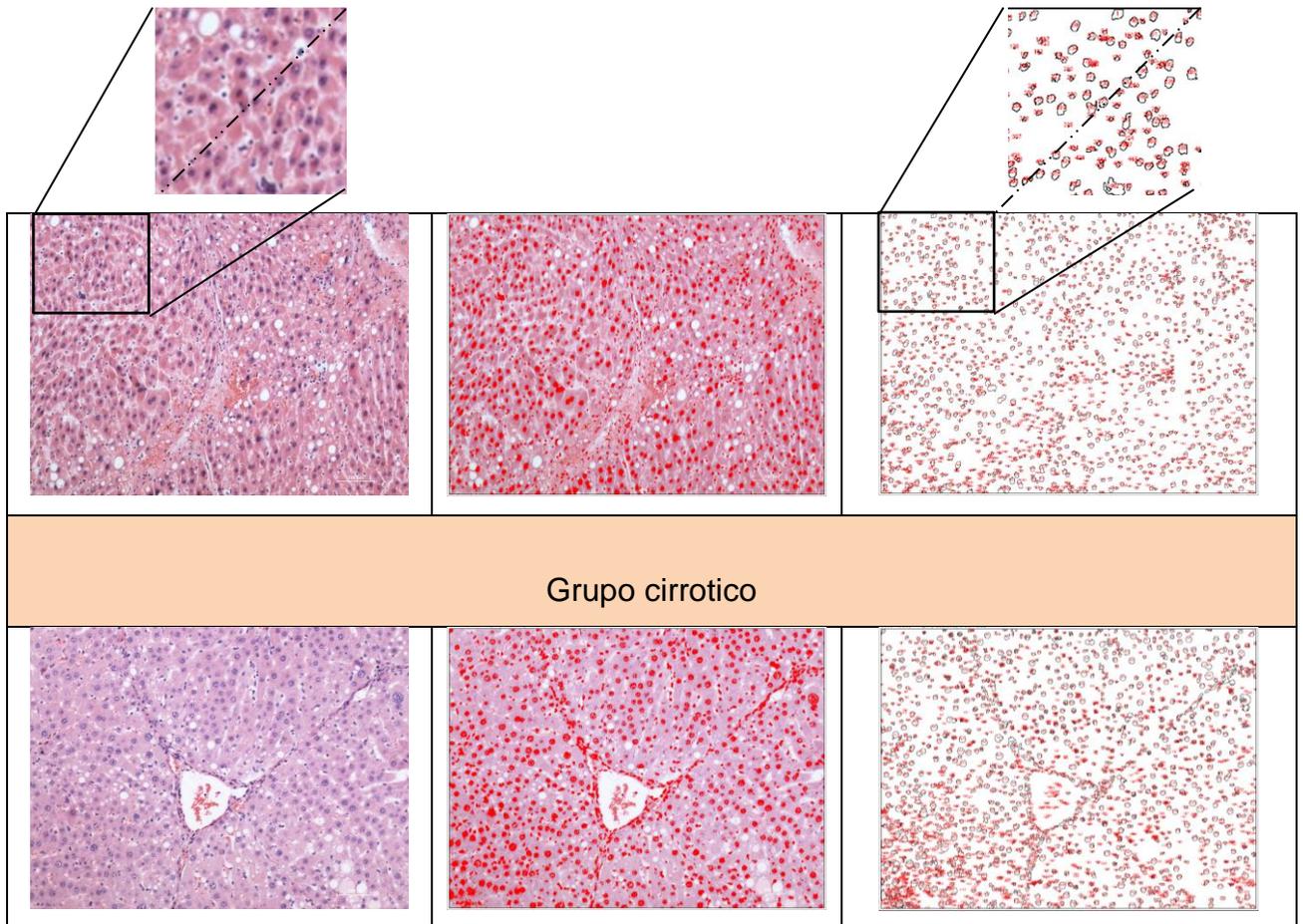


Figura 29: Muestras histológicas a 4x del grupo sano teñidas con H.E. a las 24 hrs. de la Hpx con enfoque en la zona Control

La prueba KS indica que los resultados del grupo de 12 y 24 horas tienen una distribución normal ($p=0.244$ y $p=0.465$ respectivamente), por lo que se procede a realizar una prueba ANOVA para cada grupo usando como factor de agrupación la variable Salud.

Los resultados del ANOVA ($p < 0.05$) muestran que las medias de los grupos son estadísticamente diferentes en ambos casos. Usando el estadístico de Levene ($p < 0.05$) se determinó que la varianza de los grupos no es homogénea por lo que se usó la prueba post-hoc T3 de Dunnett, resultando que existen diferencias estadísticas entre todos los subgrupos con una $p < 0.01$, esto es, existe una diferencia entre el área total de los núcleos de los hepatocitos para individuos Sanos, Enfermos y Cirróticos, tanto en el caso de la hepatectomía realizada a las 12 horas como para la de 24 horas. Esto se muestra en el diagrama de caja y bigote de la Figura 30 a) y b) en ella es claro

observar una diferencia entre grupos dado que la media de uno no está contenida en el otro.

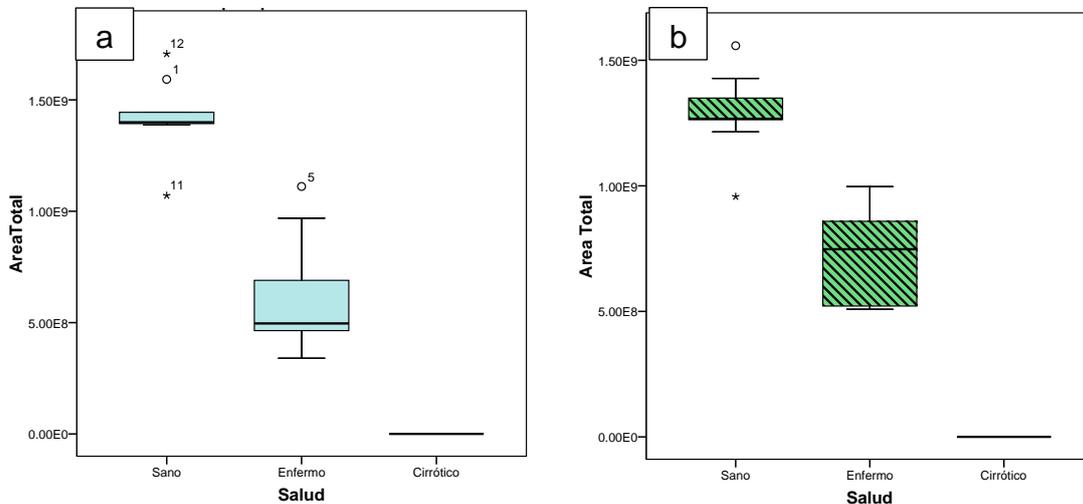


Figura 30. Diagrama de caja y bigote para el área total de los hepatocitos en individuos sanos enfermos y cirróticos. (a) Hepatectomía a las 12 horas. (b) Hepatectomía a las 24 horas

Posteriormente para averiguar si había diferencias a las 12 o 24 hrs. entre el área total de los núcleos y si la prueba pertinente a usar era una T-Student, se corrió una prueba KS obteniendo resultados que indicaron que los grupos tienen una distribución normal ($p=0.859$, $p=0.215$ y $p=0.931$ respectivamente), corroborando que se puede utilizar una prueba de comparación de medias.

En la prueba T-Student se observa que no existen diferencias estadísticas entre los resultados obtenidos a las 12 y 24 horas de la hepatectomía, esto para todos los grupos: sanos ($p=0.095$), enfermos ($p=0.277$) y cirróticos ($p=0.332$). Esto indica que no hay diferencia en la hipertrofia de los hepatocitos en función al tiempo de hepatectomía para 12 y 24 horas, independiente del estado de salud del individuo. Esto se confirma por medio del diagrama de caja y bigote de la Figura 31 donde se muestra poca diferencia en las cajas correspondientes a cada tiempo de hepatectomía en los tres grupos de salud.

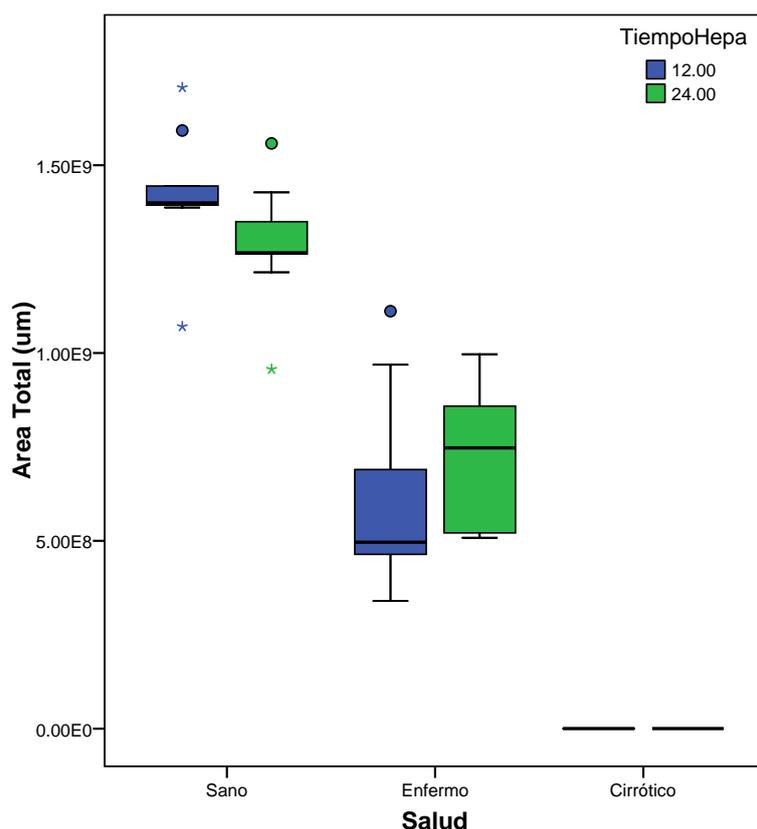


Figura 31: Diagrama de caja y bigote para el para el área total de los hepatocitos (A_{hep}) en los 3 grupos para los individuos a las 12 y 24 hrs.

10. Análisis de Resultados

La toxicidad inducida por CCl_4 y sus mecanismos han sido ampliamente investigados en roedores, donde la dosis, la duración de la exposición, y/o momento de la observación, determinan los resultados que se desean. En el presente estudio se generó la fibrosis y cirrosis hepática deseada a las 8 y 20 semanas de dosis evidenciada por el aumento de la matriz extracelular en el parénquima hepático y daño en su arquitectura normal como se observa en las Figuras 19 y 20 evidenciando un aumento en las fibras de colágena conforme progresa el tiempo del insulto, hasta llegar a la formación de septos de fibrosis bien delimitados sin importar la hora de sacrificio posterior a la hepatectomía, lo cual ocurre como se dijo anteriormente por cambios importantes en el metabolismo de lípidos y en activación de la transcripción del $TNF-\alpha$, $TGF-\beta$ y la NO sintasa inducible en la célula, procesos que parecen dirigir a la célula principalmente hacia su destrucción.

Obteniendo resultados estadísticamente diferenciados con una $p < 0.001$ respecto al porcentaje de la matriz extracelular entre cada uno de los grupos (Sano, Enfermo y Cirrótico) demostrándose una diferencia entre cada uno de los grupos respecto a la cantidad de la matriz extracelular, siendo el grupo sano el de menor cantidad y el grupo cirrótico el de mayor cantidad de fibrosis, es decir, existe un aumento progresivo en la cantidad de matriz extracelular conforme aumenta el grado de enfermedad, mientras que en la Figuras 18 Y 19 se observa que la morfología propia de los hepatocitos, también se ve alterada con el progreso del insulto hasta deformar la arquitectura normal del hígado. La presencia de vacuolas de grasa siguiendo la forma de las fibras de colágena se hacen evidentes en las figuras 19 C, esto da la apariencia de formar septos en algunas laminillas sugiriendo que, en algunos casos, la esteatosis puede ser antecesora de la cirrosis. Lo cual se corrobora en la literatura, donde se menciona que el hígado graso no alcohólico (NAFLD), es una predisposición a la cirrosis sin necesidad de otras fuentes de daño como el alcohol.

El hígado sano tiene una capacidad muy conocida para regenerar de hasta un 90% después de una hepatectomía parcial. Mientras que, en los seres humanos, toma alrededor de 21 días para que el hígado parcialmente hepatectomizado recupere su volumen original, en las ratas, que son una de las especies más estudiadas, se necesita solo de 10 a 14 días para una regeneración hepática completa cuando los hígados se encuentran sanos.

Después de la publicación de Kaufman en 1953, la regeneración del hígado cirrótico a su volumen y peso preoperatorios después de la hepatectomía parcial ganó popularidad. Los estudios que evalúan las condiciones y los factores que influyen en la regeneración hepática cirrótica después de PHx han aparecido extensamente en la literatura. En respuesta a una hepatectomía parcial, puede haber hepatocitos suficientes para restaurar la masa hepática original tanto en individuos normales como cirróticos al entrar en el ciclo celular y avanzan hacia la síntesis y replicación del ADN, sin embargo, depende de la cantidad de la masa retirada y la progresión de la enfermedad. Por otro lado, las tasas de regeneración deben ser diferentes en los hígados normales y cirróticos concomitantes con sus debidas diferencias estructurales.⁶³

Conforme progresa la enfermedad el área ocupada por los núcleos de los hepatocitos entre cada grupo analizado es menor con una diferencia de tamaño significativamente diferente entre cada estado de salud como se observa en la gráfica 14. Siendo el grupo sano el de mayor cantidad de área ocupada por los núcleos, muy probablemente a que su regeneración se llevó a cabo por un proceso mitótico como lo describe la literatura y en menor cantidad por la vía de hipertrofia compensatoria, mientras que en el grupo cirrótico tuvo la menor cantidad de área ocupada por los núcleos de los hepatocitos lo que deja a pensar que el número de hepatocitos por área disminuyó; es decir que los hepatocitos aumentaron de tamaño y por lo tanto ocupan una mayor área y sus núcleos se encuentran más separados. Siendo esto un indicio de que la vía de regeneración por la hepatectomía parcial en hígados cirróticos efectuada en el presente estudio se llevó a cabo por una hipertrofia compensatoria, como se reporta en la literatura. Con la finalidad de entender si dicho proceso de regeneración se ve influenciado por el tiempo de sacrificio posterior a la hepatectomía, se analizaron los resultados obtenidos a las 12 hrs. (Figura 27 gráfica a) y a las 24 hrs (Figura 27 gráfica b), resultando que en estos grupos no hay diferencias estadísticas significativas en el incremento del área de los núcleos de los hepatocitos, lo cual evidencia que la hipertrofia de los hepatocitos no se ve influenciada por el pico de la regeneración a nivel molecular independientemente de la hora de sacrificio posterior a la hepatectomía.

A pesar de que en la actualidad existe evidencia de estudios en regeneraciones hepáticas, no se ha establecido la relación entre el porcentaje de hígado retirado en una hepatectomía junto con su daño previo en el organismo en los humanos, lo cual resultaría de interés ya que en uno de los problemas principales a nivel mundial en el tratamiento de la cirrosis hepática es la falta de trasplantes. Por otro lado, cuando un paciente presenta un estado hepático fibrótico es posible revertir el proceso de la enfermedad debido a la alta capacidad regenerativa del hígado si se suspende el factor dañino y/o se le da tratamiento para la enfermedad o factor que altera su estado de salud. En torno a esto, existen dos teorías generales acerca de la regeneración, en una se propone que al retirar una cantidad menor al 30%, el hígado recupera su masa perdida por una hipertrofia compensatoria acompañada de una mitosis

menor, a diferencia que si se retira un porcentaje mayor al 30% del hígado; donde la regeneración se lleva a cabo principalmente por una activación y proliferación de células progenitoras.

Debido a la alta necesidad de trasplantes de hígado en la actualidad, el bajo número que se llegan a efectuar y el hecho de que la patología de la cirrosis va en aumento al pasar de los años por diversos factores tales como la alta ingesta de grasas, el sedentarismo y el consumo excesivo de bebidas alcohólicas, entre otras, es importante encontrar alternativas para remediar y/o entender más ampliamente el problema. Por ello una de las contribuciones del trabajo, es aportar al conocimiento de la enfermedad para poder encontrar soluciones a la cirrosis y/o disminuir el número de defunciones debidas a este problema de relevancia mundial.

En el presente estudio se propone que los hígados sanos posteriores a una lesión, llevan a cabo la regeneración por medio de la activación de células mitóticas para producir nuevos hepatocitos. Mientras que, en el hígado cirrótico, la regeneración se lleva a cabo por una hipertrofia compensatoria debido a que las células están comprometidas a pesar de ser una hepatectomía menor al 30%.

11. Conclusiones

Se concluye que la regeneración hepática en el presente estudio posterior a una hepatectomía menor al 30% se llevó a cabo en los hígados cirróticos por una hipertrofia compensatoria, mientras que en los hígados sanos no se llevó a cabo este proceso. Se propone complementar el estudio con pruebas más específicas, para evaluar de mejor forma la regeneración hepática y entender a fondo este proceso.

12. Bibliografía

1. Mormone, E., George, J. & Nieto, N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem. Biol. Interact.* **193**, 225–231 (2011).
2. Shang, H., Wang, Z. & Song, Y. Liver progenitor cells-mediated liver regeneration in liver cirrhosis. *Hepatol. Int.* (2016). doi:10.1007/s12072-015-9693-2
3. Lin, W. R. *et al.* The histogenesis of regenerative nodules in human liver cirrhosis. *Hepatology* **51**, 1017–1026 (2010).
4. Palmes, D. & Spiegel, H. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* **25**, 1601–1611 (2004).
5. Fausto, N., Campbell, J. S. & Riehle, K. J. Liver regeneration. *Hepatology* **43**, 45–53 (2006).
6. Muskhelishvili, L., Latendresse, J. R., Kodell, R. L. & Henderson, E. B. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J. Histochem. Cytochem.* **51**, 1681–8 (2003).
7. Taub, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 836–847 (2004).
8. Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J. P. & Fallowfield, J. a. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 181–94 (2014).
9. Cienfuegos, J. a *et al.* Liver regeneration--the best kept secret. A model of tissue injury response. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **106**, 171–94 (2014).
10. Saidi, R. F., Rajeshkumar, B., Shariftabrizi, A., Dresser, K. & Walter, O. Human C1 inhibitor attenuates liver ischemia-reperfusion injury and promotes liver regeneration. *J. Surg. Res.* **187**, 660–6 (2014).
11. Gilgenkrantz, H. & Collin de l'Hortet, a. New insights into liver regeneration. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **35**, 623–629 (2011).
12. Ishikawa, T. *et al.* Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-cell-mediated liver regeneration in mice. *Hepatology* **55**, 1215–1226 (2012).
13. Wanessa, S. *et al.* Diethylcarbamazine Reduces Chronic Inflammation and Fibrosis in Carbon Tetrachloride- (CCl₄ -) Induced Liver Injury in Mice. **2014**, (2014).

14. INEGI. Principales causas de morbilidad. (2013). at <<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>>
15. 10. Narro J., Gutiérrez J., López M., B. G. & R. H. *La mortalidad por cirrosis hepática en México: Características epidemiológicas relevantes. Salud Pública de México Title.* (1992).
16. Mexico. Informe para la rendición de cuentas. Secretaria de Salud. 46–48 (2006). at <<http://www.salud.gob.mx/unidades/evaluacion/saludmex2006/SM06.pdf>>
17. Lefton H., R. A. & C. M. Diagnosis and epidemiology of cirrhosis. *Med. Clin. North Am.* **93**, 787–99 (1999).
18. Ney, P., Martins, A. & Neuhaus, P. Surgical anatomy of the liver , hepatic vasculature and bile ducts in the rat. 384–392 (2007). doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01414.x
19. Starkel, P. & Leclercq, I. a. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **25**, 319–333 (2011).
20. Martins, P. N. A., Theruvath, T. P. & Neuhaus, P. Rodent models of partial hepatectomies. 3–11 doi:10.1111/j.1478-3231.2007.01628.x
21. Li, N. & Hua, J. Immune cells in liver regeneration. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.12275
22. Kang, L.-I., Mars, W. M. & Michalopoulos, G. K. Signals and cells involved in regulating liver regeneration. *Cells* **1**, 1261–92 (2012).
23. McCuskey, R. S. The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants. *Anat. Rec.* **291**, 661–671 (2008).
24. Karin, M. & Clevers, H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature* **529**, (2016).
25. Jacobs, F., Wisse, E. & De Geest, B. The role of liver sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer. *Am. J. Pathol.* **176**, 14–21 (2010).
26. Elsharkawy, a M., Oakley, F. & Mann, D. a. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* **10**, 927–939 (2005).
27. Krithika, R., Jyothilakshmi, V. & Verma, R. J. Phyllanthin inhibits CCl4-mediated oxidative stress and hepatic fibrosis by down-regulating TNF- / NF- B and pro-fibrotic factor TGF- 1 mediated inflammatory signaling. *Toxicol. Ind. Health* (2014). doi:10.1177/0748233714532996
28. Wells, R. G. Liver Fibrosis : New Mechanisms , New Treatments , and Why They Matter. (2010).

29. Ramón Bataller, D. A. B. Liver fibrosis. *Science & Medicine* (2005). at <<http://www.jci.org/articles/view/24282/figure/1>>
30. Baiocchi, A. *et al.* Extracellular Matrix Molecular Remodeling in Human Liver Fibrosis Evolution. *PLoS One* **11**, e0151736 (2016).
31. Hernandez-Gea, V. & Friedman, S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 425–56 (2011).
32. INEGI. Principales causas de morbilidad. (2013).
33. García L., G. M. & M. R. *Cirrosis hepática. Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* (2012).
34. Manne, V., Akhtar, E. & Saab, S. Cirrhosis Regression in Patients With Viral Hepatitis B and C: A Systematic Review. *J Clin Gastroenterol* **48**, 76–84 (2014).
35. Buey, L. G. & Mateos, F. G. Cirrosis hepática. **11**, (2012).
36. Farazi, P. a & DePinho, R. a. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 674–687 (2006).
37. Wells, R. G. Function and metabolism of collagen and other extracellular matrix proteins. *Clin. Biochem.* **100**, 264–273 (2002).
38. Stănculeț, N. *et al.* Operational scores in the diagnosis of chronic hepatitis. A semi-quantitative assessment. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **53**, 81–87 (2012).
39. Bedossa, P. & Carrat, F. Liver biopsy: The best, not the gold standard. *J. Hepatol.* **50**, 1–3 (2009).
40. Bedossa, P. & Poynard, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* **24**, 289–293 (1996).
41. Galindo, L. E. F. Non-Alcoholic Liver Disease Today's Epidemic? (2015). at <<http://www.jlgh.org/Past-Issues/Volume-10---Issue-3/Non-Alcoholic-Liver-Disease.aspx>>
42. Gamal, S. & Zalata, K. Ishak versus METAVIR: Terminology, Convertibility and Correlation with Laboratory Changes in Chronic Hepatitis C. *Liver Biopsy, Dr Hirokazu Tak.* (2011).
43. Weber, L. W. D. *et al.* Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes : Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes : Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. **8444**, (2016).

44. Palmes, D. & Spiegel, H.-U. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* **25**, 1601–1611 (2004).
45. Mitchell, C. & Willenbring, H. PROTOCOL A reproducible and well-tolerated method for 2 / 3 partial hepatectomy in mice. **3**, 1–5 (2014).
46. Locker, J. *et al.* A common set of immediate-early response genes in liver regeneration and hyperplasia. *Hepatology* **38**, 314–325 (2003).
47. Satyanarayana, A., Geffers, R., Buer, J. & Rudolph, K. L. Gene Expression Profile at the G 1 / S Transition of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice. 1405–1417 (2004).
48. Mitchell, C. & Gilgenkrantz, H. Transcriptional profiling of liver regeneration: New approaches to an old trick! *J. Hepatol.* **38**, 847–849 (2003).
49. Christophi, C., Harun, N. & Fifis, T. Liver regeneration and tumor stimulation-A review of cytokine and angiogenic factors. *J. Gastrointest. Surg.* **12**, 966–980 (2008).
50. Mao, S. a., Glorioso, J. M. & Nyberg, S. L. Liver regeneration. *Transl. Res.* **163**, 352–362 (2014).
51. Riehle, K. J., Dan, Y. Y., Campbell, J. S. & Fausto, N. New Concepts in Liver Regeneration. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **26**, 203–212 (2011).
52. Fausto, N. Liver regeneration T”. *J. Hepatol.* **32**, 19–31 (2000).
53. Pahlavan, P. S., Feldmann, R. E., Zavos, C. & Kountouras, J. Prometheus’ Challenge: Molecular, Cellular and Systemic Aspects of Liver Regeneration. *J. Surg. Res.* **134**, 238–251 (2006).
54. Mao, S. A., Glorioso, J. M. & Nyberg, S. L. Liver regeneration. *Transl. Res.* **163**, 352–362 (2014).
55. Alison, M. R. & Lin, W.-R. Diverse routes to liver regeneration. *J. Pathol.* 371–374 (2015). doi:10.1002/path.4667
56. Conditions, G. SOX9 gene. *Genetics home reference* at <<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/meniere-disease#inheritance>>
57. Wen, W.-S. *et al.* Hybrid hepatocyte: a newly identified player for regeneration in hepatic injuries. *Int. J. Cancer* 1–23 (2013). doi:10.1002/elsc.201200179
58. Font-Burgada, J. *et al.* Hybrid Periportal Hepatocytes Regenerate the Injured Liver without Giving Rise to Cancer. *Cell* **162**, 766–779 (2015).
59. Campbell, J. S. *et al.* Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *J. Clin. Invest.* **107**, 1285–1292 (2001).

60. Böhm, F., Köhler, U. a., Speicher, T. & Werner, S. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol. Med.* **2**, 294–305 (2010).
61. Kiyomitsu Miyachi, M. J. F. and E. M. T. Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. *J. Immunol.* 661–667 (1978).
62. Fujii, T. *et al.* Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. *BMC Gastroenterol* **10**, 79 (2010).
63. Andiran, F., Ayhan, a, Tanyel, F. C., Abbasoğlu, O. & Sayek, I. Regenerative capacities of normal and cirrhotic livers following 70% hepatectomy in rats and the effect of alpha-tocopherol on cirrhotic regeneration. *J. Surg. Res.* **89**, 184–8 (2000).