



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

**EL MEDIADOR PRO-RESOLUTIVO MARESINA-1 ATENÚA EL DETERIORO
DE LA ARQUITECTURA HISTOLÓGICA Y EL PERFIL HEPÁTICO
ALTERADO EN MODELO DE FIBROSIS INDUCIDA POR
DIETILNITROSAMINA**

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

**AUTOR: GERARDO TOLOSA ROJAS
PROFESORA GUÍA: DRA. JÉSSICA ZÚÑIGA
PROFESORA CO-GUÍA: TM Mg. Cs. ROXANA ORREGO**

TALCA-CHILE

2019

CONSTANCIA

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



Talca, 2019

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
3. MARCO TEÓRICO	7
3.1. Hígado	7
3.1.1. Arquitectura hepática	7
3.1.2. Componentes del tejido hepático	7
3.2. Daño hepático	9
3.2.1. Importancia biomédica	9
3.2.2. Fibrosis hepática	10
3.3. Modelos de estudio de daño hepático	12
3.4. Ácidos grasos Omega-3	13
3.4.1. Maresina-1	14
3.4.1.1. Rol en el proceso inflamatorio de MaR-1	15
3.4.1.2. Rol a nivel hepático de MaR-1	16
3.4.1.3. Otras funciones de MaR-1	16
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos específicos	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1. Modelos animales	19
6.1.1. Modelo de fibrosis por dietilnitrosamina	19
6.1.2. Grupos y controles	20
6.1.3. Eutanasia	20
6.2. Evaluación del perfil histológico	21
6.2.1. Tinción elástica según Van Gieson	22
6.2.2. Tinción de Van Gieson	22
6.2.3. Tinción de PAS	23
6.2.4. Cuantificación de microfotografías	24
6.3. Evaluación del perfil hepático	25

6.3.1. Determinación de ALAT/ASAT	26
6.3.2. Determinación de albúmina	27
6.3.3. Determinación de ALP	27
6.3.4. Determinación de LDH	28
6.3.5. Determinación de γ -GT	28
6.4. Análisis estadístico	29
7. RESULTADOS	30
7.1. Curva de crecimiento	30
7.2. Análisis bioquímico	30
7.3. Análisis histológico	35
8. DISCUSIÓN	43
9. CONCLUSIÓN	49
10. BIBLIOGRAFÍA	50

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cambios histológicos en fibrosis hepática.	11
Figura 2. Rol resolutivo de MaR-1 en el proceso inflamatorio	15
Figura 3. Curva de crecimiento de los distintos grupos de ratas	30
Figura 4. Valores de transaminasas ALT y AST en muestras séricas de ratas de los diferentes grupos en estudio.	31
Figura 5. Valores de γ-GT en muestras séricas de ratas de los diferentes grupos en estudio	32
Figura 6. Valores de ALP en muestras séricas de ratas en los diferentes grupos en estudio	33
Figura 7. Valores de LDH en muestras séricas de ratas en los diferentes grupos en estudio	34
Figura 8. Valores de albúmina en muestras séricas de ratas en los diferentes grupos en estudio adaptadas al peso de cada animal	35
Figura 9. Cortes histológicos con tinción de Van Gieson, aumento 100X	36
Figura 10. Análisis histológico con tinción de Van Gieson	38
Figura 11. Cortes histológicos con tinción elástica según Van Gieson, aumento 100X	39
Figura 12. Análisis histológico con tinción elástica según Van Gieson	40
Figura 13. Cortes histológicos con tinción de PAS, aumento 100X	41
Figura 14. Análisis histológico con tinción de PAS	42

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mi familia por brindarme el apoyo necesario en todo mi proceso de formación universitaria y darme la oportunidad de estudiar. Agradecer a mi profesora guía, Jéssica Zúñiga, por darme la oportunidad de realizar esta investigación, a la profesora Roxana Orrego por ofrecer ayuda en momentos difíciles para el desarrollo de esta tesis y otorgar los insumos necesarios para los estudios bioquímicos. También agradezco a Fernando por brindarme los conocimientos necesarios para el trabajo en histología, su tiempo y dedicación, y a Nicole por ayudarme en el trabajo de muestras histológicas y por tener disposición de ayudarme y supervisar mi trabajo.

1. RESUMEN

La fibrosis hepática corresponde a una respuesta a daño agudo que permite limitar la noxa, recuperando la arquitectura y función hepática, sin embargo, ante un daño crónico este proceso se sostiene generando alteraciones en la arquitectura, provocando cirrosis y, finalmente, falla hepática. Recientemente se han descrito derivados de los ácidos grasos poliinsaturados, denominados mediadores prorresolutivos, dentro de los cuales se encuentra la molécula maresina-1(MaR-1). Estudios han demostrado la capacidad antiinflamatoria de MaR-1, junto a la restauración de moléculas antioxidantes a nivel hepático, pero sus funciones aún no están del todo claras. En esta memoria se analizaron los cambios en la arquitectura hepática y en el perfil hepático mediados por MaR-1 en modelos de fibrosis inducida por dietilnitrosamina (DEN). Se realizó análisis histológico hepático utilizando tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS), Van Gieson y elástica de Van Gieson. Se analizaron parámetros del perfil hepático: alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP), gammaglutamil transpeptidasa (γ -GT) y albúmina. Los análisis histológicos se realizaron en 5 campos a 40X de 4 cortes diferentes, observándose disminución en la alteración de la arquitectura hepática, tejido necrótico e integridad de la cápside, sin cambios significativos en la concentración de colágeno, fibras elásticas, infiltrado inflamatorio ni depósito de glucógeno al aplicar MaR-1 en ratones con fibrosis. Los parámetros hepáticos demostraron un aumento en las transaminasas y LDH al comparar grupos fibróticos respecto al tratamiento con MaR-1, sin variaciones significativas en las otras determinaciones. Los estudios permiten concluir que MaR-1 atenúa las alteraciones en la arquitectura hepática y estabiliza la cápside, junto con reducir la necrosis. Por otra parte, bioquímicamente no demuestra recuperar o aumentar la función hepática, sin embargo, un aumento de la LDH y transaminasas sugieren un proceso de regeneración hepática.

Palabras claves: Fibrosis hepática, maresina-1, arquitectura hepática, perfil hepático, agente prorresolutivo

2. INTRODUCCIÓN

El hígado desempeña múltiples funciones en el organismo de carácter metabólico, de almacenamiento, detoxificación, síntesis y degradación de compuestos, esenciales para un correcto funcionamiento y homeostasis. La falla a nivel de este órgano genera graves consecuencias a nivel sistémico, como por ejemplo la pérdida de síntesis de proteínas o factores de la coagulación y acumulación de sustancias tóxicas, jugando un rol esencial en la generación de enfermedades metabólicas. Frente al daño hepático causado por el alcohol, agentes virales o bacterianos, fármacos o patologías autoinmunes, el hígado puede limitar la noxa, recuperar su arquitectura y función mediante el proceso de fibrosis. En daño crónico la fibrosis tiende a sostenerse en el tiempo desencadenando alteraciones en el tejido, principalmente con pérdida de la arquitectura hepática y con compromiso de la función, promoviendo la cirrosis y finalmente, falla y colapso hepático.

Hoy en día se busca tratamiento a la fibrosis y posterior cirrosis en base a la reducción de producción de matriz extracelular (MEC), estimulación de la fibrolisis, o reducción del proceso inflamatorio que estimula la fibrosis. Una de las opciones, según estudios previos, son los ácidos grasos omega-3 y sus derivados, precursores de moléculas con alta actividad pro-resolutiva y anti-inflamatorias, lo que permitiría atenuar los efectos de la fibrosis.

Dentro de este grupo de moléculas se encuentra maresina-1, la cual se ha demostrado que presenta efectos beneficiosos a nivel hepático, capaz de reducir inflamación y atenuar el daño a la estructura del hígado, sin embargo, sus efectos y mecanismos de acción aún no están del todo claros.

Es por esta razón que en el presente proyecto de memoria se busca observar los cambios en la arquitectura histológica y perfil hepáticos que provoca la aplicación de maresina-1 ante una fibrosis, buscando aportar a la comprensión de los efectos que genera esta molécula.

3. MARCO TEÓRICO

3.1.Hígado

3.1.1. Arquitectura hepática

Desde el punto de vista funcional, el hígado puede ser dividido en dos unidades, el lobulillo y el acino hepático. Los lobulillos hepáticos poseen forma hexagonal, rodeando la vena central. En el vértice del lobulillo se encuentra una ramificación de la vena porta, una arteria hepática y un conducto biliar, conformando la triada portal. El acino hepático involucra ramificaciones desde los conductos porta, llegando sangre desde la vena porta y arteria hepática, proyectándose fenestraciones a través del acino. Existe una división funcional a nivel acinar que consta de tres zonas, zona periportal, zona medio-acinar y zona centrolobular (1).

3.1.2. Componentes del tejido hepático

Hepatocitos: Corresponden al mayor porcentaje de células constituyentes del hígado. Su lámina basal se encuentra enfrentada a las células epiteliales de los sinusoides hepáticos, mientras una o más regiones apicales se encuentran conformando conductos biliares. Dentro de sus funciones los hepatocitos periportales realizan gluconeogénesis, β -oxidación de ácidos grasos y síntesis de colesterol, mientras que los hepatocitos centrolobulares se encargan de la detoxificación y síntesis lipídica (2).

Células estrelladas hepáticas (HSCs): Las HSCs son células ubicadas en el subendotelio del espacio de Disse y presentan funciones de reservorio de retinoides y colágeno. Ante un estímulo nocivo estas experimentan una serie de cambios morfológicos y fenotípicos, aumentando la expresión de filamentos de α -actina del músculo liso (α -SMA, por su sigla en

inglés), otorgándoles capacidad contráctil. Además, se ve estimulada la producción de elementos de la MEC como proteoglicanos, glucosaminoglicanos y fibras de colágeno tipo I, estas últimas conforman bandas fibróticas en el hígado cirrótico, y una disminución de la fibrólisis, con producción conjunta de citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina (IL)-6 e IL-8 (3). Las HSCs también inducen la infiltración de células polimorfonucleares (PMN) amplificando el proceso inflamatorio, induciendo cambios arquitectónicos a nivel hepático llegando a afectar la función del hígado ante un daño crónico, lo que desencadena la cirrosis y finalmente la insuficiencia hepática (4).

Células de Küpffer (KCs): Las KCs corresponden a macrófagos residentes encargadas de la respuesta inmune a nivel hepático y sistémico. Ante estímulos nocivos, por ejemplo, infecciones virales o alcohol, las KCs producen citocinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral (TNF)- α , IL-1 β e IL-6 y factores profibróticos activando a las HSCs, mediando la lesión y reparación del tejido hepático (5). La producción de citocinas proinflamatorias y moléculas quimiotácticas como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1, por su nombre en inglés), en conjunto con enzimas como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la producción consecuente de factores profibróticos con activación de las HSCs hacen a las KCs actores clave en la fibrosis hepática crónica (6).

Dentro de los activadores de las KCs se encuentra el lipopolisacárido (LPS) de origen bacteriano, proteínas del complemento como C3a y C5a y betaglucono fúngico, entre otros. La exposición a LPS estimula a las KCs mediante el receptor Toll-like 4 (TLR4, por su sigla en inglés) aumentando la concentración de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e Interferón (INF)- γ (7).

Las KCs puede expresar diferentes fenotipos según el entorno en el que se encuentre, en el caso de estar en un ambiente proinflamatorio se observa el fenotipo proinflamatorio M1 activado, en donde existe la unión de ligandos como INF- γ y LPS que estimulan la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs), NOS y liberación de citocinas proinflamatorias. Por otro lado, ante el estímulo de IL-4 e IL-13 se da origen al fenotipo M2,

el cual promueve la remodelación tisular y presenta funciones inmunorreguladoras produciendo ornitina y poliaminas, procesos involucrados en la resolución del proceso inflamatorio (8).

Sinusoides: Los sinusoides corresponden a conductos vasculares fenestrados que contienen HSCs, KCs y células natural killer (NK). Las células endoteliales y los hepatocitos no presentan una membrana basal que los separe, sino que se encuentra entre ellos el espacio de Disse, una zona que permite el flujo y dispersión de sangre rica en oxígeno, nutrientes y factores proinflamatorios provenientes de la triada portal y dispersándose a través del tejido hepático (9).

3.2. Daño hepático

3.2.1. Importancia biomédica

Hoy en día la fibrosis hepática y cirrosis corresponden a un gran problema de salud pública, presentando una alta morbilidad y mortalidad, siendo causados principalmente por el consumo excesivo de alcohol, en conjunto con la obesidad.

En Europa, la cirrosis hepática causa aproximadamente 170.000 muertes al año, representando el 1,8% de todas las muertes en dicho continente. El alcoholismo en conjunto con el hígado graso no alcohólico representa el 66% de las causas de esta patología, siendo más frecuente en hombres. La edad, circunferencia abdominal y presencia de anticuerpos anti-HVC son factores de riesgo (10).

En los Estados Unidos la prevalencia de cirrosis corresponde a un 0,27%, presentando un porcentaje elevado de individuos que ignoraban que padecían dicha enfermedad. En este país

destaca la infección por VHC como principal causa de la enfermedad, atribuible al 53,5% de los casos (11). Latinoamérica y el Caribe presentan la mayor tasa de mortalidad asociada a cirrosis hepática en el periodo 1980 – 2010. La Zona Andina Latinoamericana presentó, para el año 2010, aproximadamente 1.000.000 de muertes por esta patología. Chile reportó cerca de 4000 muertes asociadas, número que ha ido aumentando respecto a años anteriores.(12)

3.2.2. Fibrosis hepática

La fibrosis hepática corresponde a un mecanismo reversible en respuesta a daño hepático causado por la exposición a diferentes agentes nocivos como alcohol, infecciones virales o bacterianas, xenobióticos, patologías como la hemocromatosis o de carácter autoinmune. Este proceso limita el daño agudo y permite que se restaure la masa y arquitectura hepática, caracterizándose por acumulación de MEC producida por las HSCs activadas, que fenotípicamente se asemejan a miofibroblastos (13). Sin embargo, ante un daño crónico el acúmulo de MEC conlleva a la pérdida de la arquitectura hepática, llegando a producir cirrosis, la cual se caracteriza por la formación de nódulos parenquimatosos, bandas fibrosas y distorsión vascular. Factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (FCF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por su sigla en inglés) estimulan la proliferación de HSCs, además de un aumento en la expresión de receptores para estos factores a nivel celular. También existe aumento en la concentración de sustancias quimioatrayentes como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP) provocando un aumento en la migración de HSCs activas, generados en respuesta al daño hepático (14). El aumento del número de HSCs activas conlleva a un aumento en la producción de fibras de colágeno tipo I (col-I), esto debido principalmente a factores como el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$, por su sigla en inglés) cuyos principales mecanismos de acción involucran la producción de EROs y cascadas de señalización vía segundos mensajeros asociados a factores de crecimiento (SMAD2/3 por su nombre en inglés) (15). Estos estímulos traen como consecuencia un aumento en la síntesis de fibras col I, proteoglicanos y glucosaminoglicanos, depositándose en el espacio de Disse, promoviendo a la aparición de septos, pérdida de las fenestraciones de los capilares por oclusión y por ende, disminución de la vascularización a nivel de sinusoides (16), lo cual es representado en la figura 1.

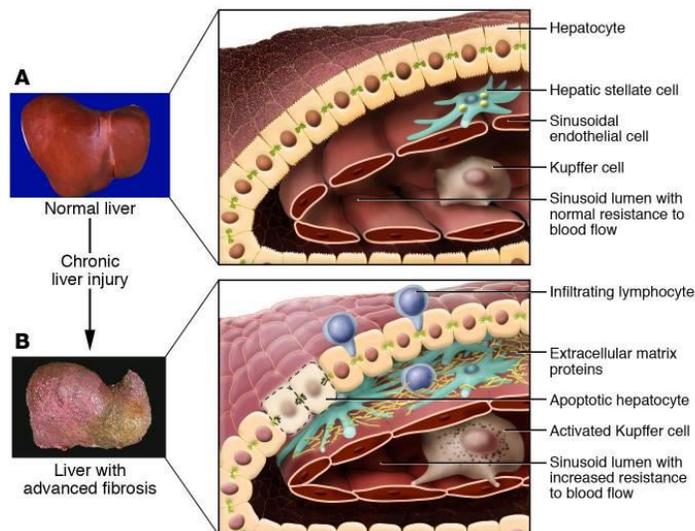


Figura 1 – Cambios histológicos en fibrosis hepática. Se observa que en el tejido normal (A) no existe infiltración y una baja concentración de fibras colágenas y HCs activas. En el tejido fibrótico (B) Hay abundantes fibras de colágeno, infiltrado y HCs activas. Tomado de *Liver fibrosis*. Bataller, R & Brenner, D. 2005

Otro fenómeno que ocurre durante el proceso fibrótico es el aumento de fibras contráctiles a nivel de las HSCs activas, principalmente α -actina y miosina, lo que provoca que esta célula responda a sustancias vasoconstrictoras como la endotelina-1 o angiotensina II, trayendo como consecuencia hipertensión portal (17).

Las HSCs también se encargan de la remoción del exceso de MEC, paso que ocurre en la última etapa del proceso fibrótico en daño agudo e involucra a metaloproteasas de matriz (MMP, por su sigla en inglés), por ejemplo, MMP-1 degrada fibras de colágeno tipo I. En la progresión de la fibrosis estas enzimas son inhibidas por los inhibidores de metaloproteasas (TIMP, por su sigla en inglés), siendo producidas con la finalidad de acumular MEC y evitar su degradación prematura. En condiciones de daño agudo existe un equilibrio entre ambos elementos, sin embargo, en condiciones crónicas, la fibrosis persiste y existe un aumento de la concentración de TIMPs. TIMP-1 a su vez presenta efectos antiapoptóticos a nivel de la HSC, lo que incrementa su supervivencia y favorece el acúmulo de MEC.(4)

3.3. Modelos de estudio de daño hepático

Con la finalidad de poder estudiar las patologías hepáticas y poder investigar posibles sustancias con actividad protectora, se han planteado una gran cantidad de modelos de daño hepático, tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*. De estos últimos se puede destacar el modelo de ligación del conducto biliar, isquemia reperfusión y modelos por daño químico, estos últimos se realizan mediante la administración de sustancias hepatotóxicas de forma continua y tiene como finalidad emular los daños observados en la fibrosis hepática. Los modelos más utilizados son:

- I) **Administración de tetracloruro de carbono (CCl₄):** Corresponde a uno de los mejores modelos de fibrosis hepática utilizado en investigación, permitiendo estudiar los cambios en arquitectura y en el perfil hepático. Se administra vía intraperitoneal (*i.p*) o intramuscular (*i.m*) en baja dosis para la producción de fibrosis. Para el estudio de cirrosis se requiere administración constante, obteniéndose el efecto deseado después de dos o más meses (18). En Chile no se puede utilizar este modelo debido a la prohibición de uso de clorofluorocarbonados por su efecto sobre la capa de ozono, según lo dictamina el Convenio de Viena para la protección de la Capa de Ozono del año 1987.(19)

- II) **Administración de Dietilnitrosamina (DEN):** Las nitrosaminas presentan efectos hepatotóxicos agudos al aplicarse por vía oral o parenteral a roedores, trayendo como consecuencia fibrosis o hepatocarcinoma, siendo efectivo a bajas dosis (20). El mecanismo de acción de esta molécula se basa en la formación de ion etildiazonio, cuya naturaleza electrofílica le permite reaccionar con las bases nitrogenadas del ADN. Además, los productos de degradación de DEN, que corresponden a bases

nitrogenadas metiladas contribuyen a la inestabilidad del ADN y al desarrollo de hepatocarcinoma (21).

Este último es el modelo propuesto y que fue utilizado para los estudios llevados a cabo en esta memoria.

3.4. Ácidos grasos Omega-3

Hoy en día el consumo de dietas ricas en ácidos grasos omega (ω)-3 y ω -6 está asociado a múltiples efectos beneficiosos en la población, como lo es la reducción del riesgo cardiovascular, esto debido a la disminución de la síntesis de triglicéridos y aumento del tamaño de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por su nombre en inglés)(22), o disminución de la esteatosis en pacientes con hígado graso no alcohólico (NAFLD, por su sigla en inglés) (23). Por esta razón es que en esta presente memoria se propone estudiar moléculas derivadas de estos ácidos grasos.

Los ácidos grasos omega-3 (ω -3) corresponden a un grupo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por su sigla en inglés) cuyo primer doble enlace se ubica a 3 carbonos respecto al carbono terminal de la molécula, denominado carbono omega. Los ácidos grasos ω -3 se incorporan en la alimentación, entre ellos se encuentran el ácido α -linoleico (ALA, por su sigla en inglés), el ácido eicosapentaenoico (EPA, por su sigla en inglés) y el ácido docosahexanoico (DHA, por su sigla en inglés) (24). ALA es un nutriente esencial, pues no puede ser sintetizado en el organismo y es precursor de EPA y DHA (25). DHA corresponde a uno de los ácidos grasos esenciales que componen el tejido cerebral otorgando flexibilidad a las membranas neuronales, terminales axónicas y células de la retina. Se ha demostrado que animales con déficit de DHA presentan retraso cognitivo y disminución de la agudeza visual (26). También se ha observado que DHA disminuye los niveles de lípidos a nivel hepático en la NAFLD, evitando la esteatosis no alcohólica (NASH, por su sigla en inglés) y la fibrosis derivada de NASH (27).

Dentro del proceso inflamatorio, los PUFA ω -3 presentan varias funciones ya estudiadas y establecidas, sin embargo, recientemente se ha descrito que de estos deriva una nueva familia de compuestos denominados mediadores pro-resolutivos (SPM, por su sigla en inglés). Los SPM son moléculas generadas por acción de lipooxigenasas (LOX) y ciclooxigenasas (COX) y presentan un efecto resolutorio del proceso inflamatorio. Dentro de esta familia se encuentran las resolvinas (Rvs), protectinas y maresinas (MaR) (28). EPA permite la producción de Rv-E (serie E), mientras que DHA permite la producción de Rv-D (serie D), protectinas y MaR. Estas moléculas han demostrado un potente efecto antiinflamatorio y resolutorio sobre modelos de inflamación y sepsis (29).

3.4.1. Maresina-1

El ácido 7R-14S-dihidroxi-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z doxosahexanoico o Maresina-1 (MaR-1) corresponde a una molécula derivada de ácidos grasos poliinsaturados, específicamente del DHA, sintetizada por macrófagos. La síntesis de MaR-1 se observa durante procesos inflamatorios agudos, utilizando las reservas de DHA del organismo, las que junto a EPA permiten la obtención de Rvs y protectinas, moléculas con propiedades similares a las atribuidas a MaR-1. El DHA es convertido mediante la LOX-15 en ácido 14-hidroperoxidodocohecanoico (14-HDHA), seguido de una reducción a 14S-HDHA, molécula marcadora de actividad de la vía de lipooxigenación, seguido de una serie de epoxidaciones a nivel de macrófago hasta llegar a la formación de MaR-1 (30). También se ha descrito que existe síntesis de MaR-1 a nivel plaquetario durante el proceso inflamatorio, donde está involucrada la interacción entre las plaquetas y los PMN, activando la vía de la LOX-15 (31).

3.4.1.1. Rol en el proceso inflamatorio de MaR-1

Ante un proceso inflamatorio existe, desde el punto de vista inmunológico, infiltración de PMN en el sitio afectado, seguido por los macrófagos en respuesta a la producción de citocinas proinflamatorias. Los macrófagos sintetizan MaR-1 utilizando las reservas de DHA del organismo, impidiendo que continúe el infiltrado de PMN y aumentando la actividad fagocítica de los macrófagos contribuyendo a la eliminación de células apoptóticas y en proceso de necrosis (32), tal como se representa en la figura 2. MaR-1 también reduce la producción de citocinas proinflamatorias, como TNF- α , lo que ha demostrado tener efecto en la expresión de moléculas de adhesión, como moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1), P-selectina y CD24, lo que disminuye el infiltrado y reclutamiento de PMN, efecto demostrado en modelos de inflamación pulmonar inducida por LPS.(33)

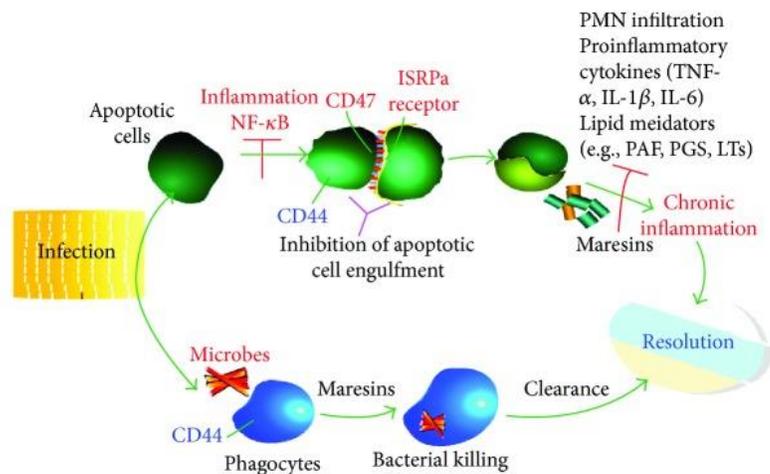


Figura 2 – Rol resolutivo de MaR-1 en el proceso inflamatorio. Se representa la acción de MaR-1 al disminuir el infiltrado inflamatorio y aumento en la acción fagocitaria de los macrófagos Tomada de *Maresins: Specialized Proresolving Lipid Mediators and Their Potential Role in Inflammatory Related Diseases*. Tang, S *et al.* 2018

3.4.1.2. Rol a nivel hepático de MaR-1

A nivel de hígado se ha observado que MaR-1 ejerce efectos antiinflamatorios principalmente vía disminución de la traslocación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB) desde el citoplasma hacia el núcleo lo que disminuye la producción de citocinas proinflamatorias (34). También se ha observado la restauración de los niveles de catalasa, superóxido dismutasa y glutatión reducido, además de una disminución en la producción de EROs y peroxidación lipídica (35).

Otro efecto de MaR-1 a nivel hepático es la reducción en la incorporación de triglicéridos a nivel hepático, además de una reducción en el estrés de retículo a nivel de tejido, esto mediante una reducción en la concentración de Ca^{+2} citoplasmático por un aumento en la expresión de SERCA2b y aumento del factor inducible por hipoxia 1α (HIF-1α, por su nombre en inglés), evitando así la activación de la apoptosis (36).

3.4.1.3. Otras funciones de MaR-1

Se ha evidenciado que la exposición a MaR-1 en distintos modelos de planaria aumenta la regeneración tisular, además de concluirse que este organismo sintetiza de manera natural esta molécula en el proceso regenerativo. También se ha demostrado que MaR-1 atenúa el dolor mediante el bloqueo del receptor TRPV1, el que está involucrado en la percepción del dolor (37). Otros estudios han permitido observar que MaR-1 provoca una reducción de la carga bacteriana y LPS en cuadros de septicemia, disminuyendo el daño hepático y renal consecuente a este proceso (29).

Los resultados que se desprendan de esta investigación aportarán información que permitirá comprender los efectos de MaR-1 en el tejido hepático y su potencial rol protector

frente a la fibrosis, los que aún no han sido descritos por completo, dando una potencial alternativa terapéutica frente al daño crónico hepático.

4. HIPÓTESIS

El agente proresolutivo maresina-1 atenúa los cambios en la arquitectura hepática y alteraciones en el perfil hepático, frente al daño por fibrosis hepática

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

1. Evaluar el efecto del agente proresolutivo maresina-1 sobre la fibrosis hepática en modelos de ratones tratados con DEN

5.2. Objetivos específicos

1. Determinar los cambios histopatológicos mediados por el agente proresolutivo maresina-1 frente al daño por fibrosis hepática inducida por dietilnitrosamina
2. Analizar el perfil hepático en muestras séricas los cambios generados por la administración de maresina-1 frente a daño hepático por fibrosis hepática inducida por dietilnitrosamina

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Modelos animales

Ratas macho cepa Sprague-Dawley de una semana de edad fueron obtenidos desde el Bioterio de la Universidad de Talca, Dirección de Investigación, Universidad de Talca. Los animales fueron criados y mantenidos en el Bioterio de la Universidad de Talca, en una jaula con un máximo de 4 ejemplares. Fueron alojadas en una habitación con temperatura controlada con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas con aire acondicionado a 25°C, estas tuvieron acceso libre a la dieta comercial Champion S.A y agua *ad libitum*. Durante el periodo de tratamiento se observó el comportamiento de las ratas, color de pelaje y color de deposiciones, se controló que la alimentación sea la adecuada y se pesó a todos los animales a lo menos una vez a la semana para asegurar un adecuado crecimiento y generar ajuste de dosis mientras durara el tratamiento. El protocolo animal fue autorizado por la Comisión de Bioética CIEQUAL de la Universidad de Talca, respetándose en todo momento las normas internacionales (European Union Regarding Animal Experimentation. European Council 86/609/EC).

6.1.2. Modelo de fibrosis por dietilnitrosamina

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

6.1.3. Grupos y controles

El control de fibrosis recibió DEN sin administración de MaR-1 (Cayman Chemical, E.U.A). Desde el comienzo del experimento los grupos de tratamiento se inyectaron dos veces a la semana con MaR-1 (70 ng/ MaR-1 por animal). Para propósito de este estudio, los animales se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos (n=16 total):

1. Grupo control: etanol 0,025% en solución salina (vehículo MaR-1) + NaCl 0,15 M (vehículo DEN) (n=4)
2. Grupo daño (DEN): etanol 0,025% en solución salina (vehículo MaR-1) + DEN (n=4)
3. Grupo control de tratamiento (MaR-1 + vehículo): MaR-1 + 0,15 M NaCl (vehículo DEN) (n=4)
4. Grupo tratamiento (MaR-1 + DEN): MaR-1 + DEN (n=4)

6.1.4. Eutanasia

Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con una mezcla de anestésicos-sedantes (acepromacina 1ml/Kg, xilazina 3 mg/kg y ketamil 15-20 mg/kg peso vivo). Se verificó inconciencia mediante detección del reflejo pedal. Posteriormente se ubicaron sobre una plataforma quirúrgica para roedores y se realizó una incisión del abdomen y tórax del animal (apertura de línea alba), con la finalidad de exponer el hígado y corazón, extrayéndose de 3 a 5 ml de sangre por punción cardiaca y retirando completamente el hígado, ambas maniobras generaron hipovolemia con hipotensión y la muerte posterior del animal. Si durante el proceso el animal no mostraba signos de sedación se administró un refuerzo de anestesia (20 – 25% de la dosis original), para asegurar que el animal no sufriera durante el proceso de extracción de la muestra.

Una vez extraído el hígado, se procedió a pesar el órgano en una balanza analítica con la finalidad de determinar el índice hepático (índice hepático = [peso hepático/peso corporal] x

100%), para luego cortar diferentes lóbulos; las fracciones fueron almacenadas de la siguiente manera: 1) frasco con formalina al 10%, 2) tubo para almacenamiento a -80°C hasta experimentación. La sangre extraída por punción cardiaca se depositó en un tubo sin anticoagulante y se dejó en reposo por 24 horas a 4°C con la finalidad de que sedimente por gravedad y luego se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, se extrajo el suero y se almacenó a -20°C.

Todas las ratas recibieron atención humanitaria de conformidad con las directrices de la Universidad de Talca, los procedimientos de animales y protocolo experimentales fueron cumplidos con la declaración ética en este proyecto, la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

6.2. Evaluación del perfil histológico

Se obtuvieron muestras histológicas utilizando el hígado de los animales de cada grupo. Para ellos se sacó un trozo de hígado correspondiente al lóbulo mayor, se puso en un molde y se sometió a proceso de fijación utilizando alcohol y xilol a concentraciones crecientes, con el fin de mantener estructuras celulares e histológicas. Posteriormente, de manera continuada, se incluyó la muestra utilizando parafina, proceso que permite mantener la integridad del tejido. Una vez terminados los procesos anteriores se realizaron cortes finos de 5 µm utilizando un micrótopo Leica RM2235 (Alemania), realizándose 9 cortes por muestra, utilizando 3 cortes por tinción. Se aplicó tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS), Van Gieson y elástica de Van Gieson (Merck, E.U.A)

Se tomaron fotografías por medio de microscopía óptica (NIKON ECLIPSE 50i, E.U.A) utilizando el software Micrometrics SE Premium™, tomando 5 fotografías por muestra en objetivo 10X a un total de 4 muestras por grupo.

6.2.1. Tinción elástica según Van Gieson

Las muestras histológicas se sometieron a una desparafinización, pasándose por alcoholes de graduación descendente. Posteriormente, se introdujo en solución de elastina de Weigert, resorcina y fucsina por 10 minutos, luego se lavó por un minuto con agua potable y se sumergió en agua destilada. Se introdujo en solución de hematoxilina férrica de Weigert por cinco minutos con lavado posterior en agua potable. Después se sumergió en solución de picrofucsina de Van Gieson por dos minutos. Luego se sometió a proceso de deshidratación pasándose por alcoholes de concentraciones ascendentes por un minuto por alcohol, terminando en dos soluciones de xilol por cinco minutos cada una. Finalmente se sumergió en xilol de montaje, se aplicó medio de montaje no acuoso y se colocó un cubreobjetos. Se observó la integridad de la muestra y la calidad de la tinción al microscopio OLYMPUS CX31 con objetivo 40X e inmersión.

Para la tinción elástica según Van Gieson los cortes fueron analizados de acuerdo con la cantidad de fibras elásticas en el tejido, siendo evaluadas en forma cualitativa utilizando desde una a tres cruces (+ a +++). Se analizaron cinco campos por cada muestra en 40X.

6.2.2 Tinción de Van Gieson

Las muestras histológicas se sometieron a una desparafinización, pasándose por alcoholes de graduación descendente. Posteriormente se introdujo en solución de hematoxilina férrica de Weigert por 10 minutos y se lavó con agua potable por 5 minutos, para después sumergir en solución de picrofucsina de Van Gieson por 4 minutos. Luego se sometió a proceso de deshidratación pasándose por alcoholes de concentraciones ascendentes, 1 minuto por alcohol, terminando en 2 soluciones de xilol por 5 minutos cada una. Finalmente se sumergió en xilol de montaje, se aplicó medio de montaje no acuoso y se colocó un cubreobjetos. Se observó la integridad de la muestra y la calidad de la tinción al microscopio OLYMPUS CX31 con objetivo 40X e inmersión.

Para la tinción de Van Gieson los cortes fueron analizados de acuerdo con la citoarquitectura del tejido, depósito de fibras colágenas, integridad de la cápside hepática y necrosis, siendo evaluados en forma cualitativa utilizando desde 1 a 3 cruces (+ a +++). Se analizaron 5 campos por cada muestra en 40X.

6.2.3 Tinción de PAS

Las muestras histológicas se sometieron a una desparafinización, pasándose por alcoholes de graduación descendente. Se lavó con agua destilada y se aplicó ácido peryódico dejando reaccionar por 10 minutos, lavando nuevamente para aplicar reactivo de Schiff, por 20 minutos. Se lavó nuevamente para aplicar solución de potasio bisulfito por dos minutos. Se eliminó el exceso de solución y, sin lavar, se depositó solución fijadora, dejándola actuar por dos minutos. Se procedió a lavar con agua destilada para luego aplicar hematoxilina de Mayer por tres minutos. Luego se lavó por cinco minutos con agua potable, después se deshidrató aplicando alcoholes a concentraciones ascendentes por un minuto por alcohol, terminando en dos soluciones de xilol por cinco minutos cada una. Finalmente, se sumergió en xilol de montaje para proceder a montar las muestras, se aplicó medio de montaje no acuoso y se colocó un cubreobjetos. Se observó la integridad de la muestra y la calidad de la tinción al microscopio OLYMPUS CX31 con objetivo 40X e inmersión.

Para la tinción de PAS, los cortes fueron analizados de acuerdo con los depósitos de glucógeno, considerado PAS positivo, e infiltrado inflamatorio, siendo evaluadas en forma cualitativa desde una a tres cruces (+ a +++). Se analizaron cinco campos por cada muestra en 40X.

6.2.4. Cuantificación de microfotografías

Para la cuantificación histológica se utilizaron patrones de arquitectura y necrosis en base a la tinción de Van Gieson, e inflamación en base a la tinción de PAS, de acuerdo con el score de Korourian (38), con la siguiente pauta:

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

- b) Para inflamación: sin infiltración de PMN o monocitos = 0; focos ocasionales de células inflamatorias = 1; focos ampliamente dispersos o focos organizados de células inflamatorias = 2; amplia ocurrencia y grandes focos inflamatorios = 3.

- c) Para arquitectura: arquitectura normal = 0; pequeñas áreas de pérdida de la arquitectura, con o sin ruptura del endotelio vascular = 1; focos con pérdida de la arquitectura hepática medianos = 2; focos ampliamente dispersos con gran pérdida de la arquitectura, con o sin pérdida del endotelio vascular = 3.

Para la cuantificación histológica se utilizaron patrones de fibras colágenas e integridad de cápside hepática usando la tinción de Van Gieson y patrón de fibras elásticas usando la tinción elástica según Van Gieson con una puntuación basada en el score de Ishak (39), con la siguiente pauta:

- a) Para fibras colágenas: fibras colágenas normales = 0; fibras colágenas se extienden desde la vena central sin formar septos = 1; fibras se ramifican a través del tejido sin formar septos = 2; fibras en gran concentración con formación de septos = 3.

- b) Para fibras elásticas: fibras elásticas ausentes en tejido hepático = 0; fibras elásticas escasas en tejido sin formar septos = 1; fibras abundantes en tejido sin formar septos = 2; fibras en gran concentración con formación de septos = 3.

- c) Para integridad de la cápside: Cápside continua de grosor normal = 0; cápside con pequeñas zonas discontinuas sin disminución del grosor = 1; cápside con zonas discontinuas, separadas del tejido con disminución del grosor = 2; cápside con amplias zonas separadas del tejido, con disminución del grosor = 3.

Para la cuantificación de depósitos de glucógeno se hizo un score basado en la positividad a PAS y extensión de las áreas reactivas, con la siguiente pauta:

- a) Depósitos de glucógeno: Zonas escasas PAS positivo o ausentes = 0; Pequeñas zonas PAS positivas dispersas = 1; Zonas medianas PAS positivas dispersas u homogéneas = 2; Zonas extensas PAS positivas homogéneas = 3.

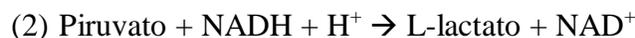
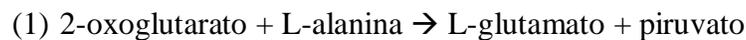
6.3 Evaluación de perfil hepático

Se utilizó el suero de las muestras de sangre arterial extraídas de las ratas, midiéndose las transaminasas, alanino aminotransferasa y aspartato aminotransferasa (ALAT/ASAT), albúmina, fosfatasa alcalina (ALP), lactato deshidrogenasa (LDH) y gamma-glutamil transpeptidasa (γ GT).

6.3.1 Determinación de ALAT/ASAT

Se utilizó kit Human prueba liquiUV® (Human, Alemania, 2018), método IFCC para la determinación de los niveles séricos de ALAT/ASAT de los diferentes grupos. Se reconstituyó el reactivo de trabajo mezclando solución de sustrato con solución de reactivo enzimático en proporción 1:4. Luego se tomaron 40 µl de muestra y se mezclaron con 400 µl de reactivo de trabajo, incubando un minuto a 37 °C para después determinar las absorbancias a 340 nm en espectrofotómetro Photometer PM-51 (BOECO, Alemania) a intervalos de un minuto por 5 minutos. Se calculó la diferencia de absorbancia por minuto ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$), analizando el coeficiente de variación, siendo aceptable menor a 10. Se multiplicó $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ por 1745, valor indicado por el fabricante, para obtener la concentración de ALAT/ASAT. La determinación de cada aminotransferasa se realizó de manera independiente.

La determinación de ALAT se basa en las siguientes reacciones, donde (1) es catalizada por la ALAT presente en la muestra, mientras que (2) es catalizada por la lactato deshidrogenasa presente en el reactivo enzimático. El paso de $\text{NADH} + \text{H}^+$ a NAD^+ es directamente proporcional a la cantidad de ALAT en la muestra, permitiendo así su cuantificación:



La determinación de ASAT se basa en las siguientes reacciones, donde (1) es catalizada por la ASAT presente en la muestra, mientras que (2) es catalizada por la malato deshidrogenasa presente en el reactivo enzimático. El paso de $\text{NADH} + \text{H}^+$ a NAD^+ es directamente proporcional a la cantidad de ASAT en la muestra, permitiendo así su cuantificación:



6.3.2 Determinación de albúmina

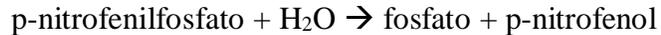
Se utilizó kit Human Albumin liquicolor de Human® (Human, Alemania 2018), método BCG, para la determinación de los niveles séricos de albúmina de los diferentes grupos. Se realizó la medición frente a un blanco reactivo por serie y un estándar de 4 g/dl. En cada tubo se agregó 1000 µl de reactivo, y 10 µl de la muestra a analizar a excepción del blanco reactivo. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se midió absorbancia a 546 nm en espectrofotómetro Photometer PM-51 (BOECO, Alemania). Se calculó la concentración de albúmina comparando la absorbancia de la muestra con la del estándar.

La determinación de los niveles de albúmina se basa en la formación de complejo coloreado entre la albúmina y el verde de bromocresol en presencia de buffer citrato, el cual presenta una absorbancia proporcional a la concentración de albúmina en la muestra.

6.3.3 Determinación de ALP

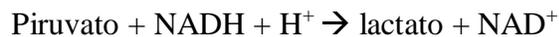
Se utilizó kit Human Alkaline Phosphatase liquicolor® (Human, Alemania, 2018) para la determinación de los niveles séricos de ALP de los diferentes grupos. Se reconstituyó el reactivo de trabajo mezclando solución de sustrato con solución de reactivo enzimático en proporción 1:4. Luego se tomaron 20 µl de muestra y se mezclaron con 1000 µl de reactivo de trabajo, incubando un minuto a 37 °C para después determinar las absorbancias a 405 nm en espectrofotómetro Photometer PM-51 (BOECO, Alemania) a intervalos de un minuto por 5 minutos. Se calculó $\Delta\text{Abs}/\text{min}$, analizando el coeficiente de variación, siendo aceptable menor a 10. Se multiplicó $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ por 2747, factor estipulado por el fabricante, para

determinar los niveles séricos de ALP. La determinación de los niveles de ALP se basa en la siguiente reacción, la cual es catalizada por la ALP presente en la muestra:



6.3.4 Determinación de LDH

Se utilizó kit Human prueba liquiUV® (Human, Alemania, 2018) para la determinación de los niveles séricos de LDH de los diferentes grupos. Se reconstituyó el reactivo de trabajo mezclando solución de sustrato con solución de reactivo enzimático en proporción 1:4. Luego se tomaron 10 µl de muestra y se mezclaron con 1000 µl de reactivo de trabajo, incubando un minuto a 37 °C para después determinar las absorbancias a 340 nm en espectrofotómetro Photometer PM-51 (BOECO, Alemania) a intervalos de un minuto por 5 minutos. Se calculó $\Delta\text{Abs}/\text{min}$, analizando el coeficiente de variación, siendo aceptable menor a 10. Se multiplicó $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ por 16030, factor estipulado por el fabricante, para obtener la concentración de LDH. La determinación de LDH se basa en la siguiente reacción, catalizada por la LDH de la muestra:

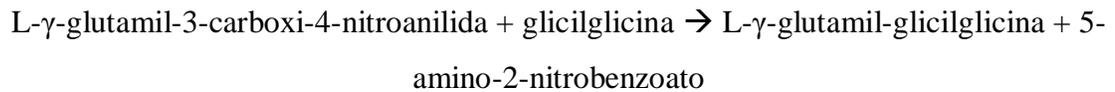


6.3.5 Determinación de γ -GT

Se utilizó kit Human γ -GT liquicolor® (Human, Alemania, 2018) para la determinación de los niveles séricos de γ -GT de los diferentes grupos. Se reconstituyó el reactivo de trabajo mezclando solución de sustrato con solución de reactivo enzimático en proporción 1:4. Luego se tomaron 40 µl de muestra y se mezclaron con 400 µl de reactivo de trabajo, incubando un minuto a 37 °C para después determinar las absorbancias a 405 nm en espectrofotómetro Photometer PM-51 (BOECO, Alemania) a intervalos de un minuto por 5 minutos. Se calculó

$\Delta\text{Abs}/\text{min}$, analizando el coeficiente de variación, siendo aceptable menor a 10. Se multiplicó $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ por 1158, factor estipulado por el fabricante, para obtener la concentración de γ -GT sérica.

La determinación de los niveles de γ -GT se basan en la siguiente reacción, la que es catalizada por la γ -GT presente en la muestra:



6.4 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante la determinación de la media $\pm\text{DE}$ para cada grupo experimental. Los datos fueron tratados mediante análisis de t-student seguido de Mann-Whitney como post-test, el software utilizado fue Graph PAD Prism 6.0 (La Jolla, A, EUA). Se considera un $p < 0,05$ como significativo.

7. RESULTADOS

7.1 Curva de crecimiento

El análisis del peso promedio de cada grupo en estudio no presentó diferencias significativas, tal como se muestra en la figura 3, iniciando con 100 grs promedio en todos los grupos y finalizando, después de 4 semanas, con un peso promedio de 300 grs.

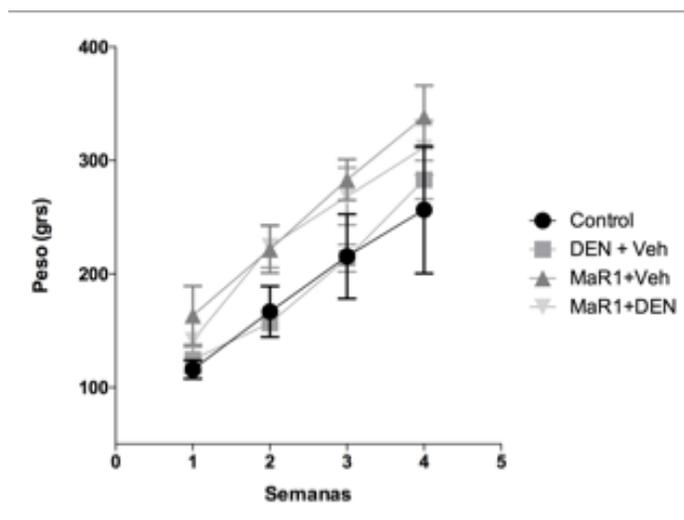


Figura 3. Curva de crecimiento de los distintos grupos de ratas. El peso fue determinado una vez por semana por un periodo de 4 semanas. Los valores son expresados como el promedio \pm DE para 4 animales por grupo experimental

7.2 Análisis bioquímico

Al analizar los niveles séricos de transaminasas (figura 4A), existe un aumento estadísticamente significativo en los niveles de ALT al comparar el grupo MaR-1 + DEN con el grupo fibrótico (DEN) ($p = 0,0079$), La media del grupo con tratamiento fue de 169 U/L y la del grupo DEN fue de 41 U/L. Al comparar MaR-1 + DEN con el resto de los grupos se observa un aumento estadísticamente significativo: MaR-1 + DEN vs Control y MaR-1 + DEN vs Veh + MaR-1, con valores p ($p = 0,0079$) y ($p = 0,0079$) respectivamente. No se

observaron diferencias significativas al comparar el resto de los grupos entre sí. Los niveles de AST en suero fueron ensayados para todos los grupos experimentales.

En la figura 4B se observa que existe un aumento estadísticamente significativo en los niveles de AST al comparar el grupo MaR-1 + DEN con el grupo fibrótico ($p = 0,0079$). La media del grupo con tratamiento corresponde a 151 U/L, mientras que la del grupo fibrótico corresponde a 60 U/L. Al comparar el grupo tratamiento con el grupo control y Veh + MaR-1 se observaron diferencias significativas, ($p = 0,0159$) y ($p = 0,0079$) respectivamente.

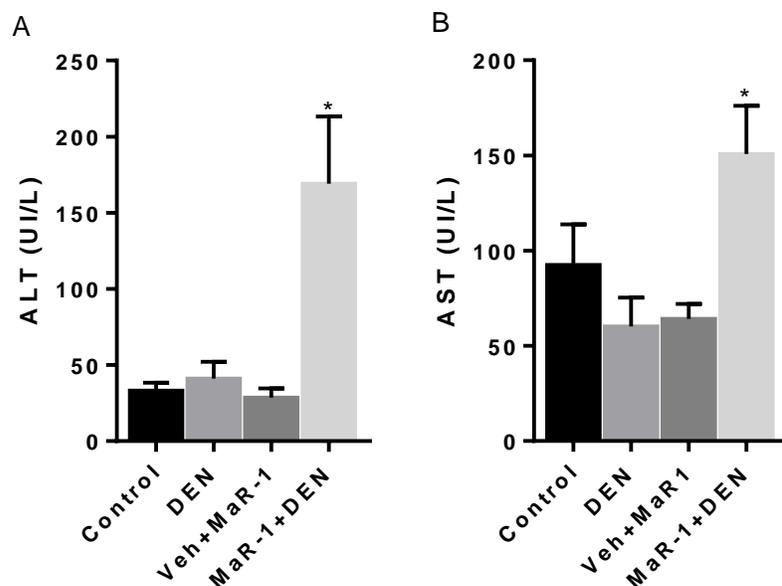


Figura 4. Valores de transaminasas ALT y AST en muestras séricas de ratas de los diferentes grupos en estudio. Los valores son expresados como el promedio \pm DE para 4 animales por grupo experimental. Análisis estadístico de t-student seguido de Mann-Whitney post test, considerando (*) $p < 0,05$ como significativo, respecto a DEN.

Los valores de γ -GT (figura 5) mostraron una disminución significativa entre el grupo MaR-1 + DEN y los demás grupos, control, DEN y Veh + MaR-1, ($p = 0,0079$), ($p = 0,0022$) y ($p = 0,0022$) respectivamente. Los valores de γ -GT fueron el doble en todos los grupos en comparación al grupo en tratamiento.

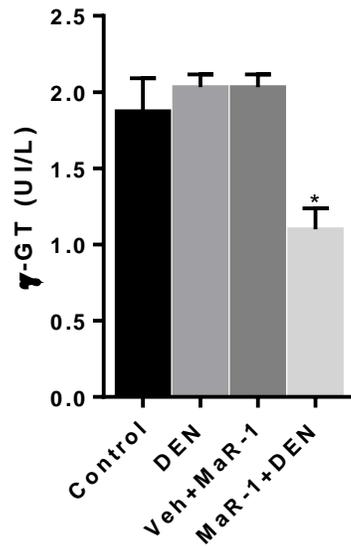


Figura 5. Valores de γ -GT en muestras séricas de ratas de los diferentes grupos en estudio. Los valores son expresados como promedio \pm DE para 4 animales por grupo experimental. Análisis estadístico de t-student seguido de Mann Whitney post test, considerando (*) $p < 0,05$ como significativo, respecto a los demás grupos en estudio.

Se determinaron los niveles de ALP en los diferentes grupos en estudio (figura 6), observándose diferencias significativas entre el grupo control y el DEN ($p = 0,0079$), con medias de 561 U/L y 821 U/L respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre el grupo tratado con MaR-1 y DEN ($p = 0,6667$), ni entre control y Veh + MaR-1 ($p = 0,6429$). No existen diferencias significativas entre el grupo MaR-1 + DEN y Veh + DEN ($p = 0,1032$).

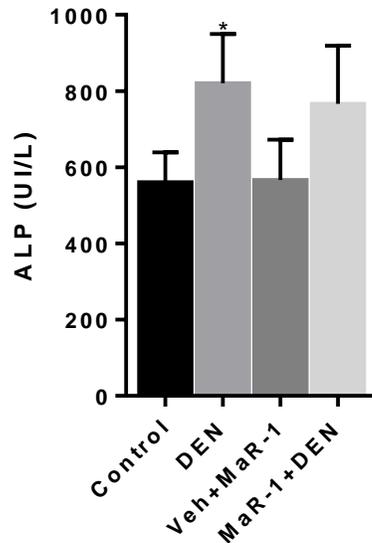


Figura 6. Valores de ALP en muestras séricas de ratas en los diferentes grupos en estudio. Los valores son expresados como promedio \pm DE para 4 animales por grupo experimental. Análisis estadístico de t-student seguido de Mann-Whitney post test, considerando (*) $p < 0,05$ como significativo, respecto al control

Se determinaron los niveles de LDH (figura 7). No existen diferencias significativas en la LDH sérica entre el grupo MaR-1 + DEN y el grupo DEN ($p = 0,0794$). Existe un aumento significativo en los niveles de LDH en el grupo MaR-1 + DEN en comparación con el control ($p = 0,0079$), cuyas medias corresponden a 1181 U/L y 266 U/L respectivamente. No existen diferencias significativas entre el grupo en tratamiento y el Veh + MaR-1 ($p = 0,8333$). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre Veh + MaR-1 y los grupos control y DEN, ($p = 0,1429$) y ($p = 0,2857$) respectivamente. La media del grupo Veh + MaR-1 corresponde a 1424 U/L, y la media del grupo DEN corresponde a 467 U/L. No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y DEN ($p = 0,0952$).

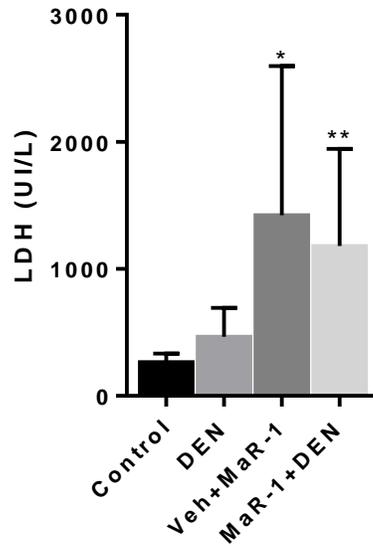


Figura 7. Valores de LDH en muestras séricas de ratas en los diferentes grupos en estudio. Los valores son expresados como promedio \pm DE para 4 animales por grupo experimental. Análisis estadístico de t-student seguido de Mann-Whitney post test, considerando (*) $p < 0,05$ como significativo, respecto al control. (**) Diferencias significativas entre grupo MaR-1 + DEN y grupo control, $p = 0,0079$.

Respecto a los niveles de albúmina ajustadas al peso del animal, como se muestra en la figura 8, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos analizados. Las medias de los grupos control, DEN, Veh + MaR-1 y MaR-1 + DEN son 2,692, 2,559, 2,221 y 2,503 respectivamente, con ($p > 0,005$).

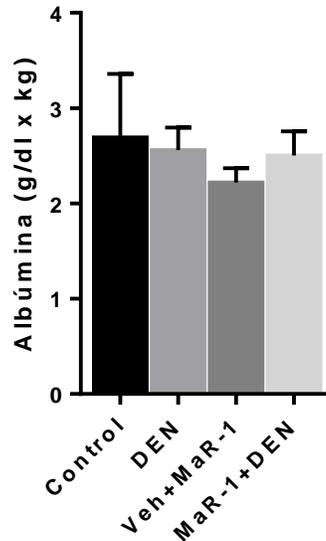


Figura 8. Valores de albúmina en muestras séricas de ratas en los diferentes grupos en estudio adaptadas al peso de cada animal. Los valores son expresados como promedio \pm DE para 4 animales por grupo experimental. Análisis estadístico de t-student seguido de Mann-Whitney post test, considerando (*) $p < 0,05$ como significativo.

7.3 Análisis histológico

La tinción de Van Gieson permite observar las fibras colágenas de coloración roja y así determinar el grado de fibrosis presente en el tejido. Se utilizó esta tinción para comparar los depósitos de colágeno entre grupos.

El análisis histológico con tinción de Van Gieson (figura 9) los cortes fueron analizados a nivel de arquitectura hepática, fibras colágenas, necrosis e integridad de la cápside hepática, fotografiándose 5 campos por muestra con el software Micrometrics SE Premium™, en un total de 4 muestras por grupo. En el grupo control se observa tejido íntegro, sinusoides definidos con escasas fibras colágenas, lo que se traduce en una arquitectura conservada. En el grupo DEN se observa deterioro de la arquitectura hepática, con zonas donde no se definen los sinusoides y venas centrales con obstrucción del lumen. Las fibras colágenas son más

abundantes sin formación de septos, extendiéndose por el tejido. Se observan zonas extensas de necrosis, definidas como aquellas zonas con hepatocitos sin núcleo visible. En el grupo Veh + MaR-1 se observa conservación de la arquitectura hepática con sinusoides definidos, con escasas fibras colágenas y células necróticas. El grupo MaR-1 + DEN presenta venas centrales más definidas con o sin pérdida del endotelio, sinusoides más definidos, fibras de colágeno abundantes sin formación de septos y áreas de necrosis medianas.

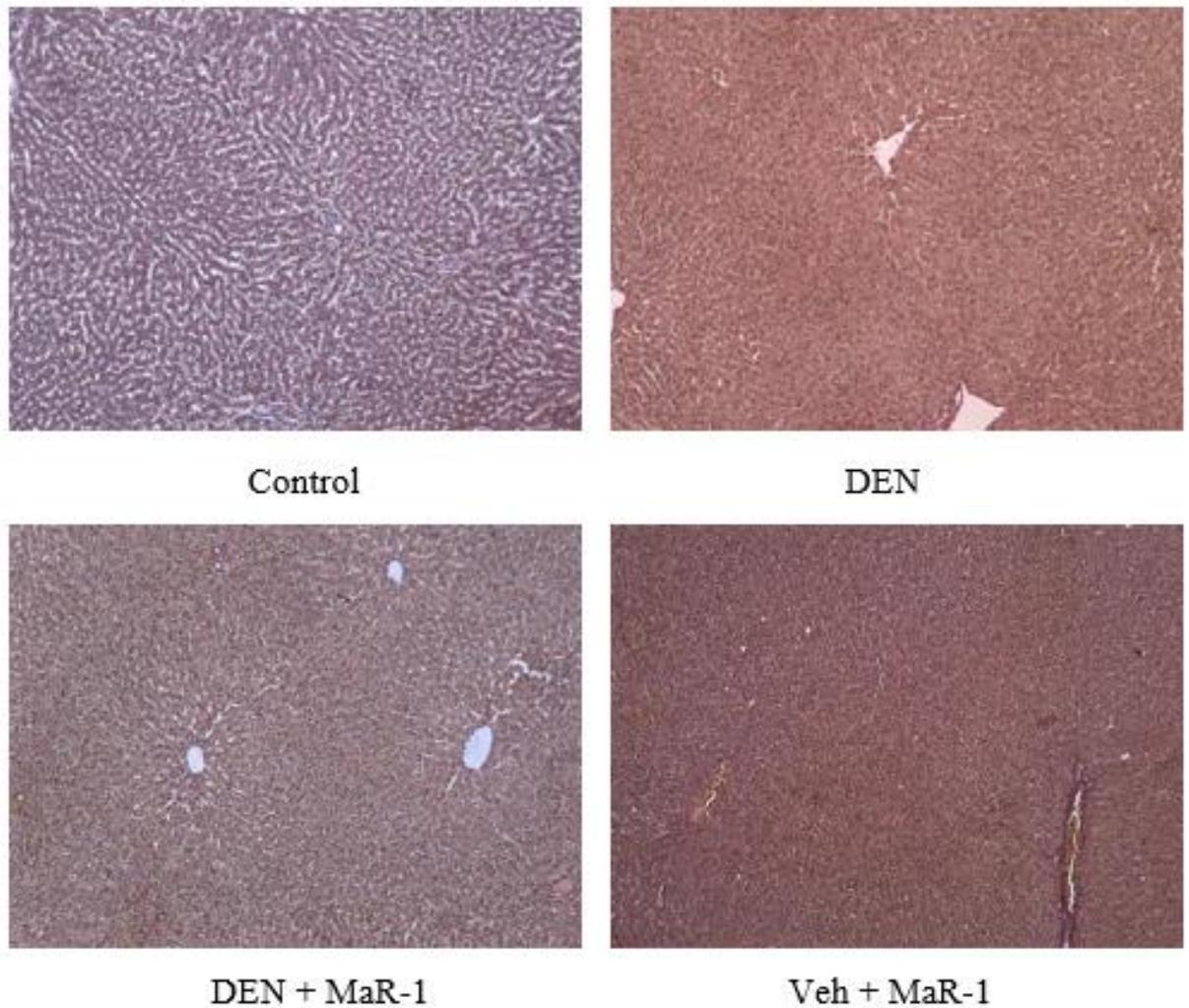


Figura 9. Cortes histológicos con tinción de Van Gieson, aumento 100X. Se analizaron 4 muestras por grupo, observándose 5 campos por muestra.

Se realizó la cuantificación del análisis histológico mediante valores arbitrarios, basados en el score de Korourian e Ishak con tinción de Van Gieson. Como se muestra en la figura 10A, se observaron diferencias significativas entre el grupo MaR-1 + DEN y DEN, observándose una disminución en la alteración de la arquitectura hepática en 1 unidad. Las medias respectivas de ambos grupos son 1,1 y 1,8. Existen diferencias significativas entre MaR-1 + DEN y los grupos control y Veh + MaR-1, observándose una diferencia entre medias en aproximadamente 1 unidad. Las medias para ambos grupos, control y Veh + MaR-1, es 0,1. Existen diferencias significativas entre el grupo DEN y los grupos control y Veh + MaR-1, con diferencia de medias en ambos casos de aproximadamente 2 unidades. Los depósitos de colágeno, de acuerdo con la figura 10B, no mostraron diferencias significativas entre el grupo MaR-1 + DEN y DEN, cuyas medias corresponden a 1,4 y 1,5, respectivamente. Existen diferencias significativas entre MaR-1 + DEN y los grupos control y Veh + MaR-1 en aproximadamente 1 unidad, siendo las medias de estos últimos dos grupos 0,25 y 0,05 respectivamente. Se observan diferencias significativas entre grupo DEN y los grupos control y Veh + MaR-1. De acuerdo con la figura 10C existen diferencias significativas en la integridad de la cápside entre el grupo MaR-1 + DEN y DEN, cuyas medias corresponden a 1,1 y 1,8 respectivamente, presentando una diferencia aproximada de 1 unidad. Existen diferencias significativas entre MaR-1 + DEN y los grupos control y Veh + MaR-1 en aproximadamente 1 unidad en ambos casos. Las medias respectivas para estos últimos grupos son de 0,02 y 0,12 respectivamente. Se observan diferencias significativas entre el grupo DEN y los grupos control y Veh + MaR-1 en aproximadamente 2 unidades. Al hacer análisis del porcentaje de necrosis, según la figura 10D, no presenta diferencias significativas entre los grupos MaR-1 + DEN y DEN, cuyas medias corresponden a 1,5 y 1,7 respectivamente. Existen diferencias significativas entre MaR-1 + DEN y los grupos control y Veh + MaR-1 en aproximadamente 1 unidad en ambos casos. Las medias respectivas para estos últimos grupos son de 0,8 en ambos. Se presentaron diferencias significativas entre DEN y los grupos control y Veh + MaR-1 en aproximadamente 1 unidad.

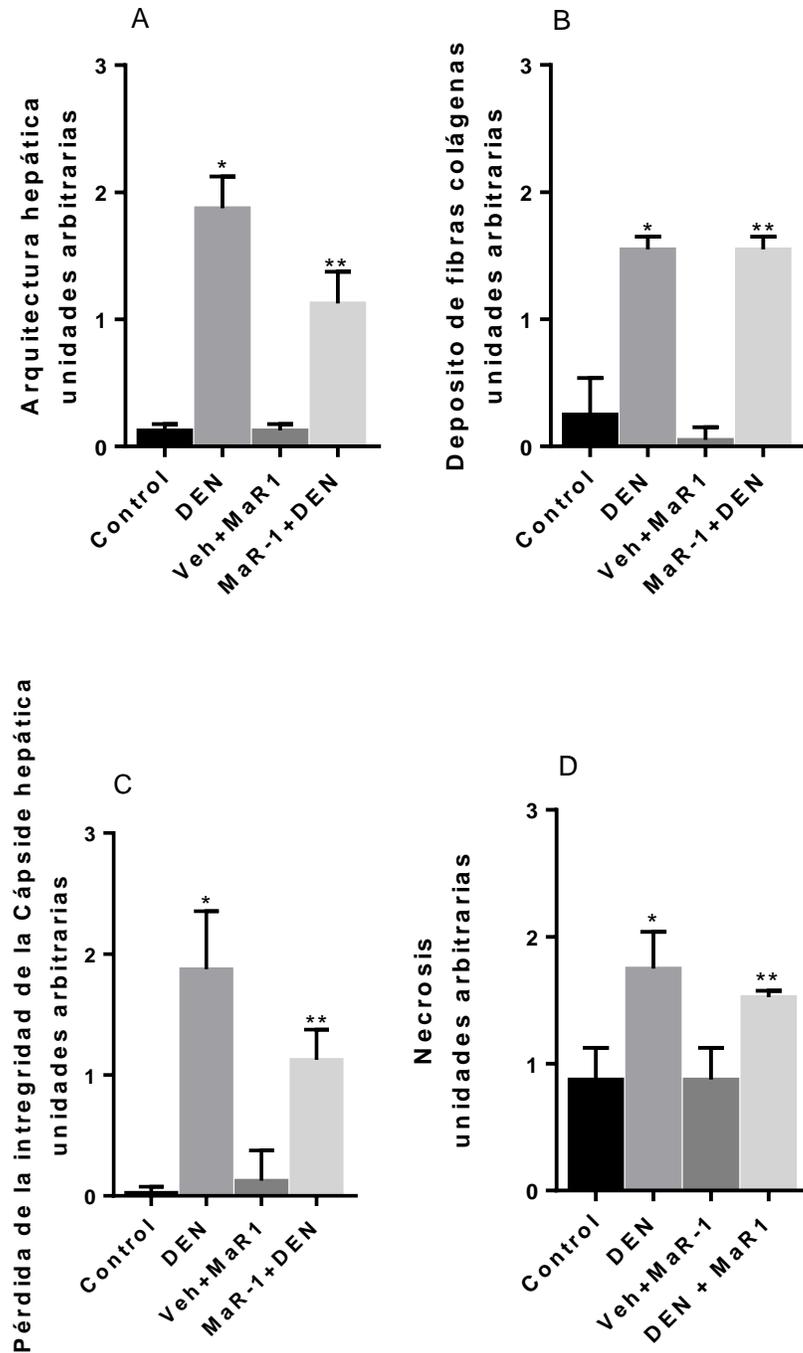


Figura 10. Análisis histológico con tinción de Van Gieson. Se analizaron 4 muestras por grupo, observándose 5 campos por muestra en 100X y 5 venas centrales en 400X. Los valores son expresados como el promedio ± 1 DE para 4 animales por grupo. Análisis estadístico de ANOVA de una vía considerando (*) $p < 0,05$ como significativo. (**) Diferencias significativas entre grupo DEN + MaR-1 y los grupos control y Veh + MaR-1 ($p < 0,05$).

La tinción elástica según Van Gieson permite observar las fibras elásticas del tejido hepático de coloración negra, utilizada para determinar el grado de fibrosis del tejido. Se utilizó esta técnica para comparar las fibras elásticas en todos los grupos en estudio.

El análisis de las fibras elásticas (figura 11) demostró que no existen diferencias significativas entre los grupos, siendo la cantidad de estas fibras la mínima posible.

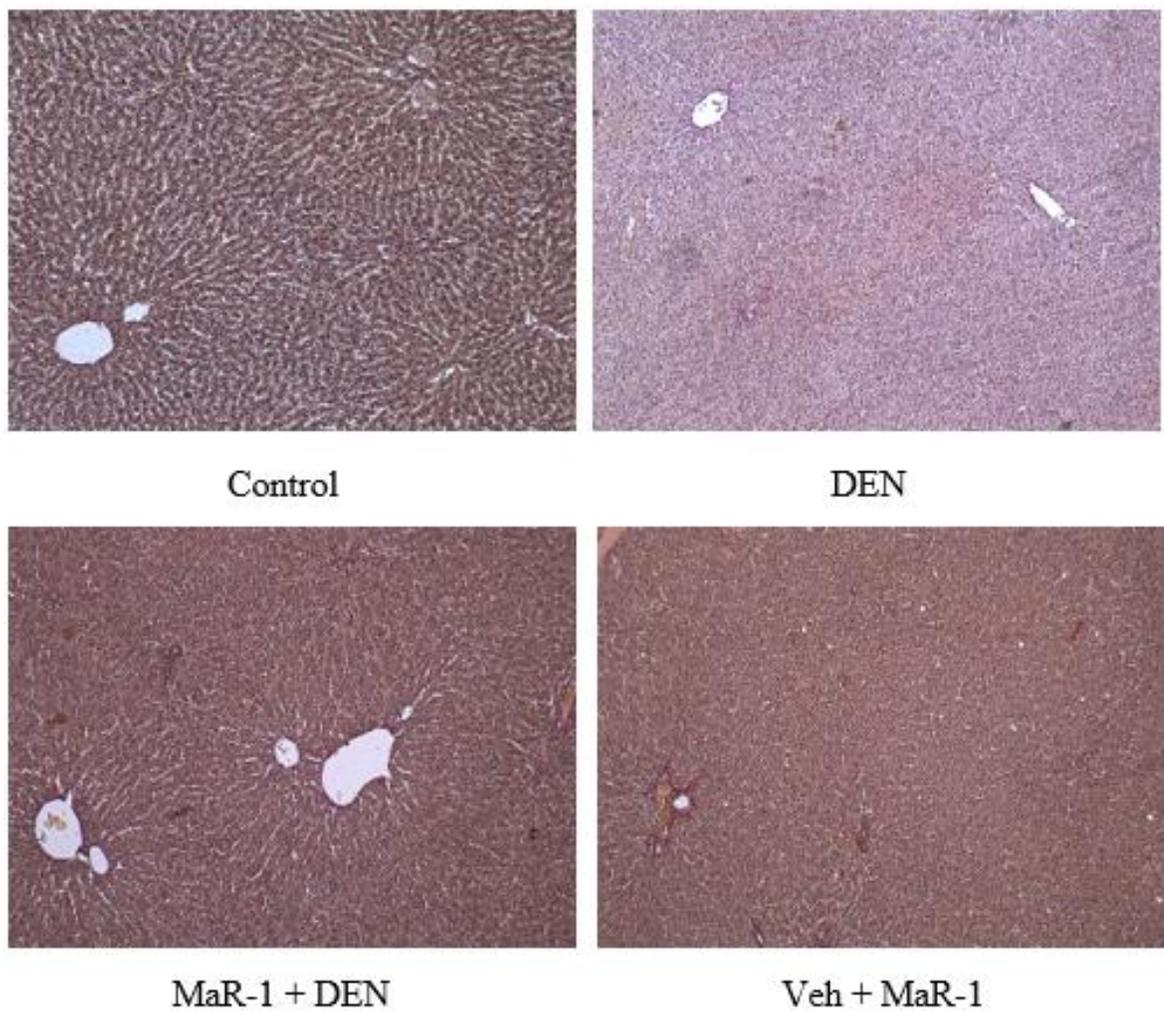


Figura 11. Cortes histológicos con tinción elástica según Van Gieson, aumento 100X. Se analizaron 4 muestras por grupo, observándose 5 campos por muestra.

Respecto al estudio de fibras elásticas utilizando la tinción elástica según Van Gieson (figura 12) no se observaron diferencias significativas entre los grupos en estudio ($p > 0,05$)

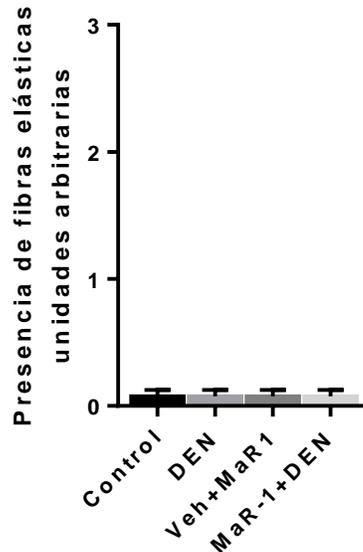


Figura 12. Análisis histológico con tinción elástica según Van Gieson. Se analizaron 4 muestras por grupo, observándose 5 campos por muestra. Los valores son expresados como el promedio ± 1 DE para 4 animales por grupo. Análisis estadístico de ANOVA de una vía considerando $p < 0,05$ como significativo.

La tinción de PAS permite observar los depósitos de glucógeno a nivel de tejido hepático de una coloración púrpura. Se utilizó esta técnica para comparar los depósitos de glucógeno en los diferentes grupos. Además, se realizó el análisis de infiltrado inflamatorio en base a esta técnica en los grupos de estudio.

La cuantificación del análisis histológico se llevó a cabo mediante valores arbitrarios basados en el score de Korourian. El análisis de los depósitos de glucógeno e infiltrado inflamatorio se comparó muestras histológicas teñidas con PAS (figura 13) fotografiándose 5 campos por muestra con el software Micrometrics SE Premium™, en un total de 4 muestras por grupo, donde se pudo observar una menor intensidad en la reacción de PAS en el grupo

control respecto a los demás grupos en estudio. El grupo control presentó depósitos de glucógeno en regular cantidad e infiltrado inflamatorio muy escaso. En el grupo DEN se observan abundantes depósitos de glucógeno con zonas de infiltrado inflamatorio en regular cantidad y dispersas en el tejido hepático. El grupo DEN + MaR-1 presentó una gran cantidad de depósitos de glucógeno con zonas de infiltrado inflamatorio difusas en regular cantidad. En el grupo Veh + MaR-1 se observó depósitos de glucógeno en regular cantidad, con reacción PAS más marcada en comparación al grupo control, con infiltrado inflamatorio muy escaso.

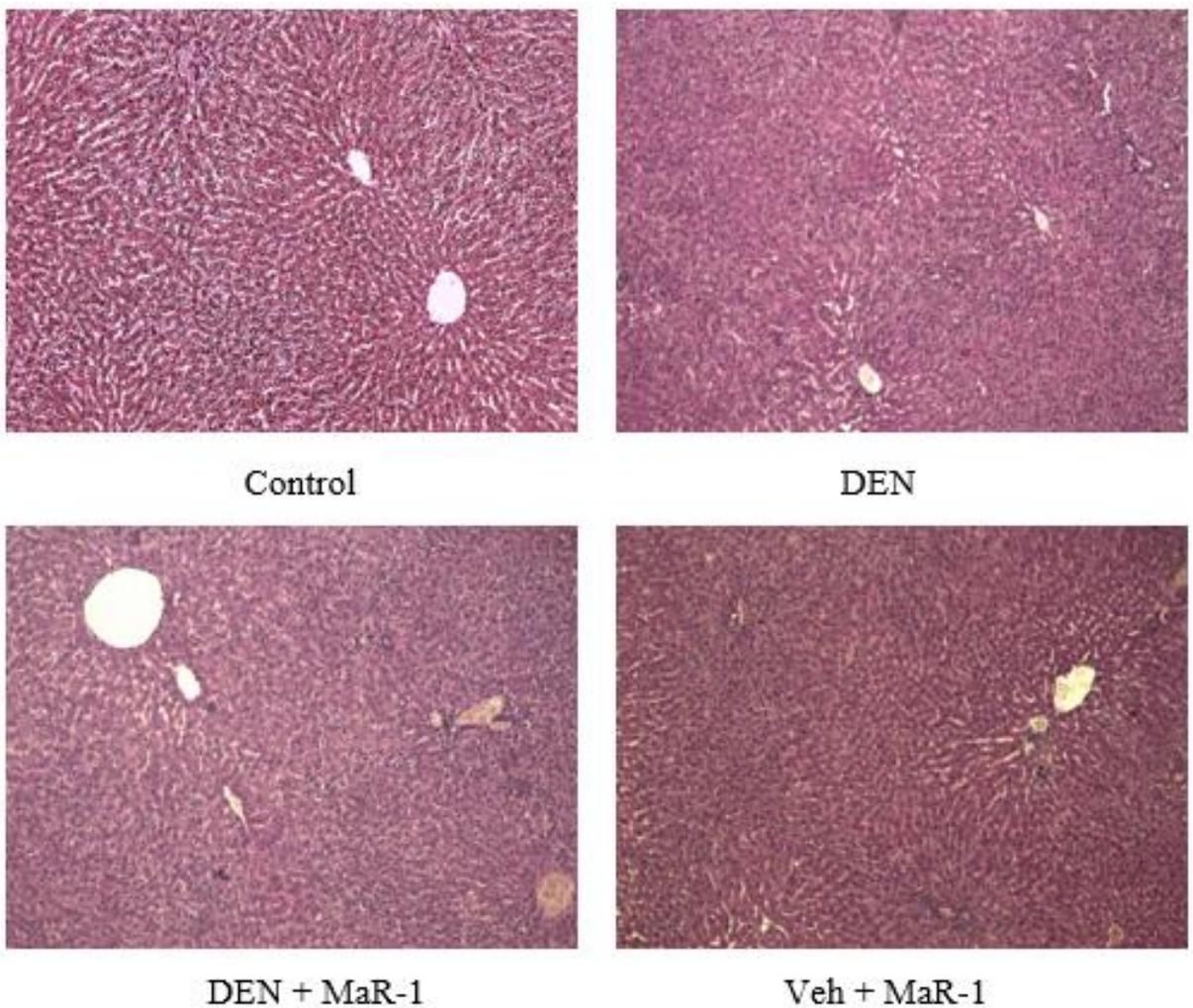


Figura 13. Cortes histológicos con tinción de PAS, aumento 100X. Se analizaron 4 muestras por grupo, observándose 5 campos por muestra.

Al realizar la cuantificación del análisis histológico mediante tinción de PAS se determinó (figura 14A) que en el infiltrado inflamatorio no existen diferencias significativas entre el grupo MaR-1 + DEN y DEN, cuyas medias respectivas son 1,1 y 1,6 respectivamente. Existen diferencias significativas entre MaR-1 + DEN y los grupos control y Veh + MaR-1 en aproximadamente 1 unidad. Las medias de estos dos últimos grupos son 0,1 para ambos casos. Existen diferencias significativas entre el grupo DEN y los grupos control y Veh + MaR-1 en aproximadamente 2 unidades. De acuerdo con la figura 14B, los depósitos de glucógeno no presentan diferencias significativas entre el grupo MaR-1 + DEN y DEN, cuyas medias respectivas son 2,3 y 2,6. Se observan diferencias significativas entre MaR-1 + DEN y los grupos control y Veh + MaR-1 en aproximadamente 1 unidad. La medias de estos dos últimos grupos son 1,2 y 1,5 respectivamente. Existen diferencias significativas entre el grupo DEN y los grupos control y Veh + MaR-1 en 1 unidad aproximadamente.

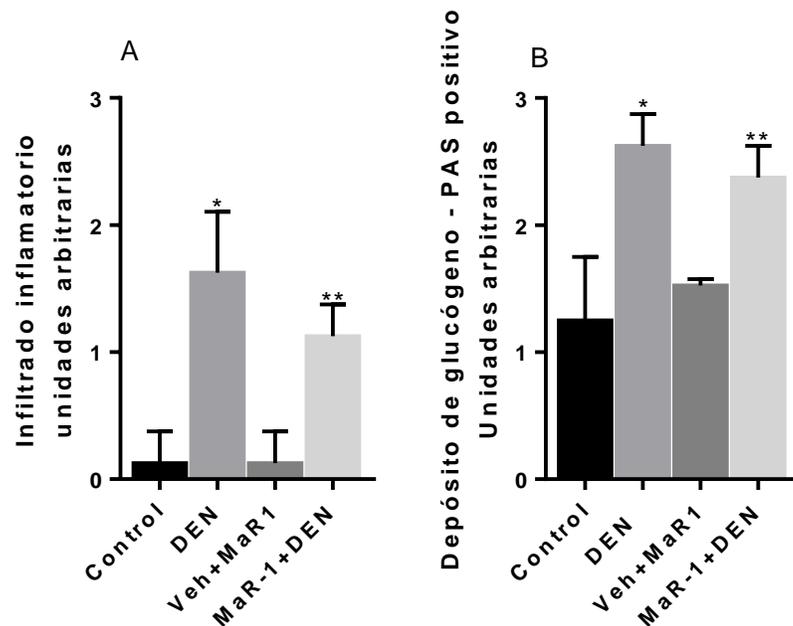


Figura 14. Análisis histológico con tinción de PAS. Se analizaron 4 muestras por grupo, observándose 5 campos por muestra. Los valores son expresados como el promedio ± 1 DE para 4 animales por grupo. Análisis estadístico de ANOVA de una vía considerando (*) $p < 0,05$ como significativo respecto al control. (**) diferencias significativas entre grupo MaR-1 + DEN y los grupos control y Veh + MaR-1 ($p < 0,05$).

8. DISCUSIÓN

La fibrosis hepática corresponde a un proceso que busca limitar el daño al tejido, permitiendo recuperar la arquitectura y función hepática. Sin embargo, el daño crónico provoca que la fibrosis perdure en el tiempo, provocando la pérdida progresiva de la arquitectura hepática y su funcionalidad, llegando a la cirrosis y, finalmente, a la falla hepática. Existen varias propuestas terapéuticas para mejorar el daño hepático y prolongar su funcionalidad. Una de las alternativas en estudio son los SPM, derivados de ácidos grasos ω -3, dentro de los cuales se encuentra MaR-1, la que ha demostrado propiedades antiinflamatorias y prorrresolutivas. Basándose en esto es que se ha propuesto en esta tesis evaluar el rol de MaR-1 frente al daño fibrótico en el hígado.

La determinación de las transaminasas en la clínica se utiliza como marcador de daño hepático, valores elevados sugieren daño a nivel de hepatocitos. En hepatitis virales, por ejemplo, los valores de estas enzimas se encuentran elevados (40). ALT presenta su mayor concentración a nivel hepático, pero también se encuentra en riñones, músculo esquelético y corazón, mientras que AST presenta su mayor concentración a nivel cardiaco. En el hígado se encuentra en citoplasma y mitocondria, siendo su aumento a nivel sérico indicativo de daño hepático severo (41). El análisis bioquímico no mostró diferencias significativas en los niveles de ALT y AST entre el grupo control y el tratado con DEN. Ante una enfermedad hepática avanzada se ha observado que en algunos casos existe una disminución en los niveles de ALT y AST, llegando incluso a valores dentro del rango normal (42), hecho que explica los niveles bajos detectados. El grupo tratado con MaR-1/DEN presentó un aumento significativo en los niveles de AST y ALT. Estudios de la regeneración hepática en trasplantes han demostrado que existe un aumento de AST y ALT post operatorio y que toma aproximadamente un mes en normalizar (43), lo que podría explicar el alza observada a los 28 días de tratamiento. El tratamiento con MaR-1 ha demostrado regenerar tejido en modelos de planaria, viéndose un aumento en el índice de regeneración tisular en ejemplares tratados con MaR-1 (37). Al aumentar la regeneración tisular a nivel hepático en un modelo fibrótico se observa un incremento de las AST y ALT considerando que el grupo fue tratado en un periodo de tiempo cercano a un mes. También es importante considerar las condiciones de la

muestra, siendo importante el efecto de los cambios de temperatura en la muestra sobre la actividad enzimática a analizar, lo que también pudiese afectar a los resultados observados.

En clínica, γ -GT es utilizado como marcador de enfermedades hepáticas obstructivas, como colestasis, o alcoholismo (44), viéndose en estos últimos casos un aumento de hasta diez veces respecto al valor normal (45). En hepatitis C (VHC) crónica solo se han observado aumentos considerables en el 30% de los casos, asociándose a daño en el conducto biliar (46). Los niveles de γ -GT en todos los grupos no se vieron alterados respecto a su valor de referencia dentro de un rango de 0 – 3 UI/L (47). Si bien se observa una diferencia significativa en el grupo tratado con DEN + MaR-1, el valor obtenido no refleja un estado patológico. Como se mencionó anteriormente, en enfermedades hepáticas crónicas como VHC crónica solo existe un aumento de esta enzima a nivel plasmático en menos de la mitad de los casos, lo que podría explicar la ausencia de diferencias estadísticas observada.

La determinación de ALP en clínica es utilizada para el análisis de enfermedades hepáticas u óseas, esto debido a que la mayor parte de la ALP circulante proviene del hígado y huesos (41), requiriendo pruebas adicionales para la determinar la causa del incremento, diferenciando si el origen de este exceso es debido a hepatopatía o enfermedad ósea de tipo neoplásicas. Los niveles de ALP se ven aumentados en los grupos tratados con DEN sin observarse diferencias significativas al someter a las ratas a tratamiento con MaR-1. En enfermedades hepáticas crónicas y hepatocarcinomas se observa un aumento en los niveles séricos de ALP (46). Es por ello por lo que el resultado observado es lo esperado ante un daño hepático, se observa un aumento de ALP en los grupos con daño hepático.

Los niveles de LDH en los diferentes grupos muestran un aumento al someter a las ratas a tratamiento con MaR-1, independiente de la exposición a DEN. La utilidad de LDH como marcador de enfermedades neoplásicas ha sido bien estudiada, considerándose su incremento como indicativo de daño tisular y una proliferación celular aumentada (48). La determinación de los niveles de LDH también se utiliza para evaluar citotoxicidad en estudio de compuestos químicos. Un aumento de la concentración de LDH indica pérdida de la integridad de la

membrana y necrosis en cultivos celulares (49). El aumento de LDH al administrar MaR-1 podría deberse a citotoxicidad por parte del compuesto, sin embargo, estudios anteriores han demostrado que MaR-1 reduce la necrosis en dosis similares a la utilizada en este estudio (34). Además, en el estudio histológico realizado también se observó reducción de zonas necróticas, aunque no estadísticamente significativas. A pesar de ser un marcador de daño celular, LDH es muy inespecífico en la clínica debido a que esta enzima se encuentra en todas las células del organismo, incluyendo eritrocitos, por lo que LDH es utilizado como marcador de hemólisis en anemias hemolíticas (50). En ese sentido, una punción traumática podría haber hemolizado la muestra, aumentando los niveles de LDH, pudiendo explicar los resultados encontrados.

En la clínica la determinación de albúmina sérica se realiza principalmente, respecto a la función hepática, para evaluar la capacidad de síntesis del hígado. También es utilizada para evaluar el estado nutricional de pacientes y en enfermedades renales (41, 51). Los niveles de albúmina sérica no presentaron diferencias significativas entre los diferentes grupos en estudio. En ningún grupo los valores salen del rango de referencia, sin reflejar un estado patológico. En el hígado con fibrosis avanzada y cirrosis hepática se ve una hipoalbuminemia causada por una disminución en la capacidad de síntesis de los hepatocitos (52). Las condiciones de la muestra al momento de analizar también son un factor clave para una correcta determinación de los niveles de albúmina. También se debe considerar los componentes del reactivo a utilizar, los cuales pueden producir una cuantificación incorrecta (53). Se debe considerar además que el modelo de daño fibrótico utilizado no corresponde a un estadio avanzado, lo que podría explicar por qué no se observan diferencias significativas.

Otro punto clave al determinar daño hepático es el análisis de biopsias mediante diferentes tipos de tinciones. La tinción de Van Gieson permite visualizar las fibras de colágeno presentes en el tejido en estudio, las cuales se tiñen de rojo, permitiendo, en el caso de estudios hepáticos, identificar tejido fibrótico. El estudio histológico por la tinción de Van Gieson muestra que el tratamiento con MaR-1 mejora la arquitectura hepática ante un hígado fibrótico, observándose una mayor conservación de la estructura de la vena central, junto con sinusoides continuos y definidos, en conjunto con la reducción de zonas de tejido necrótico.

Estudios anteriores han demostrado que al aplicar MaR-1 en ratas tratadas con CCl₄ disminuye la extensión de las zonas necróticas (34) y reduce el daño hepático provocado por sepsis, observándose mejoría a nivel histológico (54). Otro aspecto que se consideró en el análisis del tejido fibrótico es la cantidad de fibras colágenas presentes. Como es esperable, la cantidad de colágeno presente en los tejidos tratados con DEN aumentó considerablemente respecto a los controles. A pesar de observarse una disminución en las fibras colágenas ante el tratamiento con MaR-1, esta no fue estadísticamente significativa.

La tinción elástica según Van Gieson permite identificar el tejido elástico en muestras histológicas, el cual se tiñe de coloración negra por unión de la elastina a las fibras elásticas, utilizada, en el caso de estudios hepáticos, en la identificación y estratificación de la fibrosis. La concentración de fibras elásticas, la cual se analizó utilizando la tinción elástica según Van Gieson, fue mínima en todos los grupos en estudio. La concentración de elastina suele aumentar en el hígado fibrótico en etapas tardías, siendo abundantes en el hígado cirrótico, en conjunto con colágeno tipo I y III, las cuales van disminuyendo en su concentración con el paso del tiempo. En etapas más tempranas y al inicio de la etapa avanzada existe una menor cantidad de estas fibras, mientras que el colágeno tipo I y III son abundantes (55).

La evaluación de la cápside hepática se basó en la continuidad y grosor de esta, analizándose con la tinción de Van Gieson. La integridad de la cápside hepática aumentó al aplicar MaR-1 en el tejido fibrótico. En el tejido hepático normal la cápside está compuesta por fibras de colágeno que usualmente se distribuyen de manera paralela, pudiendo estar rodeada de una capa mesotelial y presentar zonas donde la concentración de colágeno es elevada (56), en cambio, en el hígado fibrótico la cápsula, si bien no refleja la concentración de colágeno elevada en el interior del hígado ni los cambios histopatológicos observados en la fibrosis (57), si se ve alterada su integridad debido al aumento de elementos de la MEC al interior del órgano que conlleva a la pérdida de la estabilidad mecánica (58).

La tinción de PAS permite identificar los depósitos de polisacáridos en los tejidos, tiñéndolos de coloración púrpura utilizada en el estudio hepático para identificar los

depósitos de glucógeno. La tinción de PAS se utilizó para comparar el nivel de infiltración inflamatoria a nivel de tejido y el depósito de glucógeno, considerado PAS positivo, en los diferentes grupos en estudio. El tejido fibrótico presentó mayor infiltración inflamatoria que el control. El tratamiento con MaR-1, si bien disminuyó la cantidad de células inflamatorias, esta no fue significativa al comparar con el grupo fibrótico sin tratamiento. MaR-1 ha demostrado inhibir la infiltración de PMN en conjunto a un aumento de la actividad fagocítica de los macrófagos en el proceso inflamatorio (32), en conjunto a una disminución en las moléculas de adhesión ICAM-1, p-selectina y CD24, lo que disminuye el reclutamiento de PMN (33). Los depósitos de glucógeno fueron mucho mayores en el tejido fibrótico que en los controles, sin diferencias significativas respecto a la aplicación de MaR-1. Estudios histológicos utilizando tinción de PAS han evidenciado que en fibrosis y cirrosis hepática existe una acumulación de glucógeno debido a la pérdida funcional del hígado (59, 60). En la cirrosis hepática existe insulinoresistencia, la que, en estadios tempranos, solo se presenta a nivel de músculo esquelético. Esto provoca que el hígado se sobrecargue de glucógeno con el fin de disminuir la glicemia, sin embargo la masa hepática al estar disminuida no logra normalizar los niveles de glucosa sanguínea provocando hiperinsulinemia (61).

El análisis del perfil hepático de todos los grupos en estudio muestra que MaR-1 no mejora ninguno los parámetros. En el caso de las transaminasas esto podría deberse a la regeneración del tejido hepático. En el caso de γ -GT los valores observados no se encuentran fuera de los rangos normales para ratas. En el caso de ALP no se observa ningún efecto al aplicar MaR-1 en modelos fibróticos. Para LDH y albúmina los valores encontrados podrían explicarse por condiciones de la muestra utilizada, considerando condiciones de almacenamiento y hemólisis.

El análisis histológico con tinción de Van Gieson muestra que MaR-1 atenúa la pérdida de la arquitectura, así como la pérdida de la integridad de la cápside en modelos fibróticos. También se observa disminución de las zonas necróticas, pero esta no es estadísticamente significativa. No se observan diferencias significativas en la concentración de fibras colágenas. El estudio de fibras elásticas con tinción elástica según Van Gieson no demostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos en estudio debido al estadio fibrótico

del modelo en estudio. El estudio con PAS para depósitos de glucógeno e infiltrado inflamatorio mostró un aumento en los depósitos de glucógeno en los modelos fibróticos, lo que no fue revertido al aplicar MaR-1. En cuanto al infiltrado inflamatorio, se observa la disminución de este, pero no de manera significativa.

Dentro de las limitaciones del estudio se encuentra la cantidad de muestra sanguínea obtenida de los diferentes grupos, ya que en algunos casos el volumen obtenido no fue el suficiente, teniendo que limitar las determinaciones o realizarlas en diluciones recomendadas por el fabricante de cada kit utilizado. Además, los cambios de temperatura a los que fueron sometidas las muestras séricas y el tiempo que estuvieron congeladas podría haber alterado las determinaciones. Otro punto importante para considerar es el modelo de fibrosis utilizado, el cual no constituye un estadio avanzado.

9. CONCLUSIÓN

MaR-1 ha demostrado atenuar las alteraciones en la arquitectura hepática, así como mayor integridad a nivel de cápside hepática. Sin embargo, no disminuye significativamente los depósitos de fibras colágenas, la necrosis ni el infiltrado inflamatorio, tampoco atenúa el acúmulo de glucógeno.

A nivel bioquímico, se observa un aumento de LDH al administrar MaR-1 que puede estar asociado a hemólisis de las muestras utilizadas, así como un aumento en las transaminasas debido a la regeneración hepática. Los niveles de γ -GT, ALP y albúmina no varían en el tejido fibrótico respecto al tratamiento con MaR-1.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferri D, Moro L, Mastrodonato M, Capuano F, Marra E, Liquori GE, et al. Ultrastructural zonal heterogeneity of hepatocytes and mitochondria within the hepatic acinus during liver regeneration after partial hepatectomy. *Biol Cell*. 2005;97(4):277-88.
2. Kietzmann T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biol*. 2017;11:622-30.
3. Hellerbrand C. Hepatic stellate cells--the pericytes in the liver. *Pflugers Arch*. 2013;465(6):775-8.
4. Weiskirchen R, Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014;3(6):344-63.
5. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol*. 2013;3(2):785-97.
6. López-Navarrete G, Ramos-Martínez E, Suárez-Álvarez K, Aguirre-García J, Ledezma-Soto Y, León-Cabrera S, et al. Th2-associated alternative Kupffer cell activation promotes liver fibrosis without inducing local inflammation. *Int J Biol Sci*. 2011;7(9):1273-86.
7. Xu FL, You HB, Li XH, Chen XF, Liu ZJ, Gong JP. Glycine attenuates endotoxin-induced liver injury by downregulating TLR4 signaling in Kupffer cells. *Am J Surg*. 2008;196(1):139-48.
8. Li P, He K, Li J, Liu Z, Gong J. The role of Kupffer cells in hepatic diseases. *Mol Immunol*. 2017;85:222-9.
9. Brunt EM, Gouw AS, Hubscher SG, Tiniakos DG, Bedossa P, Burt AD, et al. Pathology of the liver sinusoids. *Histopathology*. 2014;64(7):907-20.
10. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*. 2013;58(3):593-608.
11. Scaglione S, Kliethermes S, Cao G, Shoham D, Durazo R, Luke A, et al. The Epidemiology of Cirrhosis in the United States: A Population-based Study. *J Clin Gastroenterol*. 2015;49(8):690-6.
12. Mokdad AA, Lopez AD, Shahrz S, Lozano R, Mokdad AH, Stanaway J, et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Med*. 2014;12:145.
13. Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis -- fact or fantasy? *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S82-8.
14. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1655-69.
15. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatol*. 2007;6:7.
16. Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol*. 2015;62(1 Suppl):S15-24.
17. Soon RK, Yee HF. Stellate cell contraction: role, regulation, and potential therapeutic target. *Clin Liver Dis*. 2008;12(4):791-803, viii.
18. Pérez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*. 1983;3(1):112-20.

19. Urrutia O. El régimen jurídico internacional del cambio climático después del "Acuerdo de Copenhague". *Revista de Derecho de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso*. 2010(34):597 - 633.
20. Tolba R, Kraus T, Liedtke C, Schwarz M, Weiskirchen R. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Lab Anim*. 2015;49(1 Suppl):59-69.
21. Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol*. 2009;90(4):367-86.
22. Griffin MD, Sanders TA, Davies IG, Morgan LM, Millward DJ, Lewis F, et al. Effects of altering the ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids on insulin sensitivity, lipoprotein size, and postprandial lipemia in men and postmenopausal women aged 45-70 y: the OPTILIP Study. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(6):1290-8.
23. Capanni M, Calella F, Biagini MR, Genise S, Raimondi L, Bedogni G, et al. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(8):1143-51.
24. Balk EM, Lichtenstein AH. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Summary of the 2016 Agency of Healthcare Research and Quality Evidence Review. *Nutrients*. 2017;9(8).
25. Barceló-Coblijn G, Murphy EJ. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res*. 2009;48(6):355-74.
26. Kidd PM. Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. *Altern Med Rev*. 2007;12(3):207-27.
27. Jump DB, Depner CM, Tripathy S, Lytle KA. Potential for dietary ω -3 fatty acids to prevent nonalcoholic fatty liver disease and reduce the risk of primary liver cancer. *Adv Nutr*. 2015;6(6):694-702.
28. Shaaban AA, Shaker ME, Zalata KR, El-kashef HA, Ibrahim TM. Modulation of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress, injury and fibrosis by olmesartan and omega-3. *Chem Biol Interact*. 2014;207:81-91.
29. Li R, Wang Y, Ma Z, Ma M, Wang D, Xie G, et al. Maresin 1 Mitigates Inflammatory Response and Protects Mice from Sepsis. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:3798465.
30. Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, et al. Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J Exp Med*. 2009;206(1):15-23.
31. Abdounour RE, Dalli J, Colby JK, Krishnamoorthy N, Timmons JY, Tan SH, et al. Maresin 1 biosynthesis during platelet-neutrophil interactions is organ-protective. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(46):16526-31.
32. Serhan CN, Dalli J, Colas RA, Winkler JW, Chiang N. Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(4):397-413.
33. Chatterjee A, Sharma A, Chen M, Toy R, Mottola G, Conte MS. The pro-resolving lipid mediator maresin 1 (MaR1) attenuates inflammatory signaling pathways in vascular smooth muscle and endothelial cells. *PLoS One*. 2014;9(11):e113480.
34. Li R, Wang Y, Zhao E, Wu K, Li W, Shi L, et al. Maresin 1, a Proresolving Lipid Mediator, Mitigates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:9203716.

35. Laiglesia LM, Lorente-Cebrian S, Martinez-Fernandez L, Sainz N, Prieto-Hontoria PL, Burrell MA, et al. Maresin 1 mitigates liver steatosis in ob/ob and diet-induced obese mice. *Int J Obes (Lond)*. 2018;42(3):572-9.
36. Jung TW, Kim HC, Abd El-Aty AM, Jeong JH. Maresin 1 attenuates NAFLD by suppression of endoplasmic reticulum stress via AMPK-SERCA2b pathway. *J Biol Chem*. 2018;293(11):3981-8.
37. Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park CK, Xu ZZ, et al. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB J*. 2012;26(4):1755-65.
38. Korourian S, Hakkak R, Ronis MJ, Shelnett SR, Waldron J, Ingelman-Sundberg M, et al. Diet and risk of ethanol-induced hepatotoxicity: carbohydrate-fat relationships in rats. *Toxicol Sci*. 1999;47(1):110-7.
39. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*. 1981;1(5):431-5.
40. Marcellin P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hepatol*. 1999;31 Suppl 1:9-16.
41. Mauro P, Renze B, Wouter W. *Tietz text book of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4th edition ed: Elsevier; 2006.
42. Ahmed Z, Ahmed U, Walayat S, Ren J, Martin DK, Moole H, et al. Liver function tests in identifying patients with liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2018;11:301-7.
43. Kim MS, Lee HK, Kim SY, Cho JH. Analysis of the relationship between liver regeneration rate and blood levels. *Pak J Med Sci*. 2015;31(1):31-6.
44. Whitfield JB. Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2001;38(4):263-355.
45. Wu A, Slavin G, Levi AJ. Elevated serum gamma-glutamyl-transferase (transpeptidase) and histological liver damage in alcoholism. *Am J Gastroenterol*. 1976;65(4):318-23.
46. Giannini E, Botta F, Fasoli A, Romagnoli P, Mastracci L, Ceppa P, et al. Increased levels of gammaGT suggest the presence of bile duct lesions in patients with chronic hepatitis C: absence of influence of HCV genotype, HCV-RNA serum levels, and HGV infection on this histological damage. *Dig Dis Sci*. 2001;46(3):524-9.
47. Caridad LGA, Diuris B, Amelia P, Marisel R, Bárbara O G, María E A, et al. Hematological and biochemical parameters in Sprague Dawley laboratory rats breed in CENPALAB, Cemp: SPRD2011.
48. Erez A, Shental O, Tchebiner JZ, Laufer-Perl M, Wasserman A, Sella T, et al. Diagnostic and prognostic value of very high serum lactate dehydrogenase in admitted medical patients. *Isr Med Assoc J*. 2014;16(7):439-43.
49. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 1983;64(3):313-20.
50. Barcellini W, Fattizzo B. Clinical Applications of Hemolytic Markers in the Differential Diagnosis and Management of Hemolytic Anemia. *Dis Markers*. 2015;2015:635670.
51. Levitt DG, Levitt MD. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *Int J Gen Med*. 2016;9:229-55.

52. Henriksen JH, Siemssen O, Krintel JJ, Malchow-Møller A, Bendtsen F, Ring-Larsen H. Dynamics of albumin in plasma and ascitic fluid in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 2001;34(1):53-60.
53. Spencer K, Price CP. Influence of reagent quality and reaction conditions on the determination of serum albumin by the bromocresol green dye-binding method. *Ann Clin Biochem.* 1977;14(2):105-15.
54. Hao Y, Zheng H, Wang RH, Li H, Yang LL, Bhandari S, et al. Maresin1 Alleviates Metabolic Dysfunction in Septic Mice: A. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:2309175.
55. Baiocchini A, Montaldo C, Conigliaro A, Grimaldi A, Correani V, Mura F, et al. Extracellular Matrix Molecular Remodeling in Human Liver Fibrosis Evolution. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151736.
56. Chapman GB, Eagles DA. Ultrastructural features of Glisson's capsule and the overlying mesothelium in rat, monkey and pike liver. *Tissue Cell.* 2007;39(5):343-51.
57. Xu S, Kang CH, Gou X, Peng Q, Yan J, Zhuo S, et al. Quantification of liver fibrosis via second harmonic imaging of the Glisson's capsule from liver surface. *J Biophotonics.* 2016;9(4):351-63.
58. Georges PC, Hui JJ, Gombos Z, McCormick ME, Wang AY, Uemura M, et al. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293(6):G1147-54.
59. Kudryavtseva M, Bezborodkina NN, Okovity SV, Kudryavtsev BN. Metabolic heterogeneity of glycogen in hepatocytes of patients with liver cirrhosis: the glycogen of the liver lobule zones in cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001;13(6):693-7.
60. Lu JW, Yang WY, Lin YM, Jin SL, Yuh CH. Hepatitis B virus X antigen and aflatoxin B1 synergistically cause hepatitis, steatosis and liver hyperplasia in transgenic zebrafish. *Acta Histochem.* 2013;115(7):728-39.
61. Nishida T. Diagnosis and Clinical Implications of Diabetes in Liver Cirrhosis: A Focus on the Oral Glucose Tolerance Test. *J Endocr Soc.* 2017;1(7):886-96.