



Estudio del daño hepático producido por estrés pro-inflamatorio en ratas con diferentes edades.

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental

PRESENTA

Biól. Exp. PEDRO POSADAS RODRIGUEZ

Comité Tutorial

Co-Director: Dr. Armando Luna López
Co-Director: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Asesora: Dra. Mina Königsberg Fainstein

México D.F.

Diciembre, 2014

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular y en el laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por el CONACYT: 283848

Número de becario: 349444 CVU: 483030

Miembros del jurado

COMITE TUTORAL

Presidente: Dra. Mina Königsberg Fainstein

Departamento de Ciencias de la Salud

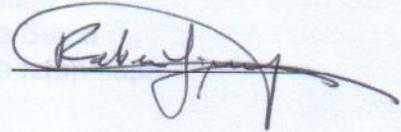
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



Secretaria: Dra. Rebeca López Marure

Departamento de Fisiología

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"



Vocal: Dra. Verónica Souza Arrollo

Departamento de Ciencias de la Salud

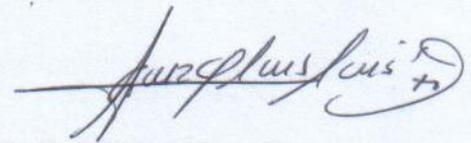
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



Vocal: Dr. José Luis Gómez Olivares

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTOR EXTERNO

Dr. Armando Luna López
Departamento de Investigación Básica
Instituto Nacional de Geriátría, allbioexp@yahoo.com

CO-DIRECTOR INTERNO

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Laboratorio de Fisiología Celular
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
legq@xanum.uam.mx

ASESORA INTERNA

Dra. Mina Königsberg Fainstein
Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
mkf@xanum.uam.mx

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres, hermanos y familiares. A mi madre por todo el apoyo, amor, paciencia y enseñanza que me ha brindado. A mi padre por su apoyo incondicional y sus sabios consejos. A mis hermanas porque son extraordinarias, hermosas e inteligentes. Para mi hermano mi mejor amigo por todos esos momentos juntos por hacerme reír y al pequeñín de Iker por contagiarme con su felicidad. A mis suegros por abrirme las puertas de su casa y a mis cuñados por ser unas excelentes personas.

A Viridiana la mujer más hermosa. “Por tu sonrisa que calma mi cansancio, por tus brazos que me consuelan cuando siento que todo va mal, te agradezco mi amor. Gracias por ser la compañera perfecta, por comprender mi mal humor y por hacerme ver que los problemas se pueden solucionar si estamos juntos. Te amo eres el amor de mi vida.”

Al Dr. Armando. Por confiar en mí desde el día en que nos conocimos, por sus enseñanzas tanto en el ámbito profesional como en el personal. Por su invaluable apoyo en los momentos más difíciles.

A la Dra. Mina. Por la acertada orientación, el soporte y discusión crítica que me permitió el aprovechamiento del trabajo realizado. Por ser una persona muy sensible y por estar pendiente de los aspectos más humanos, entusiasta y optimista y por brindarme su invaluable apoyo y confianza en esta etapa de mi vida y desarrollo profesional.

Al Dr. Luis. Primeramente por confiar en mí, por su generosidad por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica, por su tiempo, paciencia y por permitirme trabajar en un marco de confianza y libertad que fueron fundamentales para la realización de este trabajo y para mi formación profesional.

Al M en Biól .Exp. Oscar. Por su apoyo en la hepatohistología y enseñanzas de este trabajo, pero sobre todo por su amistad.

Al Biól. Exp. Gibran. Por su colaboración ayuda y amistad que me ha brindado.

A mi amigo Iván. Por todo el apoyo que me ha brindado en estos años y por su invaluable amistad.

A mis amigas. A mi gran amiga Adriana porque siento una gran admiración por su manera de ser y considero que es un privilegio conocerla, porque cada vez que la he necesitado ha estado conmigo, a Mateo y Emilio por jugar conmigo. A mi amiga Alicia por sus enseñanzas y apoyo cuando más lo he necesitado.

A mis compañeros de laboratorio: Adriana, Alice, Angelica, Sandra Lizbeth, Sandra C., René, Gibrán, Luis, Rafa, Ismerai, Paola, Elisa, Aglae, Alejandro, Stephanie, Elizabeth y Roxana, por hacérmelo pasar tan bien durante el trabajo en el laboratorio.

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. SUMMARY	6
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1. Cambios hepáticos relacionados con el aumento en la edad	9
3.2. Agentes causantes de daño en hígado.....	10
3.3 Agentes bacterianos	11
3.4 Lipopolisacárido.....	12
3.5 Proceso de inflamación.....	13
3.6 Mecanismo de acción del lipopolisacárido.....	15
3.7 Señales de muerte celular en el hígado.....	17
3.8 Proceso de regeneración hepática	18
3.9 Señalización de Notch	19
3.10 Notch como medio compensatorio al daño hepático	21
4. ANTECEDENTES	22
5. JUSTIFICACIÓN	25
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	27
7. OBJETIVO GENERAL	27
8. OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
9. HIPÓTESIS.....	28
10. MATERIAL Y MÉTODOS	28
10.1 Material biológico (animales)	28

10.2	Tratamientos con LPS	29
10.3	Evaluación de marcadores de daño hepático mediante ALT y AST	29
10.4	Cuantificación de citocinas pro-inflamatorias por técnica de ensayo inmunoabsorbente en fase sólida (ELISA).....	30
10.5	Procesamiento de tejidos.....	31
10.6	Análisis morfométrico.....	31
10.7	Extracción de DNA e hidrólisis enzimática.....	31
10.8	Cuantificación de 8-oxo-dGuo por HPLC.....	33
10.9	Análisis de inmunodetección en papel (western blot)	34
10.10	Análisis estadístico	35
11.	RESULTADOS	35
11.1	Evaluación de marcadores séricos de daño hepático.....	35
11.2	Estado inflamatorio sistémico en ratas a diferentes edades en respuesta al tratamiento con LPS	39
11.3	Histología hepática y análisis morfométrico	41
11.4	Daño oxidante al DNA	46
11.5	Mecanismo de respuesta celular frente a un daño hepático	47
11.6	Niveles de la proteína p53.....	47
11.7	Proteínas asociadas a la vía de la muerte celular	48
11.8	Niveles de proteína Caspasa-3.....	48
11.9	Niveles de la proteína Bax.....	50
11.10	Proteínas relacionadas con la sobrevivencia celular	51
11.11	Niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2	51
11.12	Expresión del eje Dll4-Notch4.....	53

12.	DISCUSIÓN.....	54
13.	CONCLUSIÓN.....	64
14.	PERSPECTIVAS.....	64
15.	REFERENCIAS.....	65

1. Resumen

El hígado no solo juega un papel único como centro metabólico del cuerpo, sino que también lleva a cabo otras funciones importantes como la biotransformación y detoxificación de fármacos y xenobióticos. El lipopolisacárido (LPS) se localiza en la pared celular de las bacterias gram-negativas y es un inmunógeno que induce la respuesta inflamatoria, asociada a un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO). La respuesta de defensa del huésped al LPS incluye la expresión de una variedad de citocinas pro-inflamatorias. Cuando este proceso es excesivo o prolongado, se presenta un daño local sistémico hacia los tejidos del huésped, resultando en la pérdida de las funciones normales fisiológicas como consecuencia de este daño. Sin embargo, el hígado responde contrarrestando el daño celular en el tejido. Durante este proceso se activan diferentes factores que regulan la expresión de genes y la síntesis de proteínas para contrarrestar el daño por la exposición al LPS. Se ha observado que la capacidad de reparación del hígado disminuye con la edad. Por lo que, en este trabajo se estudiaron algunos de los factores que están regulando el proceso celular cuando se genera un daño hepático en ratas jóvenes y adultas.

Se desarrolló un modelo de daño hepático al administrar LPS (0.5 mg/kg) a diferentes tiempos 12, 24, 48, 72 y 96 h en ratas de la cepa Wistar, jóvenes (4 meses) y adultas de (12 meses). Se determinó la concentración plasmática de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- α como respuesta a la administración de LPS, los resultados mostraron un incremento significativo a las 12 h en ambas

edades pero con mayor concentración en las ratas adultas, sin embargo, no se observaron cambios significativos en los otros tratamientos.

Se encontró un incremento en los marcadores de daño hepático ALT, AST desde las 24 h posteriores al tratamiento, que al igual que la expresión de citocinas inflamatorias, no cambió con respecto a las no tratadas en los otros tiempos evaluados. También se determinó el incremento al daño oxidante en el DNA, y se observó que la administración de LPS aumentó dicho daño en adultos y jóvenes, aunque en los organismos adultos el tiempo de reparación fue más prolongado. Un mecanismo de proliferación que se presenta preferentemente en organismos jóvenes es la vía de señalización de Delta-Like 4 (DLL4) Notch4, que corroboramos al evaluar los niveles de expresión de estas proteínas y en donde se observó que se encuentra más activa en jóvenes que en adultos. Por otro lado la muerte celular generada en respuesta al LPS fue principalmente por apoptosis, de acuerdo a la evaluación de proteínas apoptóticas como caspasa 3 (casp-3) y Bax. Se analizó la participación de p53 en la modulación de la respuesta al daño celular en donde se observó que la respuesta en la expresión es más tardía en jóvenes que en adultos. Sin embargo, aún resta por determinar los mecanismos de reparación activados por la vía de señalización Notch4-DLL4.

2. Summary

Liver plays a unique role as metabolic center that carries out most of xenobiotics and drugs biotransformation and detoxification. Lipopolysaccharide (LPS), which localizes in the gram-negative bacterial external membrane, is a known immunogen that induces inflammatory responses and enhances reactive oxygen species (ROS) generation. Host response to LPS includes the expression of a variety of pro-inflammatory cytokines. When this process is exacerbated it turns into local or systemic tissue damage, leading to physiological detriment. However, the liver is able to induce tissue regeneration by activating different transcription factors that regulate proliferation and repair genes expression; nevertheless this repair capacity decreases with age. Therefore, the aim of this work was to study some of the factors that are regulating cellular processes after liver damage depending on age. An hepatic damage model was developed administering LPS (0.5 mg/kg) at different time-points 12, 24, 48, 72 and 96 h. Young (4 months of age) and adult (12 months of age) Wistar rats were used. Plasmatic pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α were determined, and an increase was observed at 12 h for both ages, but adult animals presented a higher increment. ALT and AST were determined for general liver injury as well as 8-OHdG for oxidative DNA damage, which was higher in the adult rats suggesting that DNA repair mechanism was slower for these animals.

One of the proliferation mechanisms after liver injury is the Dll4-Notch4 pathway, so those two proteins were also evaluated; our results showed a higher expression

for both of them in young than in adult animals. Since most cell death after LPS treatment is due to apoptosis, Bax and casp-3 were also evaluated along with p53 as a damage reporter of damage DNA. In these regard we found that damage and death response in young animals is quicker and sustained, which was not the case for the adults.

However it might be important to continue with this study and determine other repair mechanisms activated by Dll4-Notch4.

3. Introducción

Se ha observado que conforme incrementa la edad de un organismo, también aumenta el estado inflamatorio el cual contribuye a exacerbar ciertos daños moleculares que se van acumulando y generando enfermedades (Lepperdinger, 2011). El estado de inflamación crónica produce cambios en órganos y tejidos, propiciando un desbalance en la homeostasis celular y dando lugar al desarrollo de enfermedades como las crónico-degenerativas hepáticas, que aumentan con la edad (Cankurtaran et al., 2006). El hígado no solo juega un papel único como centro metabólico del cuerpo, sino que también lleva a cabo otras importantes funciones, entre las que se encuentra la biotransformación y destoxicación, que se encarga de la eliminación de sustancias tanto exógenas como endógenas que son tóxicas y dañinas para el organismo. Por ejemplo, la endotoxina conocida como lipopolisacárido (LPS) localizada en la pared celular de las bacterias gram-negativas; siendo el principal objetivo para el reconocimiento por el sistema inmune (Parrillo, 1993). La respuesta de defensa del huésped hacia el LPS incluye la expresión de una variedad de citocinas pro-inflamatorias y la activación de vías de señalización. Es el de la vía de Notch que se relaciona con la regeneración y reparación hepática, para mantener la homeostasis de este órgano. Uno de los efectos observados en el envejecimiento del hígado es la disminución o retardo en la proliferación celular después de una pérdida de masa tisular tras una lesión quirúrgica o química (Conboy et al., 2005). Debido a que el hígado desempeña un papel central en la biotransformación y degradación de

toxinas, lo coloca como un órgano que puede ser altamente susceptible a daño. El principal efecto posterior al daño es la muerte de los hepatocitos. Otras evidencias indican el desarrollo de una amplia diversidad de eventos celulares, por los cuales el organismo trata de mantener la homeostasis celular. Se ha reportado el incremento de citocinas pro-inflamatorias como factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) o interleucina-6 (IL-6) que activan diferentes respuestas celulares tales como la proliferación, supervivencia y muerte celular (Papa et al., 2009).

3.1. Cambios hepáticos relacionados con el aumento en la edad

La pérdida de la capacidad regenerativa en el hígado es la alteración más dramática asociada con el incremento de la edad. Aunque este fenómeno se demostró hace más de 50 años, su base molecular no ha sido completamente aclarada. Se ha demostrado que conforme avanza la edad surgen alteraciones en varias vías de transducción de señales y cambios en la expresión de un sin fin de proteínas (Timchenko, 2009).

Aunque la mayoría de las funciones del hígado parecen mantenerse durante el envejecimiento. Como se ha señalado la incidencia de varias enfermedades hepáticas aumenta con la edad (Cankurtaran et al., 2006; Cuadrado et al., 2005). Sin embargo, el efecto más dramático en el hígado de organismos adultos y envejecidos es su proliferación celular retardada y/o reducida después de la pérdida de masa en una lesión quirúrgica o química (Bucher et al., 1964; Conboy and Rando, 2005; Fry et al., 1984; Lakova et al., 2003; Timchenko et al., 1998).

Durante el proceso de envejecimiento el hígado disminuye su tamaño y reduce el flujo sanguíneo del 30- 40 %, lo que produce cambios estructurales y bioquímicos (McLean y Le Couteur, 2004). Los cambios en la estructura del hígado en la microvascularización promueven implicaciones clínicas como la aterosclerosis y la susceptibilidad a toxinas, entre otros efectos (Le Couteur et al., 2001). Dicho deterioro correlaciona con una alteración en la biotransformación de los fármacos y xenobióticos (Gonzalez et al., 1998).

Existen evidencias que relacionan el envejecimiento del hígado con la disminución de la biotransformación de toxinas en la fase I (Le Couteur et al., 2001), el contenido de ATP (Selzner et al., 2007) e hipoxia en los hepatocitos (Cheluvappa et al., 2007), así como un incremento en la síntesis de lípidos y en el riesgo para desarrollar hepatocarcinoma (Nakajima et al., 2011).

3.2. Agentes causantes de daño en hígado

El daño hepático puede ser inducido por una gran diversidad de factores como virus, alcohol, ácido biliar tóxico, ácidos grasos, drogas, desarrollo de una respuesta inmune, y presencia de bacterias, etc. (Sharma, 2013; Younossi et al., 2013). Sin embargo, es bien sabido que los virus hepatotrópicos clásicos de la hepatitis, pueden infectar el hígado y causar lesión hepática. Otras infecciones sistémicas ocasionadas por virus o bacterias no hepatotrópicos, también pueden causar daño hepático, ya sea por invasión directa o indirecta a través de toxinas y/o citocinas, pero hay pocos informes de las correlaciones entre las anomalías de la función hepática y estas infecciones (Minemura et al., 2014).

3.3 Agentes bacterianos

El hígado está expuesto continuamente a una variedad de antígenos derivados del intestino. Se trata de sustancias ingeridas que se absorben hacia el torrente sanguíneo casi intacto o tan solo parcialmente digerido. Entre los antígenos derivados del intestino están las bacterias y/o sus productos tóxicos como el LPS. Por lo que el hígado juega un papel primordial en la respuesta inmune y en la limpieza de componentes tóxicos (Fox et al., 1989). En particular tanto los hepatocitos como las células de Kupffer son capaces de reconocer componentes bacterianos a través de los receptores tipo Toll (TLR), los cuales al ser estimulados producen una amplia gama de citocinas pro-inflamatorias y radicales libres de oxígeno (Fearnly et al., 1995). Dicho proceso propiciará la inflamación del hígado, que regularmente acompaña a la mayoría de los trastornos hepáticos crónicos y agudos, de modo que este es un proceso complejo que se origina en respuesta a una variedad de condiciones de estrés (Kubes y Mehal, 2012). Al igual que en la mayoría de otros órganos, la inflamación hepática se pone en marcha para proteger a los hepatocitos de una lesión, para favorecer la reparación de daños en los tejidos y para promover el restablecimiento de la homeostasis ejercer efectos hepato-protectores consistentes. Sin embargo, las respuestas inflamatorias que son demasiado intensas o que no se resuelven (es decir, se convierten en respuestas crónicas) se acompañan de una pérdida masiva de hepatocitos y por lo tanto causando un daño irreversible al parénquima del hígado (Schattenberg et al., 2006).

3.4 Lipopolisacárido

La endotoxina bacteriana o LPS, es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, entre otras. Desde que se confirmó el papel del LPS como causante de violentas reacciones patofisiológicas, en las que se evidenció un incremento en la respuesta inflamatoria, un estado séptico y otro tipo de respuestas celulares para contrarrestar la presencia de este inmunogénico;

muchos estudios han realizado para intentar establecer los mecanismos de transducción celular generados en la respuesta del organismo. Esta endotoxina consiste en un fosfoglicolípido anclado a la membrana bacteriana (lípidos A) unido covalentemente a un heteropolisacárido hidrofílico, región que le confiere la actividad biológica. El heteropolisacárido comprende dos regiones: la cadena *O-específica* también llamada *antígeno O*, formada por unidades repetitivas de oligosacárido y el *core* (*Centro*

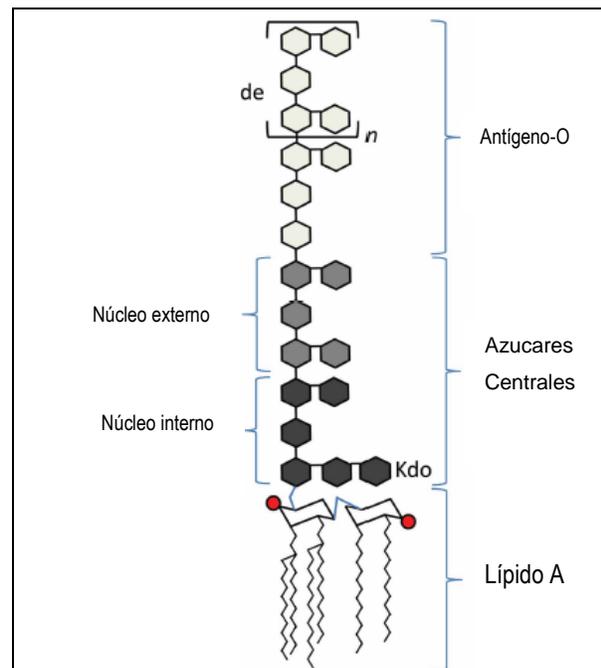


Figura 1 | Esquema de la estructura básica del lipopolisacárido.

El LPS consta de tres regiones: la parte inferior, lípidos A (con estructura de silla se indican los grupos di-glucosamina, los círculos rojos indican grupos fosfato, las líneas onduladas indican cadenas de acilo), azúcares centrales y el antígeno O, que se compone de unidades repetitivas de oligosacáridos (indicado entre paréntesis, con una "n"), (Maeshima y Fernandez, 2013).

estructural). Éste a su vez se subdivide en *core externo* formado por hexosas, mediante el cual se une al antígeno O; y el *core interno* formado por heptosas. El lípido A se une a esta porción mediante un residuo llamado KDO (ácido 2-keto-3-deoxioctanoico) (figura 1) (Schletter et al., 1995; Knirel, 2012; Maeshima y Fernandez, 2013).

3.5 Proceso de inflamación

La Inflamación en los tejidos es un proceso estrechamente regulado, que normalmente sirve para reclutar al sistema inmune a los sitios de la infección y/o lesión, y así facilitar los procesos de reparación tisular. La inflamación puede ser benéfica o perjudicial para el hígado y depende de varios factores. Se ha demostrado que si la respuesta inflamatoria es leve, ejerce efectos hepatoprotectores consistentes contribuyendo a la reparación de los tejidos y la promoción en el restablecimiento de la homeostasis. Por el contrario, si la inflamación es excesiva y permanente, puede inducir una pérdida masiva de hepatocitos. Tanto las células residentes del hígado (por ejemplo, células Kupffer, células estelares hepáticas, células endoteliales sinusoidales) y células que son reclutadas en respuesta a una lesión (por ejemplo, los monocitos, los macrófagos, células dendríticas y natural killers) emiten señales pro-inflamatorias, incluyendo la secreción de citocinas, quimiocinas, mensajeros lipídicos y especies reactivas de oxígeno que contribuyen a la muerte de los hepatocitos vía apoptosis o necrosis (Brenner et al., 2013). La inflamación en el hígado que acompaña a la mayoría de trastornos hepáticos agudos y crónicos, es un proceso complejo que

se origina en respuesta a una variedad de condiciones de estrés. Al igual que en la mayoría de otros órganos, la inflamación hepática se pone en marcha para proteger a los hepatocitos de una lesión, para favorecer la reparación de daños en los tejidos y para promover el restablecimiento de la homeostasis (Kubes y Mehal, 2012).

Cuando un estado inflamatorio es excesivo o prolongado, el daño local sistémico a los tejidos del huésped puede resultar en la pérdida de las funciones normales fisiológicas. Durante lesiones locales o producto de una infección, los monocitos y los macrófagos inician una respuesta inmune fagocitando al patógeno o material de éste, lo cual libera una variedad de mensajeros químicos o citocinas pro-inflamatorias tales como TNF- α , interleucinas (IL-1, IL-6,) y quimiocinas las cuales dan inicio a la respuesta de la fase aguda de la inflamación (Liaskou, 2012).

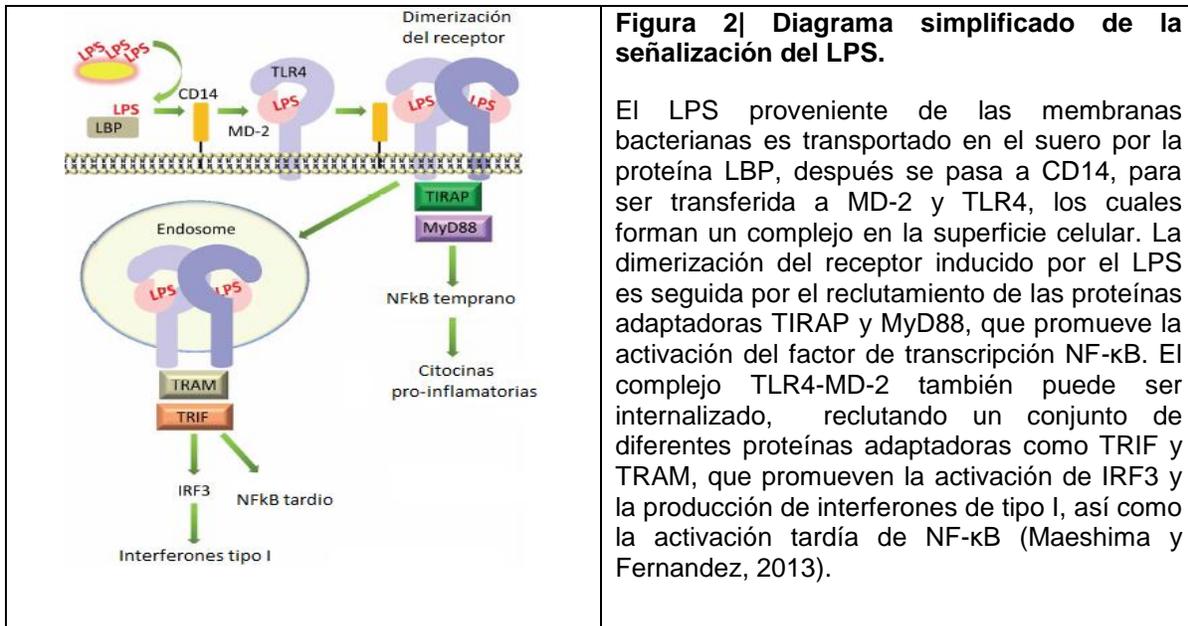
Las citocinas son proteínas pequeñas liberadas por varios órganos y células, son producidas prácticamente por todos los tipos celulares del hígado (Simpson et al., 1997) y se liberan en respuesta a un estímulo activador, induciendo respuestas mediante la unión a receptores específicos. Pueden actuar de manera autocrina, afectando la conducta de las mismas células que las liberan; de forma paracrina, afectando la conducta de células adyacentes; algunas citocinas son suficientemente estables como para actuar de una manera endocrina, afectando la conducta de células distantes, esto depende tanto de su capacidad para entrar a la circulación, así como, de su vida media en la sangre (Murphy, 2009).

Uno de los diversos tipos celulares que residen en el hígado son los macrófagos, los cuales secretan citocinas en respuesta a los patógenos, estas citocinas son un grupo de moléculas diverso desde el punto de vista estructural, que incluye a las interleucinas; IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , y la quimiocina CXCL8. La señalización del reconocimiento de patógenos por los fagocitos y células dendríticas es mediada por receptores, como los TLR. De esta forma pueden activarse de manera selectiva, las respuestas apropiadas conforme a las citocinas liberadas organizan la siguiente fase de la defensa del hospedero. Se ha observado que la forma en que TNF- α , desencadena una respuesta celular por la presencia de patógenos que portan LPS, la cual se ha reportado por tener una importancia particular en la contención de la infección por estos agentes, y cómo la liberación de diferentes quimiocinas que pueden reclutar y activar diferentes tipos de células efectoras (Murphy, 2009).

3.6 Mecanismo de acción del lipopolisacárido

Cuando el LPS se desplaza a través de la sangre formando parte de las bacterias o en forma libre (por la lisis de microorganismos), interacciona con algunas moléculas que se encuentran en el torrente sanguíneo. Entre estas moléculas están las proteínas bactericidas que incrementan la permeabilidad (BPI), las proteínas catiónicas denominadas CAP 18, CAP 37, y P15A/P15B, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y otras lipoproteínas, además de proteínas como la albúmina y la hemoglobina (Hb), entre las más importantes (Brandtzaeg, 1996).

Una de las moléculas a las que se liga el LPS es precisamente la proteína de unión al LPS llamada LBP, la cual forma un complejo con el LPS mediante su unión con el lípido A, que al parecer da lugar a la cascada de reacciones inmunes. La LBP podría actuar catalizando el paso de los agregados del LPS a monómeros transfiriéndolos preferencialmente al antígeno de diferenciación monocítico (CD14) (Heumann et al., 1998), el cual puede encontrarse en forma soluble o anclado a la membrana celular por un glicosil-fosfatidilinositol (GPI). El marcador de superficie CD14 presenta el LPS al complejo formado por la proteína MD-2 y el receptor TLR4 (TLR4-MD-2). Tras la unión del LPS, se piensa que el heterodímero TLR4-MD-2 dimeriza, formándose un dominio intracelular (TIR) que crea el andamio para la unión de proteínas adaptadoras (Lu et al., 2008), (ver figura 2). TLR4 puede activar dos vías de señalización distintas, las vías dependientes de Myd88 y TRIF. En la vía dependiente de Myd88, el dímero TLR4-MD-2 sobre la superficie celular recluta la proteína adaptadora TIRAP y Myd88 (Kagan y Medzhitov, 2006). Esto da paso a la cascada de señalización que culmina en la activación del factor de transcripción NF- κ B y la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Jirillo et al., 2002; Takeuchi y Akira, 2010). Sin embargo, TLR4 puede internalizarse a través de endosomas donde puede reclutar diferentes conjuntos de proteínas adaptadoras como TRAM y TRIF; en este caso la señal del factor de transcripción IRF promueve la producción de interferones y la activación tardía de NF- κ B (Kawai y Akira, 2011).



3.7 Señales de muerte celular en el hígado

Anteriormente se habló de la consecuencia de la inflamación en el hígado a nivel celular, que es la pérdida masiva y funcional del parénquima hepático a través de la apoptosis y la necrosis, que han sido implicadas en la muerte de los hepatocitos desencadenada por una variedad de agresiones hepatotóxicas tales como: infecciones virales y bacterianas (Galluzzi et al., 2008), trastornos metabólicos, el consumo excesivo de alcohol, y la intoxicación por xenobióticos (Schulze et al., 2011). Una de las señales extracelulares más importantes en este proceso es la presencia de TNF- α , el cual es producido en cantidades masivas por células hematopoyéticas expuestas a bacterias o LPS (Pfeffer et al., 1993).

TNF- α es una citocina pleiotrópica que induce efectos biológicos tan diversos como la proliferación celular, la activación metabólica, la respuesta inflamatoria y

la muerte celular (apoptosis y necrosis) (Liedtke y Trautwein, 2012). El ligando TNF- α unido al receptor TNF tipo 1 (TNFR1), puede provocar distintas cascadas de transducción de señales, dependiendo de varios factores. Generalmente la estabilización de TNFR1 en trímeros de TNF- α , es rápidamente conectada a la producción de ERO (Han et al., 2009) y a la activación de NF- κ B, orquestando respuestas pro-inflamatorias y de supervivencia (DiDonato et al., 2012).

3.8 Proceso de regeneración hepática

Los hepatocitos adultos tienen un tiempo de vida muy amplio y normalmente no proliferan, si no que mantienen su capacidad para proliferar en respuesta a una lesión tóxica o infecciosa (Taub, 2004; Fausto et al., 2006).

En general, se cree que hay dos eventos distintos en la regeneración del hígado. En cada evento, un tipo celular en particular es el responsable principal de restaurar la masa y las funciones del órgano. La primera forma de la regeneración se lleva a cabo después de una lesión leve o hepatectomía parcial y utiliza principalmente, a los hepatocitos maduros para reparar esta lesión (Fausto et al., 2006). La segunda forma se lleva a cabo después de una lesión hepática crónica o aguda, generada por productos químicos o bacterianos, y que sobrepasa la regeneración por los hepatocitos debido a su extensa eliminación. Este tipo de regeneración está mediada principalmente por las células progenitoras (Zhang et al., 2008). Las células progenitoras hepáticas están casi ausentes en los hígados normales y se expanden significativamente tras la lesión hepática y que expresan una serie de mediadores inflamatorios, citocinas y receptores que ayudan a

establecer la diafonía celular necesaria para la homeostasis epitelial. Por desgracia, la expansión continua de esta población de células está asociada con una inflamación crónica, la activación de las células mesenquimales, y con fibrosis portal (Fabris et al., 2007). Recientemente se ha estudiado un importante mecanismo de señalización celular que participa en la regeneración del daño hepático, se trata de la vía de señalización de Notch que se considera un determinante crucial de la decisión del destino celular durante desarrollo embrionario. Los efectos de Notch son estrictamente dependientes del contexto celular en el que se active. En el hígado, la señalización de Notch está implicada en la regeneración, la reparación, el metabolismo del hígado, la inflamación y el cáncer. La señalización de Notch se regula finamente en varios niveles. La complejidad de esta vía de señalización ofrece varios objetivos posibles para el desarrollo de agentes terapéuticos capaces de inhibir o activar dicha vía (Morell y Strazzabosco, 2013).

3.9 Señalización de Notch

La vía de señalización de Notch es un proceso intercelular altamente conservado implicado en numerosos procesos biológicos incluyendo la determinación del destino celular, la diferenciación, proliferación, supervivencia y apoptosis (Artavanis et al., 1995; Weinmaster, 1997).

Se conocen cuatro receptores transmembranales para Notch (Notch-1, -2, -3, -4) y dos tipos de ligandos, Serrate/Jagged (Jag-1, -2) o Delta-like (Dll-1, -3, -4) que constituyen el sistema Notch, junto con otros componentes que regulan la

transducción de la señal. La activación de la señalización de Notch requiere un contacto directo entre las células que expresan los ligandos específicos y las células que expresan los receptores. A menudo tanto las células que reciben como las que transmiten son modificadas por la interacción (Fortini, 2009). Esto genera un gran número de combinaciones de ligando-receptor, que pueden generar distintas respuestas. Sin embargo, estas combinaciones ligando-receptor en la señalización de Notch son en gran parte desconocidas. Además de los ligandos

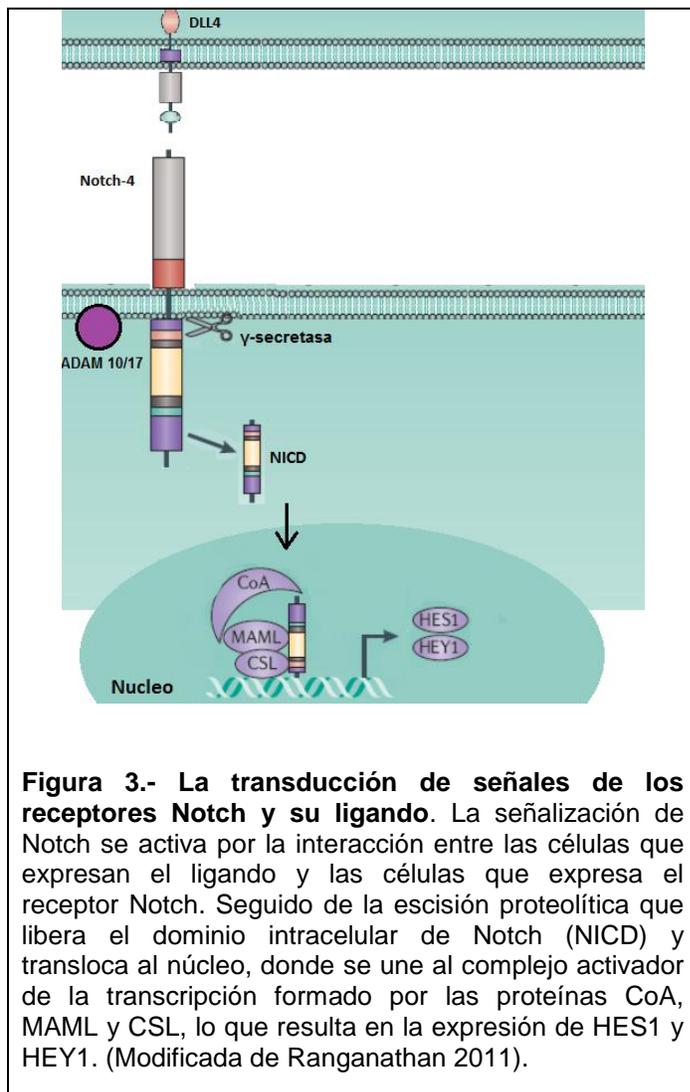


Figura 3.- La transducción de señales de los receptores Notch y su ligando. La señalización de Notch se activa por la interacción entre las células que expresan el ligando y las células que expresa el receptor Notch. Seguido de la escisión proteolítica que libera el dominio intracelular de Notch (NICD) y transloca al núcleo, donde se une al complejo activador de la transcripción formado por las proteínas CoA, MAML y CSL, lo que resulta en la expresión de HES1 y HEY1. (Modificada de Ranganathan 2011).

de la vía canónica, un gran conjunto de ligandos por la vía no canónica puede activar o inhibir la señalización de Notch (D'Souza et al., 2010).

La activación de la señalización de Notch se caracteriza por sucesivas escisiones proteolíticas desencadenadas por la interacción entre los receptores de membrana Notch y los ligandos expresados en una célula vecina. La primera escisión de activación está mediada por una desintegrina y

por la metaloproteinasa ADAM10 o ADAM17 seguido de la interacción del ligando-receptor de Notch, lo que hace que se exponga el sitio diana ADAM. El complejo γ -secretasa es responsable de la segunda escisión proteolítica que conduce a la liberación de dominio intracelular Notch NICD en el citosol. Después de la translocación nuclear, NICD forma un complejo nuclear con el factor de transcripción, CSL (CBF1 / RBP-j / Su (H) / Lag-1), y se activa la transcripción de los genes diana rio abajo. Un interruptor molecular dentro de este complejo permite por último, la expresión de los principales genes diana de la señalización Notch incluyendo Hairy, el potenciador de la división (Hes1, 5 y 7) y las proteínas relacionadas con Hes (HEY1 y, 2), los cuales regulan indirectamente numerosas expresiones de genes (Iso et al., 2003) (figura 3).

3.10 Notch como medio compensatorio al daño hepático

En el hígado adulto, los diversos componentes de Notch se expresan tanto en compartimentos epiteliales como mesenquimales y son regulados diferencialmente en caso de la lesión hepática. Notch-1 y -2 se expresan en el epitelio de las células del hígado y daños biliares que son sobre-expresados en los colangiocitos, mientras que Notch-3 y -4 se expresan en las células endoteliales y mesenquimales (Nijjar et al., 2001).

En células endoteliales, la activación de Notch-4 y Notch-1, a través de la transfección del dominio intracelular de Notch o a través de la presentación de DLL4, se inhibe la proliferación. En células endoteliales, la expresión basal de los

receptores de Notch y sus ligandos contribuye al mantenimiento de la quiescencia (Nosedá et al., 2004).

Se ha observado que DLL4, en ratones, presenta una mayor migración endotelial (Benedito et al., 2008). La inhibición por siRNA de Notch4 limita el proceso de reparación de lesiones en células *in vitro* (Quillard et al., 2008). La activación de Notch a través de Notch1, Notch4 y DLL4 se requiere para el desarrollo de nuevos vasos. El bloqueo o sobre-activación de esta vía induce una mayor proliferación endotelial (Quillard y Charreau, 2013).

Aunque la vía canónica de Notch es relativamente simple, sin embargo muchas otras moléculas pueden influir en la señalización de Notch, como el factor nuclear NF- κ B, la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), el factor de crecimiento transformante (TGF), las vías del óxido nítrico (NO) y la hipoxia, entre las más interesantes (Heitzler, 2010).

4. Antecedentes

El hígado juega un papel único como centro metabólico del cuerpo y también lleva a cabo otras importantes funciones, entre ellas se encuentra la biotransformación y detoxificación, la cual se encarga de la eliminación de sustancias tanto exógenas como endógenas que son tóxicas y dañinas para el organismo, por lo que el hígado tiene un alto porcentaje de susceptibilidad a dañarse. El daño hepático puede ser inducido por una gran diversidad de factores como virus, alcohol, ácidos grasos, respuesta inmune y bacterias (Sharma, 2013; Younossi et

al., 2013). Los agentes bacterianos como el LPS puede inducir la producción de ROS intracelular y extracelular, las cuales pueden difundir hacia el interior de las células e incrementar ERO intracelulares además de generar daño oxidante. La vía de señalización del LPS puede inducir una sobre regulación de Cox-2 en células de la microglía. Recientes reportes sugieren que a través de la activación NADPH oxidasa, el LPS aumenta las ERO intracelulares (Wang, 2004). También se ha descrito que dan paso a la cascada de señalización que culmina principalmente en la activación del factor de transcripción NFκB y la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF-α, IL-1β e IL-6 (Jirillo et al., 2002; Takeuchi y Akira, 2010), por lo que se ha establecido como un modelo de inflamación.

La inflamación puede ser benéfica o perjudicial para el hígado, y depende de varios factores. Si la respuesta inflamatoria es leve se ha demostrado que ejerce efectos hepato-protectores consistentes, contribuyendo a la reparación de tejidos y promover el restablecimiento de la homeostasis. Por el contrario, si la inflamación es excesiva y permanente puede inducir una pérdida masiva de hepatocitos (Kubes y Mehal, 2012).

El deterioro progresivo de órganos y tejidos afectan la función del cuerpo (García et al., 2013), como se ha observado en ratones viejos donde la respuesta de proliferación en el hígado se encuentra atenuada en comparación con ratones jóvenes (Bucher et al., 1964; Conboy et al., 2005; Fry et al., 1984; Timchenko et al., 1998), y si se suma a esto el estado crónico inflamatorio en el que se encuentra un organismo envejecido, se vería afectado el proceso de regeneración

y reparación del hígado. Fausto y colaboradores demostraron que durante la regeneración del hígado después de una lesión, los hepatocitos que se encontraban quiescentes se someten a una o dos rondas de replicación para restaurar la masa del hígado perdida en dicha lesión por un proceso compensatorio (Fausto et al., 2006). En experimentos con ratones se ha observado al realizar hepatectomía parcial solo el 99 % de hepatocitos restantes proliferan en hígados de ratones jóvenes, mientras que solo el 30% de los hepatocitos de hígados de ratones viejos se someten a dicha proliferación (Stocker y Heine, 1971).

Resultados del nuestro grupo de trabajo demuestran el incremento en la expresión de moléculas relacionadas con la proliferación hepática; tanto progresión como inhibición del ciclo celular en un modelo de ratones viejos comparado con ratones jóvenes (González, 2011).

Diversas vías se han encontrado participando en los procesos de regeneración. Recientemente se ha expuesto que Notch desempeña un papel clave en la capacidad de regeneración de la auto-renovación de algunos órganos. La vía de señalización de Notch es un proceso intercelular altamente conservado implicado en numerosos procesos biológicos como la proliferación (Heitzler, 2010). En estudios recientes se ha mostrado que la exposición de células estelares a suero de organismos jóvenes aumenta la expresión del ligando DLL4 y la activación de Notch, incrementando la proliferación celular *in vitro* (Rando, 2006).

Evidencia reciente pone de manifiesto que las respuestas inflamatorias regulan la señalización de Notch en trastornos que involucran a estos procesos. La inflamación influye a la señalización de Notch mediante la regulación de funciones celulares clave (diferenciación, proliferación, apoptosis y supervivencia) (Quillard y Charreau, 2013).

5. Justificación

En la actualidad México experimenta grandes cambios demográficos, en particular se ha incrementado la población adulta y la de la tercera edad, aumentando así el riesgo de padecer enfermedades relacionadas con la edad. En México las enfermedades hepáticas son la tercer causa de muerte, las cuales están estrechamente relacionadas con el aumento en la edad, ya que se ha observado que los cambios que se generan en los procesos biológicos relacionados con el incremento de la edad en muchos órganos y tejidos, conducen al desarrollo de enfermedades, alterando la homeostasis del organismo (Timchenko, 2009).

Uno de estos procesos biológicos que se ven modificados con el aumento de la edad, es la presencia de un estado inflamatorio (Gupta et al., 2013; Lepperdinger, 2011), como lo evidencian la activación y producción de citocinas pro-inflamatorias, tales como; IL-1 α , IL-6 y TNF- α (Szabo y Csak, 2012). Cuya desregulación de estas citocinas puede inducir la apoptosis (Tacke et al., 2009).

Existen características fisiológicas plenamente reconocidas en organismos envejecidos, entre las que se incluyen: una disminución en su capacidad regenerativa y de reparación hepática, estado inflamatorio aumentado, entre otros.

Teniendo en cuenta, lo anterior. Resulta importante entender lo que pasa en un hígado ante un daño inducido por un agente que induce la respuesta inflamatoria y la descripción de este proceso mediante la evaluación de diferentes biomarcadores, entre los que se encuentran aquellos que participan en la respuesta al daño celular y los que se relacionan con el proceso de reparación. Además resulta interesante comparar la capacidad de respuesta que tienen organismos de diferente edad ante el mismo reto inmunogénico y si estos emplean el mismo mecanismo de reparación, así como también resulta interesante conocer las diferencias en el tiempo de respuesta al estrés. Como hemos mencionado anteriormente la vía de señalización Dll4-Notch-4 está involucrada en procesos de proliferación celular. Además, de que se ha descrito como un mecanismo preponderante en la reparación del daño hepático. Por lo que, resulta por demás interesante la descripción de su participación en la reparación del daño hepático inducido por un inmunógeno como lo es el LPS, y con ello tratar de establecer los posibles mecanismos que sean utilizados con vistas a desarrollar terapias contra el daño hepático.

6. Pregunta de investigación

¿Cómo modifica el estrés pro-inflamatorio crónico los mecanismos de proliferación celular en el hígado en ratas de diferentes edades?

7. Objetivo general

Determinar el efecto de la edad en la capacidad de reparación del daño hepático en ratas adultas y jóvenes ante un reto pro-inflamatorio sistémico.

8. Objetivos particulares

- Inducir y caracterizar un estado de estrés pro-inflamatorio crónico, a través de la administración de LPS en ratas a diferentes edades.
- Evaluar marcadores de daño hepático en ratas de diferentes edades en respuesta un reto pro-inflamatorio.
- Determinar la expresión del ligando Dll4 y el receptor Notch4, relacionados con la reparación del daño hepático.
- Comparar en organismos de diferentes edades, el perfil pro-inflamatorio, el daño hepático y la expresión de las proteínas relacionadas con los mecanismos de reparación en organismos de diferentes edades.

9. Hipótesis

El LPS es un inmunógeno capaz de inducir un daño hepático mediante el incremento de la respuesta inflamatoria, por lo que se espera que la respuesta celular al estrés pro-inflamatorio crónico inducido con el LPS se presente disminuida en ratas adultas en comparación con ratas jóvenes.

10. Material y métodos

10.1 Material biológico (animales)

Se utilizaron dos grupos de ratas de la cepa Wistar de 4 meses de edad (jóvenes,) y de 12 meses (adultas,). Los animales se obtuvieron del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar (temperatura ambiente, con un ciclo de luz normal y con libre acceso de comida y agua) y se manejaron de acuerdo a los criterios establecidos por la “Guía para el cuidado de los animales del laboratorio” (Edición Mexicana auspiciada por la academia Nacional de Medicina) y a la norma oficial mexicana 062- ZOO-1999. En total se emplearon 18 ratas jóvenes y 18 ratas adultas. Se asignaron 3 ratas para cada tiempo (control, 12, 24, 48, 72 y 96 horas) para ambos grupos.

10.2 Tratamientos con LPS

A los animales de los grupos controles, tanto jóvenes como adultos, se les inyectó solución salina 0.9% de manera intraperitoneal, mientras que a las ratas tratadas se les administraron 0.5 mg/Kg de LPS el cual se disolvió en solución salina al 0.9% (Starr et al., 2013). Se les administro LPS a las ratas y cumplidas las 12 h se sacrificaron para los estudios correspondientes, pasadas las 24 h se sacrificaron las ratas de ese tiempo y las restantes se les administro de nueva cuenta LPS 0.5 mg/Kg y cumplidas las 48 h se sacrificaban y así sucesivamente. De modo que para las ratas de 12 y 24 h solo fue una inyección de LPS mientras que para las de 48 h fueron 2 inyecciones, para las de 72 h fueron 3 inyecciones y para las de 96 h fueron 4 inyecciones. Las ratas se sacrificaron a los tiempos establecidos, se perfundieron las ratas con PBS para limpiar el hígado, posteriormente se extrajeron los hígados y la sangre de las ratas jóvenes y adultos.

10.3 Evaluación de marcadores de daño hepático mediante ALT y AST

En el suero de las ratas tratadas y no tratadas con el LPS y se midieron los niveles séricos de las enzimas; aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) para evaluar el daño hepático. Se realizaron mediciones de los plasmas obtenidos a las 0 (controles), 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de haberlas tratado con LPS. Una vez obtenidas las muestras se realizaron diluciones para evitar valores fuera de rango y se aplicaron 30 µL de la muestra sobre tiras

reactivas especiales para cada parámetro o enzima. Las tiras reactivas con la muestra se procesaron en un fotómetro de reflexión automático de la marca Roche. Los niveles de enzimas se expresaron como unidades por litro.

10.4 Cuantificación de citocinas pro-inflamatorias por técnica de ensayo inmunoabsorbente en fase sólida (ELISA)

Las proteínas extraídas de los hígados se cuantificaron de ratas tratadas con 0.5 mg/Kg de LPS y sin tratar mediante la técnica de Bradford (1976). Se realizaron los ensayos de ELISA con los kit (Rat TNF- α ELISA MAXTMDeluxe Set de la marca BioLegend), (Rat IL-6 ELISA KIT LEGEND MAXTM de la marca BioLegend). Para ambos Kits se realizó una dilución 1X del diluyente (IL-6 Y TNF- α) Rat Elisa Kit. Se preparó el liofilizado a una concentración final de 2 ng/mL (IL-6 Y TNF- α). Se realizó una curva de calibración con 8 diferentes estándares, se agregaron 50 μ L de cada uno en las placas contenidas en los kit. Previamente, los sueros obtenidos de las ratas de diferentes edades con y sin tratamiento se diluyeron 1:5. Se tomaron 50 μ L de cada muestra y se colocaron en la placa del kit que contenía el anticuerpo de captura, que se dejó incubar durante 2 h a temperatura ambiente en agitación lenta. Transcurrido el tiempo de interacción, la placa se lavo agregando 200 μ L de una solución referida durante 5 veces. Luego, se añadió el anticuerpo de biotinilado 1X, 50 μ L en cada pozo y se incubó 2 h a temperatura ambiente. Se eliminó el anticuerpo de detección y la placa se volvió a lavar 5 con una solución 1X. La placa se seco y se agregaron 50 μ L de estreptavidina peroxidasa 1:100, y se dejó incubar 30 min. Nuevamente se realizaron 5 lavados y

se adicionaron 50 μ L del cromógeno para incubar durante 10 min. Se adicionaron 50 μ L de la solución de paro, y finalmente, la absorbancia producida por el cromógeno se leyó a 450 nm de longitud de onda. A partir de la curva de calibración realizada con las proteínas estándar se determinó la concentración de las proteínas de interés.

10.5 Procesamiento de tejidos

Una vez obtenidos los hígados siempre se procuro tomar de la misma región del hígado los fragmentos a procesar. Se utilizó el procesamiento histológico estándar (Prophet, 1995), con algunas modificaciones en los tiempos de fijación. Se obtuvieron cortes de 5 μ m de espesor de los hígados de todas las ratas jóvenes y adultas. Posteriormente se realizó la técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E).

10.6 Análisis morfométrico

Una vez que se obtuvieron las H&E de los tejidos se realizo un análisis morfométrico el cual consistió en hacer un conteo de 500 células por campo, tomando como referencia una vena central, se realizo el conteo por triplicado para cada laminilla. De cada experimento se contaron cuántas células se encontraban en división celular y cuantas presentaban características de células picnoticas, mediante sus características morfológicas.

10.7 Extracción de DNA e hidrólisis enzimática

La extracción de DNA, la hidrolisis enzimática y el análisis de 8-oxo-7, 8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodGuo) se realizó por detección electroquímica HPLC. Se

extrajo el DNA de los hígados de ratas de la cepa Wistar tratados con LPS 0.5 mg/Kg y sin tratar usando el método de extracción caotrópica de Nal (Wang et al. 1994) como el modificado por Matos et al. 2001. Se pesaron .2 g del tejido y se agregaron 1000 μ L del amortiguador A (.32 M sacarosa, 5 mM MgCL₂, 10 mM Tris-Hcl, .1 mM Desferroxamina y 1% Triton X100) frío. Se homogenizo y se centrifugo a 1500 G a 4°C por 10 m. Se descarto el sobrenadante y se agregaron 1000 μ L de amortiguador A, se re-suspendió el botón y se centrifugo bajo las mismas condiciones. Se descarto el sobrenadante y se agregaron 1000 μ L del amortiguador B (10 mM tris-Hcl, 5 mM EDTA-Na₂, .15 mM Desferroxamina), se re-suspendió el botón y se agrego 100 μ L de SDS 10 % y se agito levemente, se agregaron 40 μ L de Rnasa T1 y 60 μ L Rnasa A, se agito por inversión y se incubo a 37°C por 1 h. posteriormente se agrego proteinasa K y se incubo a 37°C por 1 h, pasa ese tiempo se centrifugo a 5000G a 4°C por 15 m. Se recupero el sobrenadante y se coloco en hielo y se le agrego 1 mL de la solución de Nal y 1 mL de isopropanol absoluto frío y se agito por inversión. Se almaceno a -20°C toda la noche. Al siguiente día se transfirió a tubos eppendorf estériles y se centrifugo a 9000G a 4°C por 15 m, se decanto el sobrenadante y posteriormente se agrego 1 mL de isopropanol al 60% frío y se resuspendió lentamente, se centrifugo a 9000G a 4°C por 15 m y se decanto el sobrenadante, se agrego 1 mL de isopropanol 70% frío se resuspendió y se centrifugo a 9000G a 4°C por 15 m y se decanto el sobrenadante. Se agregaron 200 μ L de dexferrosamina .1mM y se resuspendió el botón.

La concentración de DNA fue determinada espectrofotométricamente a 260 nm y su pureza fue determinada de acuerdo al cociente A_{260}/A_{280} . El cociente de pureza de las muestras fue > 1.8 .

Para cada inyección se utilizaron 100 μg de DNA los cuales fueron diluidos en un volumen total de 100 μL con una solución que contenía 4 μL de acetato de sodio 1M y 5 unidades de nucleasa P1; La solución fue incubada a 37°C durante 30 min. Después se le adicionaron 150 μL de una solución 1 M de Tris-HCL (pH 7.4) y 3 unidades de fosfatasa alcalina de *E. coli* y se incubo a 37°C durante 1h. Las muestras fueron centrifugadas y la fase acuosa fue analizada por HPLC.

10.8 Cuantificación de 8-oxo-dGuo por HPLC

El DNA digerido (100 μg fue inyectado en un sistema cromatográfico en fase reversa, con una fase móvil de fosfatos 50 mM al 92% y 8% de metanol a un pH 5.5. La separación de los nucleósidos se realizo con una columna c-18 con un tamaño de partícula de 5 μm y una longitud de 25 cm de largo, fue eluída isocráticamente a un flujo de 1mL/min. Los nucleósidos fueron detectados espectrofotométricamente con un detector waters VIS/UV a una longitud de onda de 254 nm y posteriormente la detección del aducto 8-oxo-desoxiguanosina (8-oxo-dGuo) fue realizado a 290 mV en el detector EC.

10.9 Análisis de inmunodetección en papel (western blot)

Se extrajeron las proteínas de los hígados obtenidos de los animales tratados con LPS 0.5 mg/Kg y los controles con buffer de lisis que contenía 100 µL de ditioneitol (DTT) 0.1 M, 100 µL PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 0.1 mM, 1 pastilla de un coctel de inhibidores de proteasas minicomplete (Roche, francia), y 10 mL de buffer de lisis T-Per. Los homogenados celulares fueron incubados a 4°C durante 10 min y posteriormente centrifugados 1400 rpm a 4°C durante 20 min. La concentración de proteína en el sobrenadante se determinó usando el reactivo comercial (BIO RAD, USA). Para la separación de las proteínas totales se usaron geles de poliacrilamida prefabricados de gradiente de 4-20% (BIO RAD, USA). Se utilizo una cámara de electroforesis vertical (BIO RAD, USA). Que se transfirieron a membrana de polivinilo, las membranas fueron bloqueadas con TBS-Tween 0.1 % de leche libre de grasa durante 1 h, y posteriormente se incubaron con anticuerpos monoclonales específicos: anti-casp-3, anti-Bax, anti-Bcl2, anti-p53, anti-Ciclina D1, anti-Notch4, anti-DLL4, a una dilución 1:1000 durante 12 h. Las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-Tween e incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce, Rockford IL, USA) durante 1 h. Después se lavo la membrana tres veces, los blots fueron revelados utilizando un reactivo quimiolumincente comercial (Supersignal Pierce, Rockford IL, USA).El revelado se realizó en un fotodocumentador (Gel Logic 1500 ImagingSystem) para observar la fluorescencia generada en la reacción de la peroxidasa, indicando la presencia de cada proteína.

10.10 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron comparados mediante un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para muestras con respecto al control. En todas las pruebas se utilizó un nivel de probabilidad de 0.05 ($p < 0.05$) como criterio mínimo de significancia.

11.Resultados

11.1 Evaluación de marcadores séricos de daño hepático

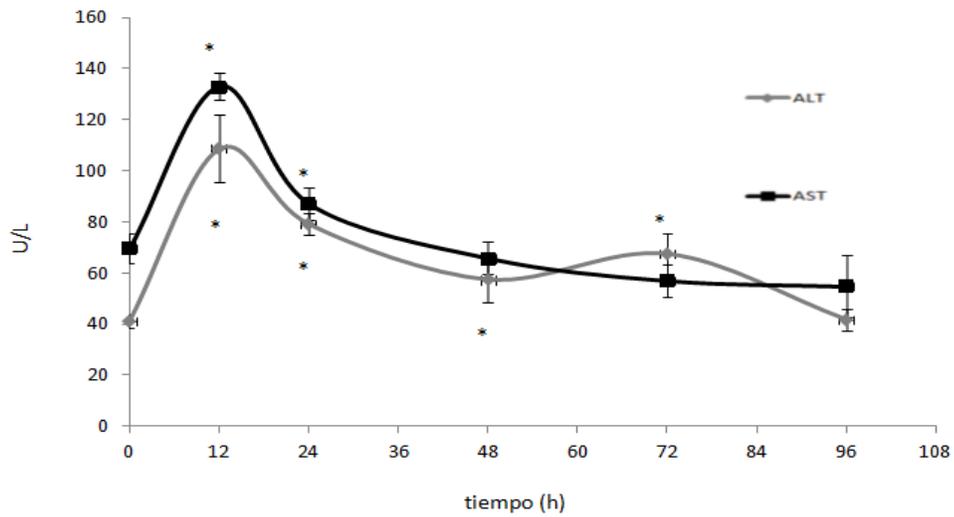
Los hepatocitos y los capilares biliares responden al daño con desordenes estructurales de sus membranas y organelos, dependiendo de la intensidad del daño así como la duración a la exposición, aparecerán lesiones morfológicas en varias formas y combinaciones (inflamación, proliferación, necrosis, fibrosis, etc.), estas formas de daño morfológico marcan la aparición de ciertos trastornos bioquímicos de intensidad variable y en varias combinaciones. Como las proteínas de alto peso molecular, las enzimas son componentes esenciales de las ultraestructuras de celulares, por lo que pueden ser usadas como marcadores de daño. Un incremento en la permeabilidad o daño en las membranas celulares hepáticas ocasionara que enzimas citoplasmáticas (ALT, AST, γ -GT, LDH) entren en contacto con el plasma. Solo durante la necrosis celular se genera la destrucción de la mitocondria y el retículo endoplásmico, donde se localizan las enzimas (GDH, AST, γ -GT) y entran en contacto con el sistema circulatorio. Por lo

que la gravedad y el tipo de daño celular se determinan por la relación entre las enzimas localizadas en el citoplasma y la mitocondria, además de que el nivel de los valores de las enzimas suministra información sobre la extensión del daño del parénquima hepático. Las transaminasas catalizan la transformación reversible de α -cetoácidos en aminoácidos. Con mayor frecuencia, tanto la transaminasa ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) se utilizan para el diagnóstico de daño hepático. Mientras AST se distribuye de manera uniforme, la concentración de ALT disminuye continuamente desde el área periportal a la región pericentral en el acino. De manera que las proporciones entre estas dos enzimas no sugieren que generalmente en el daño hepato-celular, el valor de ALT en suero generalmente excede el valor de AST, y se denominada como una inflamación moderada. Sólo durante un daño hepático severo con la destrucción de la mitocondria hace que la actividad de AST supere la de ALT, porque la porción mitocondrial de AST se filtra en el suero, esto constituye la base para la relación de DeRitis (Kuntz y Kuntz, 2006). Para determinar el daño hepático inducido con el LPS en un mecanismo que se ha descrito por incrementar el proceso inflamatorio, en ratas jóvenes y adultas; se estimó la actividad enzimática de ALT y AST a diferentes tiempos después del tratamiento con el LPS. Nuestros resultados muestran en ambos grupos un incremento en el daño hepático a las 12 h posteriores al tratamiento con el LPS, los niveles de AST y ALT mostraron un incremento de 1.9 y 2.6 veces a las 12 h respectivamente y de 1.9 y 1.2 veces a las 24 h respectivamente en ratas jóvenes con respecto a su control, pero no así en los adultos, debido a que solo se observó un incremento significativo en AST

de 1.79 veces a las 12 h, 1,5 veces a las 24 h y 1.2 veces a las 48 h, restableciendo sus valores a las 72 h (figura 4 a y b). Para determinar la magnitud del daño inducido por el LPS, se procedió a cuantificar la relación de DeRitis (DeRitis et al., 2006) el cual se calculó mediante la determinación del cociente AST/ALT. Este parámetro sirve para estimar la magnitud del daño. Esto es, los valores del cociente inferiores a 1. Mientras que un valor superior a 1 puede ser interpretado como un daño severo.

El índice de DeRitis, las ratas adultas presentaron un daño severo a partir de las 12 h, pero lograron recuperarse del insulto hasta las 96 h, en donde se aprecia un daño moderado en respuesta al estrés inducido por el LPS. Lo que sugiere un mecanismo de adaptación al estrés. En comparación las ratas jóvenes muestran un daño moderado en todos los tiempos evaluados, lo que sugiere una mejor capacidad de adaptación al estrés inducido por el LPS (Tabla 1). Un dato relevante que muestra la capacidad de adaptación de los dos grupos tratados con LPS es que muestran un mayor incremento en la actividad de estas enzimas se observa a las 12 h posteriores al tratamiento con LPS y que esa actividad se disminuye de manera significativa hasta ser muy semejantes a los niveles basales a pesar de que los individuos fueron tratados cada 24 horas, lo que resulta ser una evidencia de la respuesta adaptativa al estrés y en donde se observa una mayor tolerancia al LPS en ambos grupos de estudio analizados.

a) Ratas jóvenes



b) Ratas adultas

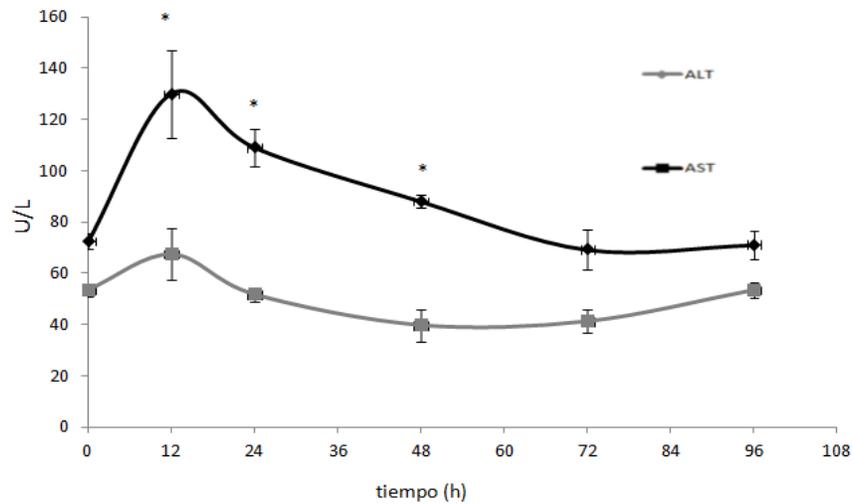


Figura 4.- Actividad sérica de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT). a) y b) Se realizó en ratas de 4 y 12 meses de edad en respuesta al reto pro-inflamatorio producido con una dosis de 0.5 mg/Kg de LPS. Las determinaciones se realizaron en intervalos de tiempo de 0 h a 96 h. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar (DS) La significancia estadística con respecto al control fue marcada con * $p < 0.05$

Relación DeRitis

Ratas jóvenes (4 meses)		Ratas adultas (9 meses)	
LPS .5 mg/Kg	AST /ALT	LPS .5 mg/Kg	AST /ALT
NT	1	NT	1
12 h	0.72228162	12 h	1.41966864
24 h	0.65045484	24 h	1.55504217
48 h	0.67791097	48 h	1.64167144
72 h	0.49971542	72 h	1.24297752
96 h	0.77927527	96 h	0.98231373

Tabla 1.- Las tablas muestran el cociente entre AST/ALT

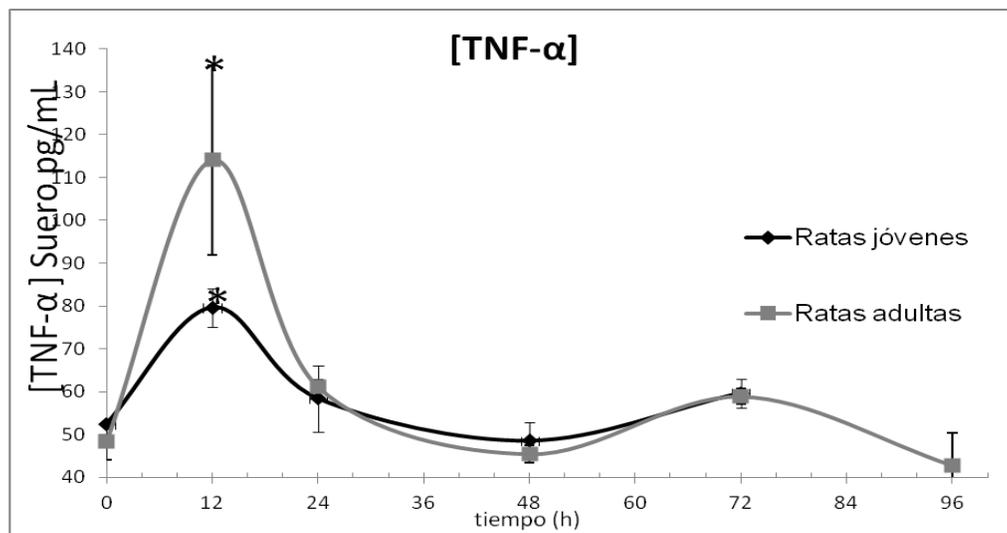
11.2 Estado inflamatorio sistémico en ratas a diferentes edades en respuesta al tratamiento con LPS

Para tratar de conocer si el LPS generó un estado de estrés inflamatorio, se cuantificaron la concentración en suero de las citocinas pro-inflamatorias que se encuentran estrechamente implicadas en la patogénesis del daño hepático inducido por LPS, estas fueron IL-6 y TNF- α en las ratas jóvenes y adultas tratadas con LPS por 96 h.

Los resultados muestran los efectos del LPS sobre los niveles de citocinas pro-inflamatorias en el suero. Se observa que la concentración sérica de TNF- α se incrementó 236 % a las 12 h posteriores al tratamiento en las ratas adultas, mientras que en las ratas jóvenes se observó un incremento del 151 % con respecto a sus controles no tratados, ($p < 0.05$) (figura 5 a); mientras que la IL-6 sérica presentó un incremento de 481 % a las 12 h posteriores de haberse

administrado el LPS en ratas adultas; mientras que en las ratas jóvenes el incremento fue de 189 % (figura 5 b). Un resultado interesante observado fue que a pesar de seguir administrando dosis sucesivas de LPS, ya no se observa un incremento de las citocinas, sino que los niveles disminuyen a los basales. Este resultado al igual que la determinación del daño hepático evaluado por la actividad de las enzimas ALT y AST muestra un probable mecanismo de respuesta adaptativa a la exposición al LPS.

a)



b)

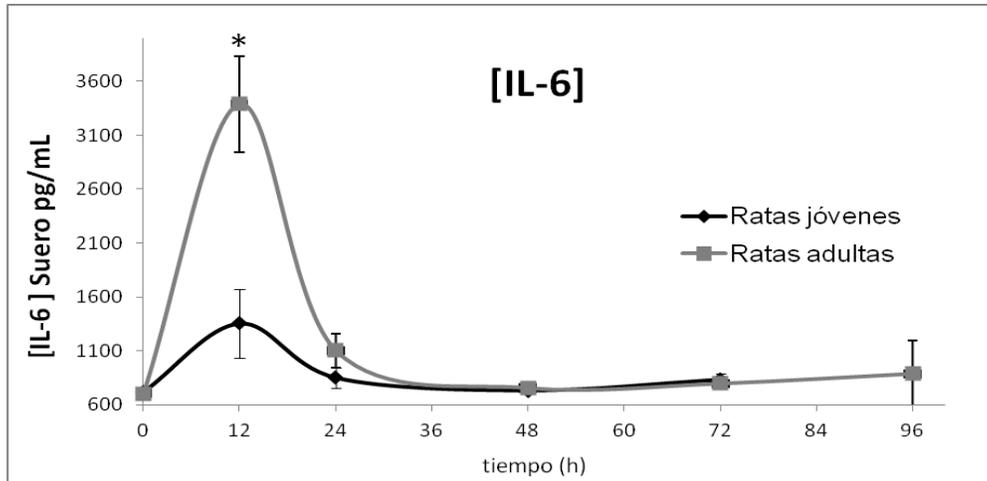


Figura 5.- a) Contenidos séricos de TNF- α en plasma de ratas adultas y jóvenes tratadas con 0.5mg/Kg de LPS, por 96 horas para ratas adultas y 72 h para ratas jóvenes. b) Los contenidos séricos de IL-6 en plasma en ratas jóvenes y adultas tratadas con 0.5 mg/Kg de LPS, por 96 horas para ratas adultas y 72 h para ratas jóvenes. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes \pm la DS La significancia estadística con respecto al control fue marcada con * $p < 0.05$

11.3 Histología hepática y análisis morfométrico

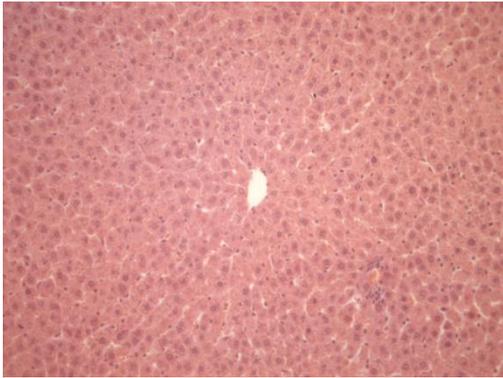
Para determinar el daño hepático y el tiempo de reparación a nivel tisular posteriores al tratamiento con el LPS se realizó un análisis de los cambios histológicos. En los cortes histológicos correspondientes a las ratas jóvenes a las 12 h se observó presentaban infiltrado inflamatorio así como la presencia de hepatocitos picnóticos y una dilatación en el espacio sinusoidal.

Por otro lado, a las 24 h se observó una disminución considerable del infiltrado inflamatorio y una reducción en el tamaño de los espacios sinusoidales. Hacia las 48 y 72 h los tejidos presentaron estructuras similares a los animales control (figura 6 a, b, c, d y e).

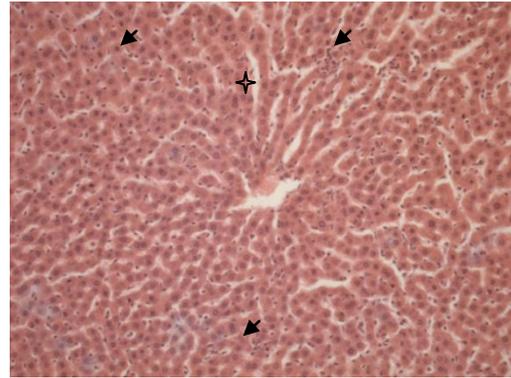
El análisis en las ratas adultas reveló un incremento de hepatocitos picnóticos a las 12 y 24 h después del tratamiento con LPS con respecto a los controles. Así mismo, se encontró un ensanchamiento en los espacios del sinusoides, los cuales además presentan infiltrado inflamatorio, hacia las 48, 72 y 96 h las arquitecturas celulares hepáticas se restablecen a su estructura basal (figura 7 a, b, c, d y e).

Además se realizó un análisis morfométrico, el cual consistió en hacer un conteo de las células en división y de las picnóticas, las cuales se caracterizan por la retracción del núcleo y condensación de la cromatina estas características pueden ser distinguidas mediante el uso de una tinción de hematoxilina y eosina. Nuestro análisis muestra que las ratas jóvenes presentaron un incremento significativo de células picnóticas a las 12 y 24 h después del tratamiento con el LPS, lo que corrobora el daño hepático observado en los marcadores enzimáticos analizados anteriormente (figura 8 a y b).

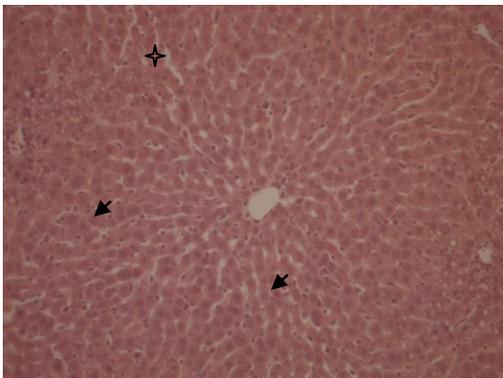
a)



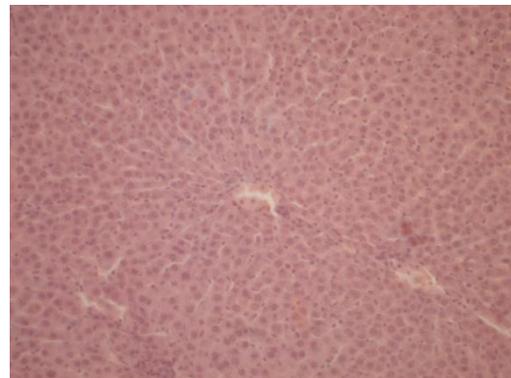
b)



c)



d)



e)

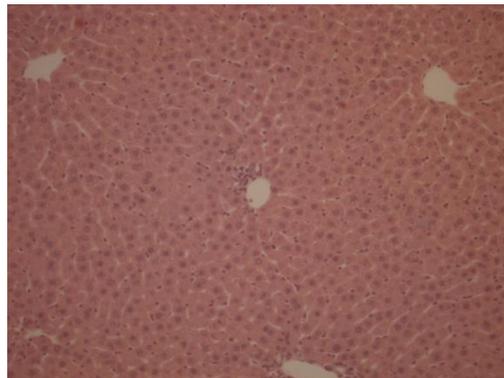
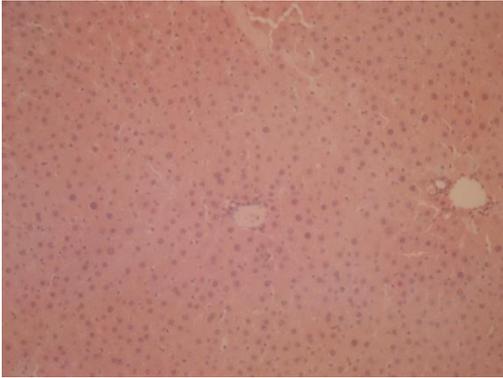
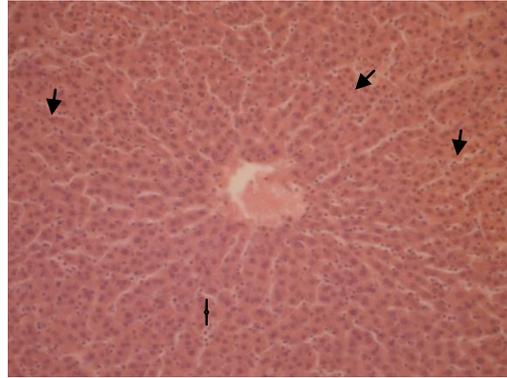


Figura 6.- (H&E) Cortes histológicos representativos de hígado de ratas jóvenes de 4 meses teñidos con hematoxilina y eosina tratados con 0.05 mg/Kg de LPS a diferentes tiempos. a) Histología hepática de ratas controles, b) 12 h, c) 24 h, d) 48 h, e) 72 h; corresponden a tejidos de hígados de ratas tratados con LPS. Aumento 200 X, n=3. Las flechas señalan infiltrado inflamatorio, la estrella señala dilatación sinusoidal.

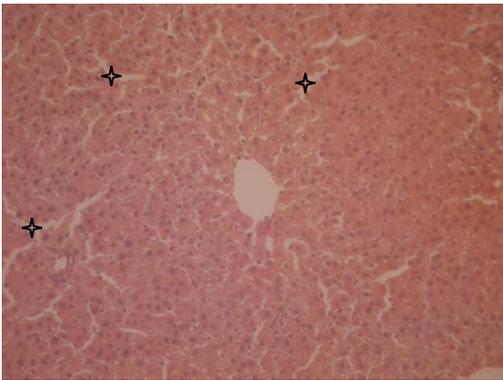
a)



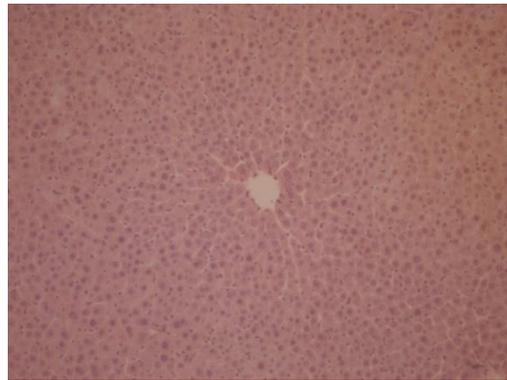
b)



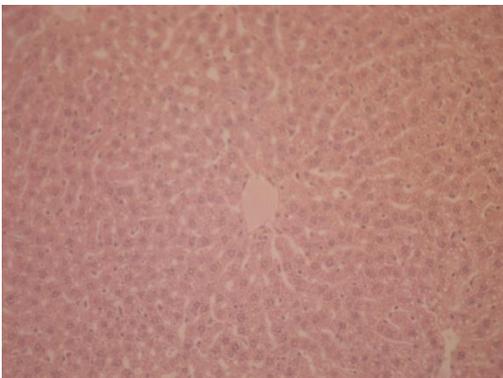
c)



d)



e)



f)

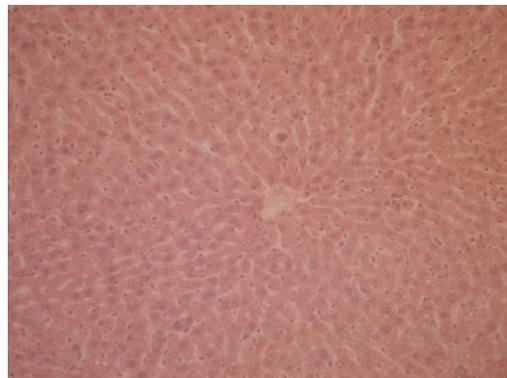
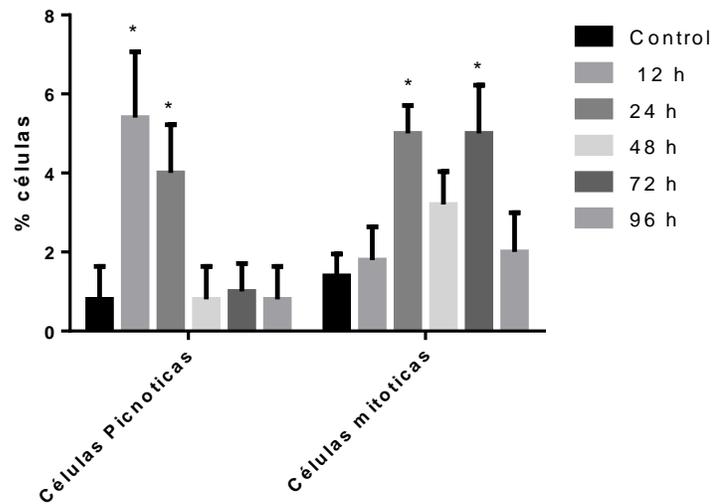


Figura 7. (H&E) Cortes histológicos representativos de hígado de ratas adultas de 12 meses teñidos con hematoxilina y eosina, tratados con 0.5 mg/Kg de LPS a diferentes tiempos. a) Histología hepática de ratas controles, b) 12 h, c) 24 h, d) 48 h, e) 72 h y f) 96 h; corresponden a tejidos de hígados de ratas tratados con LPS. Aumento 200 X, n=3. Las flechas señalan infiltrado inflamatorio, la estrella señala dilatación sinusoidal.

a) Ratas jóvenes



b) Ratas adultas

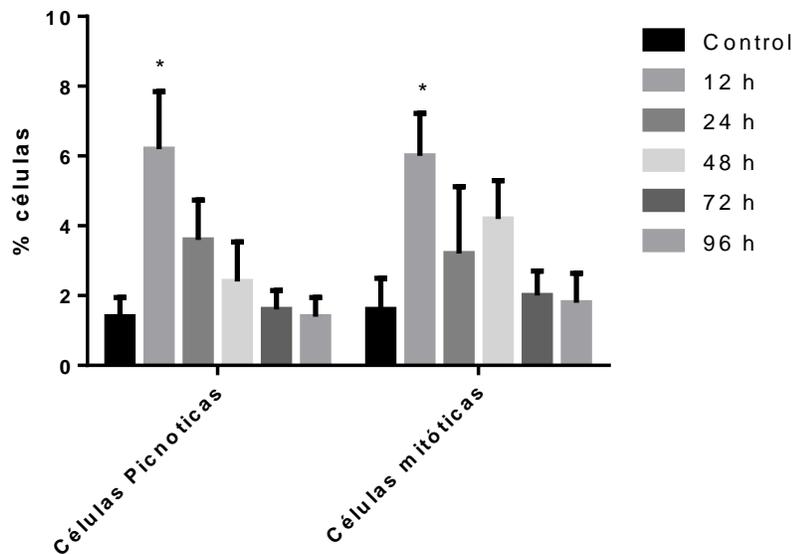


Figura 8.- Análisis morfométrico de celas hepáticas, donde se contaron las células picnoticas y células en división. a) En ratas jóvenes se observa un incremento significativo de células picnoticas a las 12 y 24 horas mientras que para las células mitóticas aumento significativamente a las 24 y 72 horas. b) en las ratas adultas el incremento en las células picnoticas solo se observo a las 12 horas y de igual forma para las células mitóticas. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar (DS) La significancia estadística con respecto al control fue marcada con * $p < 0.05$ $n = 3$

11.4 Daño oxidante al DNA

Se determinó el daño oxidante al DNA de los hígados de ratas tratadas con LPS. Se observó que en ratas jóvenes el daño se incrementó 338% de manera estadísticamente significativa a partir de las 12 h, manteniéndose de manera similar a las 24 h, sin embargo a las 48 h se observa una disminución acercándose a los valores basales llegando a ellos hasta las 72 h. Por otro lado, en las rata adultas también se observó un incremento del daño al DNA de 367% desde las primeras 12 h del tratamiento y por el contrario a los jóvenes los valores se mantienen de manera similar hasta las 72 h y son hasta las 96 h donde se observa una disminución aunque sigue siendo mayor estadísticamente significativo que el control, de manera que los adultos, tardaron más tiempo en reparar el daño o bien en eliminar a las células que se encontraban dañadas. (figura 9).

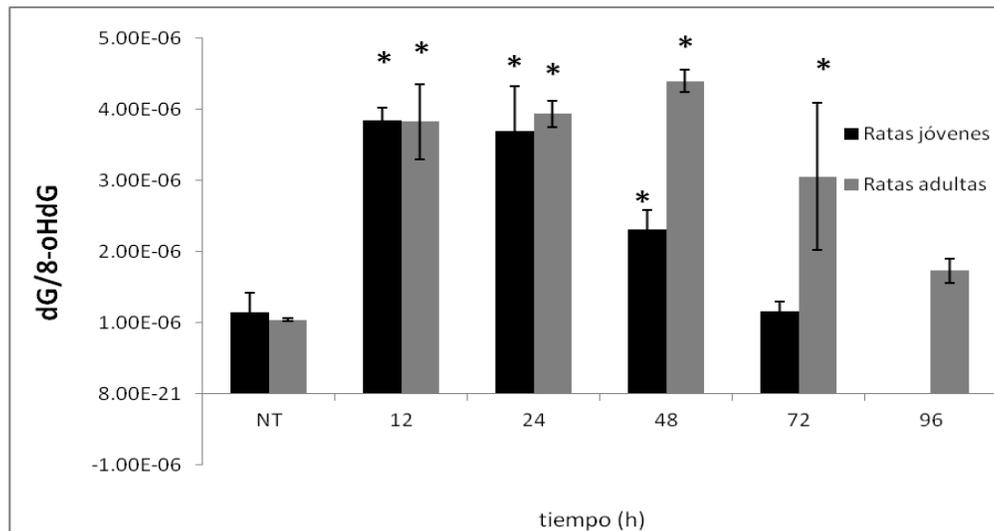


Figura 9.- Cuantificación de daño oxidante al DNA mediante el análisis del aducto 8-hidroxi desoxi-guanosina por HPLC. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar (DS). La significancia estadística con respecto al control fue marcada con * $p < 0.05$. n=3

11.5 Mecanismo de respuesta celular frente a un daño hepático

11.6 Niveles de la proteína p53

p53 es una importante proteína supresora de tumores, la cual es activada por daño al DNA generado por estrés celular como radiación ionizante, hipoxia, carcinógenos y estrés oxidante como el generado por el LPS, el cual puede causar daño integral a la célula y su genoma como se corroboró con el análisis de daño oxidante al DNA.

Para garantizar la sobrevivencia de los organismos la célula ha desarrollado numerosas estrategias para adaptarse a los estresores y de ahí parte la gran importancia de p53, debido a que está involucrada tanto en el arresto del ciclo celular, como la promoción de la reparación del DNA o inclusive inducir apoptosis. Por lo que, en los hígados de las ratas jóvenes se realizó la cuantificación de la expresión de p53 (figura 10 a) y adultas (figura 10 b) tratadas con el LPS. En las jóvenes se observó un incremento en la expresión de la proteína p53 a las 48 h, mientras que para las ratas adultas se observó un incremento a las 12 h. Claramente se ve una respuesta diferencial entre las ratas jóvenes y adultas observándose una respuesta constante de las ratas jóvenes al estímulo con el LPS, mientras que las ratas adultas son incapaces de sentir el daño oxidante a las 48 h lo que correlaciona con el incremento del daño al DNA observado en ese tiempo evaluado, y lo que sugiere una deficiencia en la respuesta al estrés inducido con el LPS.

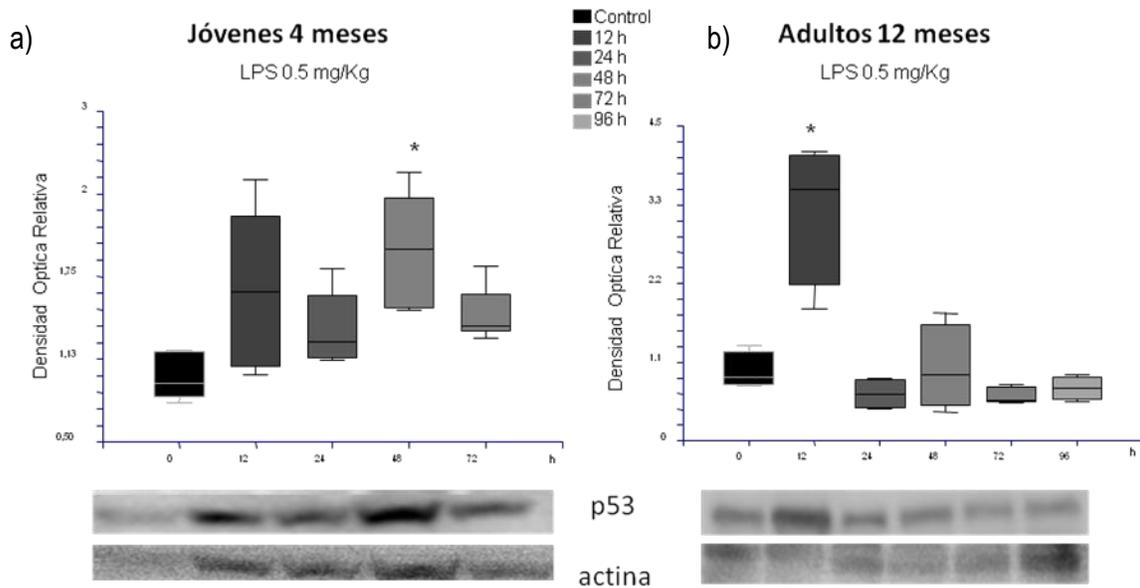


Figura 10.- Inmunodetección de la proteína p53 en ratas a) jóvenes y b) adultas tratadas con LPS 0.5 mg/Kg con dosis cada 24 horas. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar (DS) La significancia estadística con respecto al control fue marcada con * $p < 0.05$ n=3

11.7 Proteínas asociadas a la vía de la muerte celular

11.8 Niveles de proteína Caspasa-3

Se ha reportado que el mecanismo de muerte celular inducido por la exposición al LPS es la vía apoptótica. Se decidió evaluar la expresión de una caspasa ejecutora, como lo es la casp-3 que se ha reconocido como una importante molécula involucrada en la apoptosis celular. En la figura 11 se observa un incremento significativo en la expresión de la proteína casp-3 activa en las ratas jóvenes a las 12 y 24 h (figura 11 a), mientras que en las ratas adultas (figura 11 b) sólo se observó un incremento a las 12 h, lo que sugiere que a la dosis de 0.5 mg/Kg de LPS basta para generar una significativa muerte por apoptosis en células hepáticas, tanto en jóvenes como en adultos, pero siendo más

pronunciada en jóvenes. En ambos grupos de estudio se observa que a partir de las 48 h los valores regresan a los basales, de manera que se han activado mecanismos para evitar que las células sigan muriendo, como se demostró con resultados anteriores que indican la tolerancia al LPS como mecanismo de protección, el incremento de p53 como mecanismo de reparación del daño al DNA y seguramente se activa una gran cantidad de mecanismos tanto en contra como a favor para tratar de regresar a un estado más controlado.

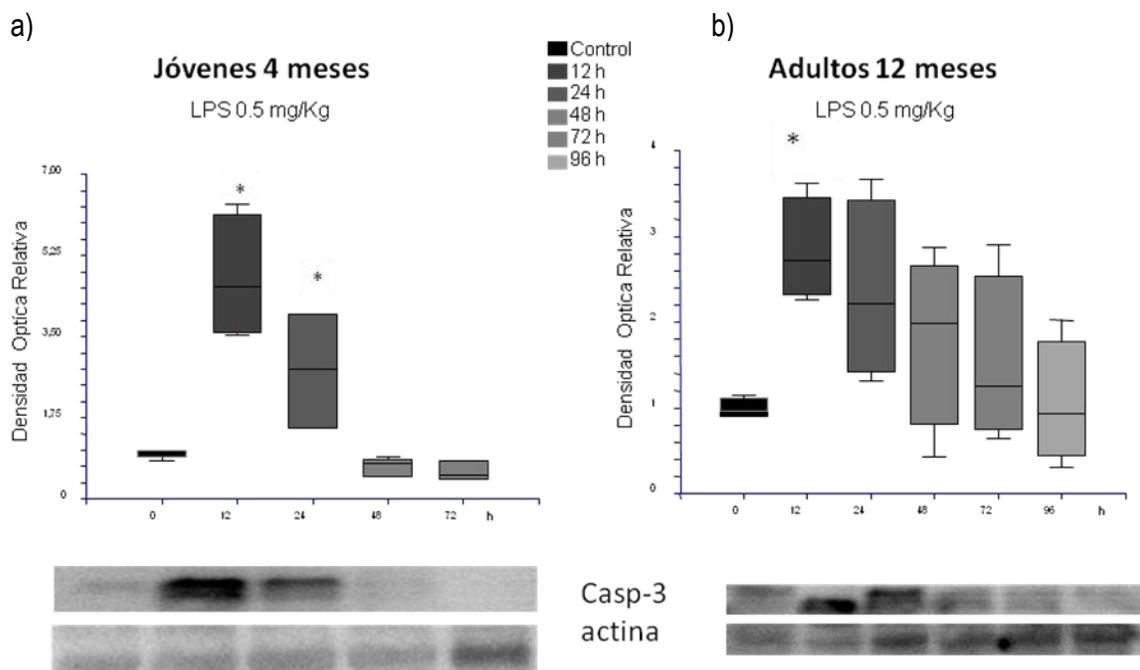
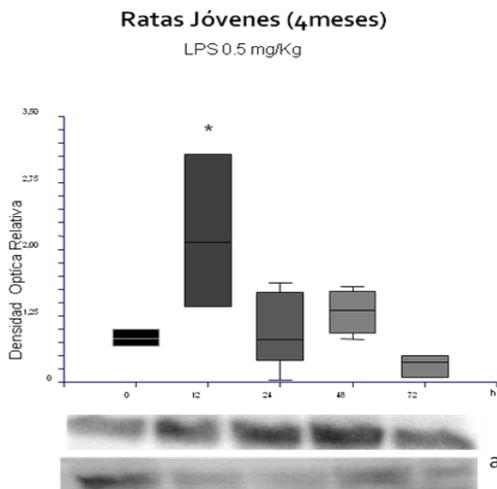


Figura 11 a) y b).- Inmunodetección de la proteína de casp-3 activa en ratas jóvenes y adultas tratadas con LPS 0.5 mg/Kg con administraciones cada 24 horas. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar (DS) La significancia estadística con respecto al control fue marcada con * $p < 0.05$ n=3

11.9 Niveles de la proteína Bax

La proteína Bax es uno de los objetivos conocidos de la transcripción río abajo de p53 que afectan directamente a la apoptosis, mediante western blot se analizó la expresión de esta proteína pro-apoptótica y en el caso de los animales adultos coincidió el aumento de p53, Bax y casp-3 activa a las 12 h por lo que la administración de LPS en ratas adultas indujo la muerte celular por apoptosis, por el incremento de p53 el cual podría estar regulando la expresión de Bax, la cual a su vez induce la apoptosis y el incremento de casp-3 (figura 12 a). En los jóvenes la expresión de Bax incremento a las 12 h lo cual correlaciona con el aumento de la casp-3. Sin embargo p53 incremento su expresión a las 48 h por lo que en este caso su contenido es independiente del aumento en la expresión de Bax, lo que sugiere que el aumento de p53 refleja un mecanismo de reparación del daño al DNA o inclusive como mecanismo para inducir la proliferación (figura 12 b).

a)



b)

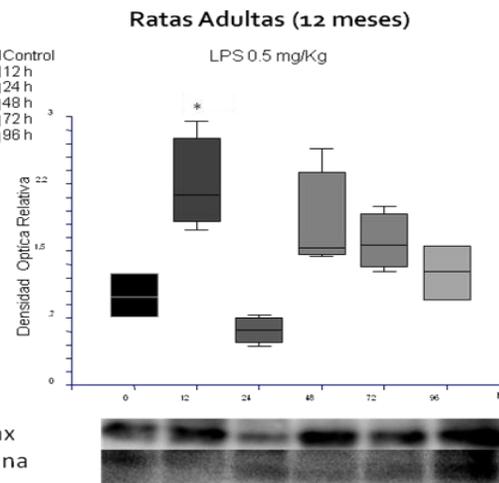


Figura 12.- Inmunodetección de la proteína Bax en ratas jóvenes y adultas tratadas con LPS 0.5 mg/Kg cada 24 horas. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar (DS). La significancia estadística con respecto al control fue marcada con * $p < 0.05$ n=3

11.10 Proteínas relacionadas con la sobrevivencia celular

11.11 Niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2

Las células que se encuentran bajo estrés activan vías de sobrevivencia celular. La señalización de muerte celular generalmente converge en la mitocondria a través de procesos que están controlados por la actividad de proteínas pro-y-anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2. La proteína anti-apoptótica Bcl-2 es un importante regulador de la apoptosis además de tener una estrecha relación con p53, ya que p53 puede inducir muerte celular. En el presente estudio se cuantificó la expresión de Bcl-2 para determinar si esta implicada como medio compensatorio al incremento de la proteína pro-apoptótica Bax y de esta manera contribuir en la sobrevivencia celular. Nuestros resultados demuestran un incremento en la expresión de la proteína Bcl-2 en ratas jóvenes a las 72 h, 24 h

después de la activación de p53, lo que sugiere que probablemente Bcl-2 se exprese en respuesta al daño como mecanismo de supervivencia y compensando la activación de p53 y los genes relacionados a la muerte celular (figura 13 a). Por otro lado en los adultos Bcl-2 incremento su expresión al mismo tiempo que incremento su expresión p53, ambas a las 12 h después del tratamiento de LPS (figura 13 b) Para las ratas jóvenes no hubo relación entre la expresión de Bax y Bcl-2. Debido a que Bcl-2 incremento significativamente su expresión a las 72 h, mientras que en Bax fue a las 12 h. Sin embargo, no se descarta que otra proteína pro-apoptótica como Bcl-XL este participando en el proceso de compensación. Por otro lado, en las ratas adultas no se observaron incrementos significativos en la expresión de Bcl-2 sin embargo tampoco se descarta la participación de alguna otra proteína anti-apoptótica (figura 13 a y b).

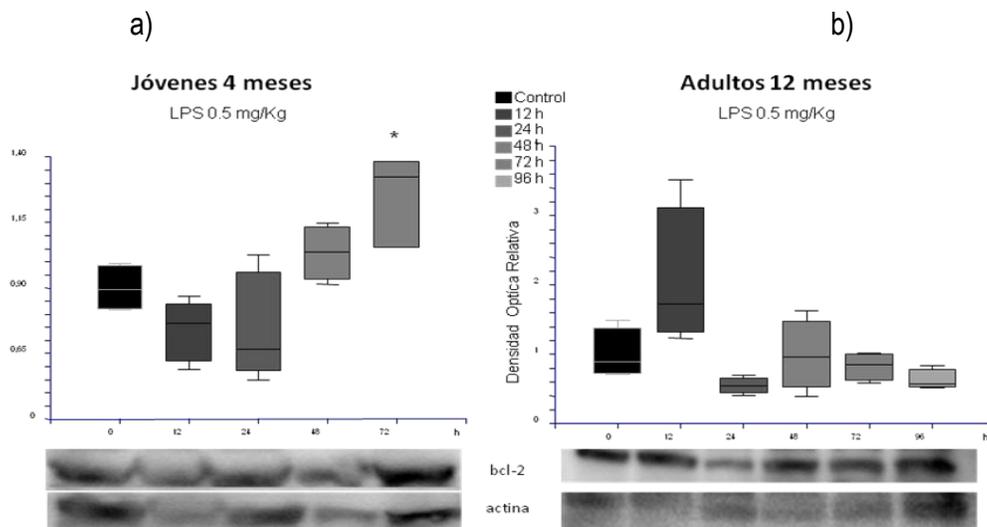


Figura 13.- Inmunodetección de la proteína Bcl-2, en ratas jóvenes y adultas tratadas con LPS 0.5 mg/Kg, con administraciones cada 24 horas. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar (DS) La significancia estadística con respecto al control fue marcada con * $p < 0.05$ n=3

11.12 Expresión del eje Dll4-Notch4

Recientemente, se ha relacionado la vía de señalización de Notch con procesos de reparación en el hígado. Por lo que, en este estudio se cuantificó la expresión tanto del ligando (Dll4) como del receptor (Notch4) en el hígado de las ratas jóvenes y adultas después del tratamiento LPS con el fin de observar si esta vía se encuentra participando en el proceso de reparación del daño inducido por el tóxico. De manera interesante nuestros resultados indican que en las ratas jóvenes tanto el ligando como el receptor Notch incrementaron sus niveles de expresión a las 24 h de haber administrado el LPS, lo que sugiere una probable participación como medio compensatorio al daño, ya que en esta hora se observó el mayor incremento en los marcadores plasmáticos de daño hepático y el incremento de la proteína ejecutora de la apoptosis (figura 14 a y b). Sin embargo, en las ratas adultas se observó que a las 12 h aumentó la expresión del receptor Notch pero el ligando disminuyó, de manera que la transducción de señal fue imposible y a las 24 y 48 h aumentó la expresión del ligando pero no el receptor (figura 15 a y b).

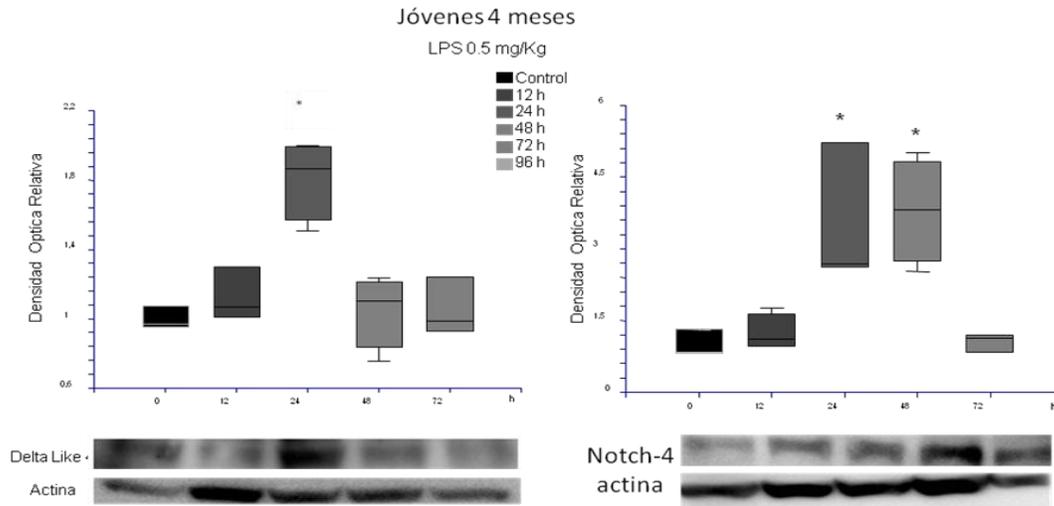


Figura 14.- Inmunodetección de las proteínas Dll4-Notch4 en ratas jóvenes tratadas con LPS 0.5 mg/Kg, con administraciones cada 24 horas. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar (DS) La significancia estadística con respecto al control fue marcada con * $p < 0.05$ n=3

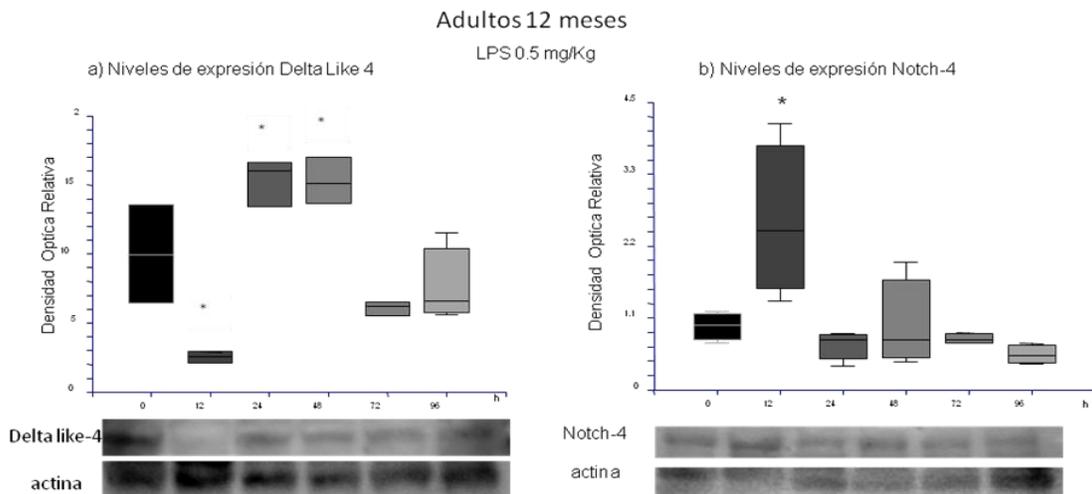


Figura 15 a) y b).- Inmunodetección de las proteínas Dll4-Notch4 en ratas jóvenes tratadas con LPS 0.5 mg/Kg, con administraciones cada 24 horas. Cada punto representa la media de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar (DS) La significancia estadística con respecto al control fue marcada con * $p < 0.05$ n=3

12. Discusión

El objetivo principal de este estudio fue investigar la capacidad de respuesta de las ratas jóvenes y adultas frente a un daño hepático inducido por la administración de LPS. El hígado juega un importante papel en la regulación de la entrada y

metabolismo del LPS y sus efectos tóxicos sistémicos se han atribuido principalmente a la liberación de mediadores químicos, tales como el radical superóxido, óxido nítrico y citocinas pro-inflamatorias, incluyendo a TNF- α , IL-1 β e IL-6, que son secretados como resultado de la unión del LPS a la proteína de unión LPS-CD14 y al receptor TLR-4.

En este estudio se corroboró que la administración de LPS generó lesiones en el hígado, mediante evaluación de los niveles séricos de ALT y AST quienes son marcadores de daño de los hepatocitos. Las enzimas marcadoras de la funcionalidad hepática son de naturaleza citosólica, cuando entran en la circulación sanguínea se relaciona con un daño en el hígado, debido a una alteración en la permeabilidad de la membrana celular. Esta observación está de acuerdo con varios informes anteriores que han demostrado que el LPS induce daño hepático y como consecuencia, un aumento en el nivel de la actividad en las aminotransferasas séricas (Sebai et al., 2010).

Nuestros resultados demostraron que la administración consecutiva cada 24 h de una dosis de 0.5 mg/Kg produjo un incremento en los niveles séricos de las actividades de ALT y AST. En las ratas jóvenes, la actividad de ambas aminotransferasas se incrementaron a las 12 h de exposición al LPS. Mientras que en las ratas adultas solo la actividad de AST incremento significativamente.

El análisis del índice de DeRitis permitió establecer la magnitud del daño generado a consecuencia del LPS, evidencio un daño más severo en las ratas adultas que

en las jóvenes. Lo que sugiere que las ratas jóvenes están mejor preparadas para responder a un insulto inflamatorio que las ratas adultas.

Otra observación relevante al analizar los marcadores plasmáticos de daño hepático fue que a pesar de las repetidas dosis de LPS que se les administró a las ratas en ambos grupos activan mecanismos de respuesta compensatoria para contrarrestar el estrés inducido por la administración del LPS (figura 4 a y b). Por otro lado, el glicolípido del LPS que se encuentra en la membrana de las bacterias gram-negativas, es uno de los más potentes estimuladores de la respuesta inmune innata. El sistema inmunológico detecta y responde al LPS a través de TLR-4 activando diversos factores de transcripción que conducen a una sobre producción de citocinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α e IL-6, quienes están dirigidos principalmente para controlar el crecimiento y erradicación de los micro-invasores, y posteriormente, limitando la respuesta inmune necesaria (Liew et al., 2005).

Sin embargo, la desregulación de los componentes de la señalización o factores de transcripción está fuertemente vinculados a una respuesta inflamatoria excesiva y puede causar daños en los tejidos, enfermedades autoinmunes y posiblemente cáncer (Shishshodia y Aggarwal, 2002). Por lo que la producción de citocinas necesita estar regulada fuertemente en un sistema inmunológico equilibrado. La sobre-regulación y producción de citocinas durante una endotoxemia inducida por LPS es bien conocida y se ha demostrado que el aumento en los niveles de citocinas pro-inflamatorias y en el número de neutrófilos

en el hígado, se asocian con daños en las células de tal órgano (Hsieh et al., 2008).

En este modelo de estudio se observó una sobre producción de citocinas pro-inflamatorias séricas (IL-6 y TNF- α) en ambos grupos a las 12 h de administración del LPS. Sin embargo cabe resaltar que a pesar de las dosis consecutivas de LPS cada 24 h, no se observó otro incremento en las citocinas pro-inflamatorias lo que sugiere fuertemente un mecanismo de tolerancia inmunológica hacia el LPS, característica que se hizo presente en ambos grupos de estudio.

Se han descrito diversos mecanismos involucrados en la tolerancia al LPS, un mecanismo potencial para la tolerancia al LPS es la regulación a la baja de moléculas receptoras de la superficie celular en las células activadas. Debido a que TLR4 es principal receptor para el LPS, la regulación de la expresión a la baja de TLR4 en la superficie celular se ha propuesto como un posible mecanismo de tolerancia hacia el LPS, sin embargo no se descarta que proteínas río debajo de la señalización de TLR4 estén involucradas en dicho proceso (Fan y Cook, 2004).

Para determinar el daño hepático y el tiempo de reparación a nivel tisular posteriores al tratamiento con el LPS, se realizó un análisis de los cambios histológicos en el tejido hepático, donde se observó que en los cortes histológicos en el hígado donde se observó en las muestras de las ratas jóvenes a las 12 h mostraron un infiltrado inflamatorio presente, ya que el sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra organismos invasores y la supervivencia celular depende de la capacidad de reconocer e inducir las señales de defensa

apropiadas para la eliminación de microbios infecciosos, a través de diversos mecanismos, como barreras anatómicas, factores solubles antimicrobianos y componentes celulares o células inmunes innatas las cuales en el hígado están comprendidas por monocitos, macrófagos, neutrófilos y células asesinas naturales (NK) las cuales son capaces de reconocer patógenos asociados a patrones moleculares tales como los componentes del LPS, de manera que la administración inicial de LPS, activo la respuesta inmune innata en ambos modelos, además del incremento de citocinas pro-inflamatorias las cuales colaboran en el reclutamiento de mas células inmunes, hacia las 24 h en ambos grupos se sigue presenciando infiltrado inflamatorio pero en menor magnitud, de manera que a las 48 h se ha resultado el proceso inflamatorio. Sin embargo la administración causo daño en células del parénquima hepático ya que nuestros resultados correspondientes al análisis morfométrico señalan para ratas jóvenes un incremento de células picnoticas a las 12 y 24 h de 6.7 y 5 veces respectivamente respecto al control, mientras que para las ratas adultas solo se observo dicho incremento de 4.4 veces respecto al control a las 12 h. Para compensar la pérdida de los hepatocitos se activa una serie de mecanismos para compensar el parénquima hepático perdido, generando así que los hepatocitos restantes se dividan y así restaurar el tejido hepático como se observa en el conteo morfométrico de los hepatocitos en división así que para jóvenes se observo un incremento en los hepatocitos en división de 3.5 veces a las 24 y 72 h respecto a su control, mientras que los adultos solo se observo a las 12 h, lo que

resulta que las ratas jóvenes necesitan más tiempo para compensar el parénquima hepático perdido que los adultos (figura 8).

La endotoxemia por LPS generalmente es acompañada por estrés oxidante hepático el cual puede ser extra o intracelular. El componente intracelular es el resultado de mitocondrias o sistemas de enzimas microsomales disfuncionales o alteraciones del metabolismo de hierro y vitaminas. El componente de estrés oxidante extracelular se representa en las células del parénquima a partir de fuentes sinusoidales. Las células de Kupffer producen y liberan grandes cantidades del anión súper oxido, peróxido de hidrogeno, oxido nítrico y sus derivados que se dirigen a tejidos circundantes. La proliferación de las células de Kupffer, el reclutamiento de monocitos o la acumulación de células PIT también pueden contribuir a un estado pro-oxidante en el medio, el desequilibrio redox producido puede resultar en el agotamiento de los antioxidantes endógenos tales como las enzimas antioxidantes y alteración del estado redox de GSH (Bharrhan, et al., 2010). Lo cual puede generar daño a la integridad celular y del DNA. Los resultados de este trabajo demuestran que la administración de LPS produjo un incremento significativo en el nivel de daño al DNA haciéndose presente desde las 12 h para ambos grupos de edad y se restableció a las 48 h en las ratas jóvenes. Mientras que para las ratas adultas el daño oxidante al DNA se mantuvo constante hasta las 72 h (figura 9), generando la siguiente pregunta ¿Tienen las ratas jóvenes un sistema de reparación de DNA más eficaz que las ratas adultas? o ¿Es quizá que las células dañadas en jóvenes fueron remplazadas rápidamente mientras que en las adultas dicho mecanismo es mas tardado?

Para tratar de responder a esa pregunta se determinaron los niveles de expresión de la proteína casp-3 en su forma activa, la cual es considerada como el evento terminal anterior a la muerte celular. Nuestros resultados revelaron que la administración de 0.5 mg/Kg de LPS en ratas jóvenes incrementó la expresión de la proteína ejecutora de la apoptosis (casp-3) a las 24 y 48 h después de la administración de LPS (figura 11 a), resultado que se corrobora con el incremento en los marcadores plasmáticos de daño hepático, incremento del daño oxidante al DNA y el análisis morfométrico. De manera interesante en las ratas adultas solo se observó un incremento de casp-3 a las 24 h (figura 11 b). Lo que sugiere que en las ratas adultas la dosis de 0.5 mg/Kg la muerte por apoptosis no fue tan dramática como en las ratas jóvenes hecho que sugiere el por qué en las ratas viejas se acumulo el daño oxidante al DNA por más tiempo a diferencia de las ratas jóvenes.

Para garantizar la sobrevivencia de los organismos la célula ha desarrollado numerosas estrategias para adaptarse a los estresores y de ahí parte la gran importancia de p53, debido a que está involucrado tanto en el arresto del ciclo celular como promover la reparación del DNA o inclusive inducir apoptosis. En ambos grupos de estudio se observó tanto el incremento en el daño oxidante al DNA como el incremento en la muerte por apoptosis. Por lo que se cuantificó la expresión de la proteína p53 para intentar interpretar su función en este mecanismo de respuesta en organismos jóvenes y adultos ante un daño. Como se demostró anteriormente las ratas jóvenes presentaron daño oxidante al DNA e incremento de casp-3 mientras que la expresión de p53 se incrementó hasta las

48 h, lo que sugiere que p53 podría estar jugando un papel importante en la reparación del DNA. Por otro lado en las ratas adultas el incremento en la expresión de p53 se observó a las 12 h una respuesta muy temprana en comparación a las ratas jóvenes, señalando su posible participación en el mecanismo de apoptosis.

La proteína Bax es uno de los objetivos conocidos de la transcripción río abajo de p53, de modo que la expresión de Bax puede ayudar a esclarecer la participación de p53. En los resultados obtenidos de la cuantificación de la expresión de Bax en ratas jóvenes tratadas con LPS se observa un incremento en la expresión de Bax a las 12 h después del tratamiento con LPS. Sin embargo no es resultado de un incremento en la expresión de p53, debido a que este se activo hasta las 48 h, pero resulta interesante que el aumento en la expresión de Bax, siendo que es una proteína apoptótica coincide con el incremento de la proteína inductora de la apoptosis casp-3.

Ahora bien se cuantificó la expresión de una proteína anti-apoptótica, esperando que estuviera incrementada para tratar de compensar el incremento en Bax. Sin embargo, la proteína Bcl-2 que fue la que se cuantificó sólo se observó un incremento significativo a las 72 h, por lo que seguramente exista otra proteína anti-apoptótica cumpliendo con esta función. En las ratas adultas los resultados de la cuantificación de la expresión de Bax si coinciden con un incremento en la expresión de p53. Lo cual nos sugiere que p53 tiene una participación en el proceso de muerte celular por apoptosis ya que a las 12 h incremento la expresión

de p53, la proteína pro-apoptótica Bax y la proteína ejecutora de la apoptosis casp-3. Los resultados en la expresión de Bcl-2 no se observaron incrementos significativos aun que no se descarta la participación de alguna otra proteína anti-apoptótica (figura 13 a y b).

Recientes avances han demostrado un papel importante de la vía de señalización de Notch en la regeneración y reparación, como por ejemplo en el metabolismo y la inflamación del hígado e inclusive el cáncer. La señalización de Notch está finamente regulado en distintos niveles.

La activación de la señalización de Notch requiere contacto directo entre las células que expresan el ligando de Notch y las células que expresan el receptor de Notch, a menudo tanto las células que llevan a cabo la transmisión como la recepción se modifican por su interacción. Inicialmente las células pueden expresar tanto el receptor Notch como el ligando, pero si la interacción continua, una célula sobre expresa al ligando y disminuye la del receptor, transformándose en una célula transmisora. Mientras que lo contrario sucede en la célula que recibe la señal (Morell y Strazzabosco, 2014). En este estudio se cuantificaron los niveles de expresión tanto del receptor Nocth4 como de su ligando Dll4 para ver su participación como medio compensatorio al daño inducido por el LPS. Nuestros resultados han demostrado una activación del eje Dll4-Notch4 en las ratas jóvenes, debido a que se observo el incremento en la expresión tanto del receptor Notch4 como de su ligando Dll4 a las 24 h, lo que sugiere fuertemente una participación de esta vía de señalización, se ha sugerido que Notch puede regular

negativamente a p53 a través de la expresión de HES1, el cual es un regulador negativo de PTEN, la disminución en la actividad de PTEN, resulta en la activación de la vía de señalización PI3K-AKT la cual conduce a la fosforilación de MDM2 y culmina en la eliminación de p53 (Ranganathan, et al., 2011), mecanismo por el cual Notch podría estar regulando el proceso de apoptosis, ya que en las ratas jóvenes no se observa el incremento de p53 a las 24 h, a pesar de que el daño al DNA esta incrementado, para los tiempos restantes no se observo una activación pero si se observo el incremento de p53. Por otro lado en las ratas adultas no se observo activación de la vía Dll4-Notch4 lo cual nos podría estar sugiriendo que en las ratas adultas no se activa esta vía en estas condiciones o tal vez el daño fue tan severo que murieron las células (figuras 14 y 15).

Sin duda el hígado de ratas jóvenes responde de forma diferencial al hígado de ratas adultas frente a un reto pro-inflamatorio generado con LPS, bajo la misma dosis en ambos grupos de estudio se observo muerte celular por apoptosis donde fue más persistente el efecto en las ratas jóvenes, además de necesitar de dos eventos de proliferación celular para compensar la pérdida de parénquima hepático mientras que para las ratas adultas solo fue necesario un evento de proliferación (figura 8). Las ratas adultas parecen tener una mejor capacidad de censar el daño ya que sobre-expresaron p53 con mayor rapidez que las ratas jóvenes o fue un efecto regulador de la vía Dll4-Notch4 sobre p53. Con los resultados obtenidos se puede determinar la participación de la vía Dll4-Notch4 como un evento que se encuentra presente como respuesta a el daño hepático generado por el LPS, sin embargo se han generado más preguntas en torno a la

profundidad de la participación con otros mecanismos de sobrevivencia celular de Dll4-Notch4.

13. Conclusión

- ✓ La misma concentración de LPS induce una mayor respuesta inflamatoria en ratas adultas que en los jóvenes, y en ambos casos se observa un efecto de tolerancia hacia el LPS.
- ✓ Los adultos son más susceptibles al daño a la misma concentración de LPS.
- ✓ Las ratas adultas son menos eficaces que las ratas jóvenes para reparar el daño oxidativo, y esto puede ser debido a la activación de la vía de señalización de Notch.
- ✓ La muerte celular por LPS se genera principalmente por apoptosis.

14. Perspectivas

Sería sumamente interesante observar la capacidad de respuesta ante un daño en ratas viejas de 24 meses de edad y determinar la vía transduccional de Dll4-Notch4 y su relación e interacción con otras vías de señalización, así como también estudiar la participación de otros marcadores de sobrevivencia, proliferación, muerte celular para determinar con exactitud las diferencias de los mecanismos de respuestas en las ratas a diferentes edades.

15.Referencias

- ARTAVANIS-TSAKONAS, S., MATSUNO, K. & FORTINI, M. E. 1995. Notch signaling. *Science*, Apr 14;2685208: 225-32.
- BENEDITO, R., TRINDADE, A., HIRASHIMA, M., HENRIQUE, D., DA COSTA, L. L., ROSSANT, J., GILL, P. S. & DUARTE, A. 2008. Loss of Notch signalling induced by Dll4 causes arterial calibre reduction by increasing endothelial cell response to angiogenic stimuli. *BMC Dev Biol*, 16; 8, 117.
- BUCHER, N. L., SWAFFIELD, M. N. & DITROIA, J. F. 1964. The influence of age upon the incorporation of thymidine-2-c14 into the dna of regenerating rat liver. *Cancer Res*, 24, 509-12.
- BRADFORD M.1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-254.
- BRANDTZAEG P. 1996. Significance and pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol*; 216: 16-37.
- BRENNER C, GALLUZZI L, KEPP O, KROEMER G. 2013. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol*. Sep; 59(3):583-94. doi: 10.1016/j.jhep.2013.03.033.

- CANKURTARAN, M., HALIL, M., YAVUZ, B. B., DAGLI, N., OYAN, B. & ARIOGUL, S. 2006. Prevalence and correlates of metabolic syndrome (MS) in older adults. *Arch Gerontol Geriatr*, 42, 35-45.
- CHELUVAPPA, R., HILMER, S. N., KWUN, S. Y., JAMIESON, H. A., O'REILLY, J. N., MULLER, M., COGGER, V. C. & LE COUTEUR, D. G. 2007. The effect of old age on liver oxygenation and the hepatic expression of VEGF and VEGFR2. *Exp Gerontol*, 42, 1012-9.
- CONBOY, I. M., CONBOY, M. J., WAGERS, A. J., GIRMA, E. R., WEISSMAN, I. L. & RANDO, T. A. 2005. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*, 433, 760-4.
- CONBOY, I. M. & RANDO, T. A. 2005. Aging, stem cells and tissue regeneration: lessons from muscle. *Cell Cycle*, 4, 407-10.
- CUADRADO, A., ORIVE, A., GARCIA-SUAREZ, C., DOMINGUEZ, A., FERNANDEZ-ESCALANTE, J. C., CRESPO, J. & PONS-ROMERO, F. 2005. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatocellular carcinoma. *Obes Surg*, 15, 442-6.
- DIDONATO, J.A., MERCURIO, F. & KARIN M. 2012. NF-kappaB and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev*; 246:379–400.

- DE RITIS F, COLTORTI M, GIUSTI G. 2006. An enzymic test for the diagnosis of viral hepatitis: the transaminase serum activities. 1957. Clin Chim Acta. Jul 23;369(2):148-52
- D'SOUZA, B., MELOTY-KAPELLA, L. & WEINMASTER, G. 2010. Canonical and non-canonical Notch ligands. Curr Top Dev Biol, 92, 73-129.
- FABRIS L, CADAMURO M, GUIDO M, SPIRLI C, FIOROTTO R, COLLEDAN M. 2007. Analysis of liver repair mechanisms in Alagille syndrome and biliary atresia reveals a role for notch signaling. Am J Pathol. 171, 641–53.
- FAN H y COOK JA. 2004. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. J Endotoxin Res.;10 (2):71-84.
- FAUSTO, N., CAMPBELL, J. S. & RIEHLE, K. J. 2006. Liver regeneration. Hepatology, 43, S45-53.
- FEARNIS C, KRAVCHENKO VV, ULEVITCH RJ. 1995. Murine CD14 gene expression *in vivo*: extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharides. J Exp Med; 181: 857–866
- FOX ES, THOMAS P, BROITMANS A. 1989. Clearance of gut-derived endotoxins by the liver. Release and modifications of 3H,14C-lipopolysaccharide by isolated Kupffer cells. Gastroenterology; 96: 456–461
- FRY, M., SILBER, J., LOEB, L. A. & MARTIN, G. M. 1984. Delayed and reduced cell replication and diminishing levels of DNA polymerase-alpha in regenerating liver of aging mice. J Cell Physiol, 118, 225-32.

- GALLUZZI L, BRENNER C, MORSELLI E, TOUAT Z, KROEMER G. 2008. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog.* 30;4 (5):e1000018. doi: 10.1371/journal.ppat.1000018.
- GARCIA-PRAT, L., SOUSA-VICTOR, P. & MUNOZ-CANOVES, P. 2013. Functional dysregulation of stem cells during aging: a focus on skeletal muscle stem cells. *FEBS J.* 4051-62. doi: 10.1111/febs.12221.
- GONZALEZ-CHAMORRO, A., LOINAZ SEGUROLA, C., MORENO GONZALEZ, E., JIMENEZ ROMERO, C., GONZALEZ-PINTO ARRILLAGA, I., GOMEZ SANZ, R., GARCIA GARCIA, I., MANZANERA DIAZ, M. & ALONSO CASADO, O. 1998. Graft mass and volume calculation in living related donors for liver transplantation. *Hepatogastroenterology*, 45, 510-3.
- GONZALE-PUERTOS V. 2011. Estudio de la respuesta hepática ante un daño causado por estrés oxidante en células estelares y en hígado de ratones de diferentes edades.
- GONZLAEZ-CHAMARRO A, LOINNAZ SC, MORENO GE, JIMENEZ RC, GONZALEZ-PINTO A, GONZALEZ SR. 1998. Graft mass and volumen calcutation in living related donors for liver transplantation. *Hepato-Gastroenerol* .45, 510-513.
- GUPTA, S., AGRAWAL, S. & GOLLAPUDI, S. 2013. Increased activation and cytokine secretion in B cells stimulated with leptin in aged humans. *Immun Ageing.* Jan 23; 10(1):3. doi: 10.1186/1742-4933-10-3.

- HAN D, YBANEZ MD, AHMADI S, YEH K, KAPLOWITZ N. 2009. Redox regulation of tumor necrosis factor signaling. *Antioxid Redox Signal*;11: 2245–2263.
- HEITZLER, P. 2010. Biodiversity and noncanonical Notch signaling. *Curr Top Dev Biol*, 92, 457-81.
- HEUMANN D, GLAUSER MP, CALANDRA T. 1998. Molecular basis of host pathogen interaction in septic shock. *Curr Opin Microbiol.* 1: 49-55.
- HSIEH CH, FRINK M, HSIEH YC, KAN WH, HSU JT, SCHWACHA MG, CHOUDHRY MA, CHAUDRY IH. 2008. The role of MIP-1 α in the development of systemic inflammatory response and organ injury following trauma hemorrhage. *J Immunol.* 181(4):2806–2812.
- ISO T., KEDES L., HAMAMORI Y. 2003. HES and HERP families: Multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J. Cell Physiol.*, 194, 237–255.
- JIRILLO E, CACCAVO D, MAGRONE T, PICCIGALLO E, AMATI L, LEMBO A, KALIS C, GUMENSCHHEIMER M. 2002. The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *J Endotoxin Res.* 8(5):319-27.
- KAGAN,J.C.,ANDMEDZHITOV,R. 2006. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-likereceptorsignaling. *Cell* 125, 943–955.
- KAWAI T.,ANDAKIRA,S. 2011.Toll- like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection andimmunity. *Immunity* 34, 637–650.

- KUBES P, MEHAL WZ. 2012. Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology*. 143:1158–1172.
- KUNTZ ERWIN Y KUNTZ HANS-DIETER. 2006. *Hepatology: principles and practice*. Germany. Springer. 919 p. ISBN-13 978-3-540-28976-0
- KNIREL YA, ANISIMOV AP. 2012. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the Cause of Plague: Structure, Genetics, Biological Properties. *Acta Naturae*. Jul;4 (3):46-58
- LAKOVA, P., AWAD, S. S. & TIMCHENKO, N. A. 2003. Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest. *Cell*, 113, 495-506.
- LE COUTEUR, D. G., COGGER, V. C., MARKUS, A. M., HARVEY, P. J., YIN, Z. L., ANSSELIN, A. D. & MCLEAN, A. J. 2001. Pseudocapillarization and associated energy limitation in the aged rat liver. *Hepatology*, 33, 537-43.
- LEPPERDINGER, G. 2011. Inflammation and mesenchymal stem cell aging. *Curr Opin Immunol*, 23, 518-24.
- LIEDTKE C, TRAUTWEIN C. 2012. The role of TNF and Fas dependent signaling in animal models of inflammatory liver injury and liver cancer. *Eur J Cell Biol*;91: 582–589.
- Liaskou E, Wilson DV, Oo YH. 2012. Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators Inflamm*.949157. doi: 10.1155/2012/949157.

- Liew FY, Patel M, Xu D. 2005. Toll-like receptor 2 signalling and inflammation. *Ann Rheum Dis.* Nov;64 Suppl 4:iv104-5
- LU Y, YEH C. AND OHASHI P.S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151.
- MAESHIMA N, FERNANDEZ RC. 2013. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell Infect Microbiol.* Feb 12;3:3. doi: 10.3389/fcimb.2013.00003.
- MCLEAN, A. J. & LE COUTEUR, D. G. 2004. Aging biology and geriatric clinical pharmacology. *Pharmacol Rev*, 56, 163-84.
- MINEMURA M, TAJIRI K, SHIMIZU Y. 2014. Liver involvement in systemic infection. *World J Hepatol.* Sep 27.6(9):632-42. doi: 10.4254/wjh.v6.i9.632.
- MORELL CM, FIOROTTO R, FABRIS L, STRAZZABOSCO M. 2013 .Notch signalling beyond liver development: emerging concepts in liver repair and oncogenesis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* Nov;37(5):447-54. doi: 10.1016/j.clinre.2013.05.00.
- MORELL CM, STRAZZABOSCO M. 2014. Notch signaling and new therapeutic options in liver disease. *J Hepatol.* Apr;60(4):885-90. doi: 10.1016/j.jhep.2013.11.028.
- MURPHY, K. M. 2009. INMUNOBIOLOGIA DE JANEWAY: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V. 913 p.p.
- NAKAJIMA, T., NAKASHIMA, T., YAMAOKA, J., SHIBUYA, A., KONISHI, E., OKADA, Y., JO, M., NISHIKAWA, T., ITOH, Y. & YOSHIKAWA, T. 2011.

Greater age and hepatocellular aging are independent risk factors for hepatocellular carcinoma arising from non-B non-C non-alcoholic chronic liver disease. *Pathol Int*, 61, 572-6.

- NIJJAR SS, CROSBY HA, WALLACE L, HUBSCHER SG, STRAIN AJ. 2001. Notch receptor expression in adult human liver: a possible role in bile duct formation and hepatic neovascularization. *Hepatology*;34: 1184–1192.
- NOSEDA, M., CHANG, L., MCLEAN, G., GRIM, J. E., CLURMAN, B. E., SMITH, L. L. & KARSAN, A. 2004. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol*, 24, 8813-22.
- PAPA, S., BUBICI, C., ZAZZERONI, F. & FRANZOSO, G. 2009. Mechanisms of liver disease: cross-talk between the NF-kappaB and JNK pathways. *Biol Chem*, 390, 965-76.
- PARRILLO JE. 1993. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med*. May 20;328(20):1471-7
- PFEFFER K, MATSUYAMA T, KUNDIG TM, WAKEHAM A, KISHIHARA K, SHAHINIAN A. 1993. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*;73:457–467
- PROPHET E. 1995. Instituto de Patología de los Estados Unidos de América (AFIP). Métodos Histotecnológicos. Publicado por: Registro de

patología de los Estados Unidos de América. Washington D.C. ARP. p. 55-60.

- QUILLARD, T., COUPEL, S., COULON, F., FITAU, J., CHATELAIS, M., CUTURI, M. C., CHIFFOLEAU, E. & CHARREAU, B. 2008. Impaired Notch4 activity elicits endothelial cell activation and apoptosis: implication for transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 2258-65.
- QUILLARD, T. & CHARREAU, B. 2013. Impact of notch signaling on inflammatory responses in cardiovascular disorders. *Int J Mol Sci*, 14, 6863-88.
- RANDO, T. A. 2006. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature*, 441, 1080-6.
- RANGANATHAN P, WEAVER KL, CAPOBIANCO AJ. 2011. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer*. May;11 (5):338-51. doi: 10.1038/nrc3035.
- SCHATTEBERG JM, GALLE PR, SCHUCHMANN M. 2006. Apoptosis in liver disease. *Liver. Int*; 26:904–911.
- SCHLETTER J, HEINE H, ULMER AJ, RIETSCHER ET. 1995. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol*. Dec;164(6):383-9.
- SCHULZE-OSTHOFF K, BANTEL H. 2011. Necrosis versus apoptosis in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology*;53:1070.

- SEBAI H, SANI M, YACOUBI MT, AOUANI E, GHANEM-BOUGHANMI N, BEN-ATTIA M. 2010. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat liver. *Ecotoxicol Environ Saf.* 73:1078–1083.
- SELZNER, M., SELZNER, N., JOCHUM, W., GRAF, R. & CLAVIEN, P. A. 2007. Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATP-dependent mechanism. *Liver Transpl*, 13, 382-90.
- SHARMA SD. 2013. Hepatitis C virus 1b viral factors (Core NS3 and NS5A) and increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 38(2):491–3.
- SIMPSON, K. J., LUKACS, N. W., COLLETTI, L., STRIETER, R. M. & KUNKEL, S. L. 1997. Cytokines and the liver. *J Hepatol*, 27, 1120-32.
- STARR ME, HU Y, STROMBERG AJ, CARMICAL JR, WOOD TG, EVERS BM, SAITO H. 2013. Gene expression profile of mouse white adipose tissue during inflammatory stress: age-dependent upregulation of major procoagulant factors. *Aging Cell.* Apr;12(2):194-206. doi: 10.1111/accel.12040.
- STOCKER, E. & HEINE, W. D. 1971. Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. *Beitr Pathol*, 144, 400-8.
- SZABO, G. & CSAK, T. 2012. Inflammasomes in liver diseases. *J Hepatol*, 57, 642-54.

- TACKE, F., LUEDDE, T. & TRAUTWEIN, C. 2009. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol*, 36, 4-12.
- TAKEUCHI O., & AKIRA S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- TAUB R. 2004. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Oct;5(10):836-47.
- TIMCHENKO, N. A. 2009. Aging and liver regeneration. *Trends Endocrinol Metab*, 20, 171-6.
- TIMCHENKO, N. A., WILDE, M., KOSAI, K. I., HEYDARI, A., BILYEU, T. A., FINEGOLD, M. J., MOHAMEDALI, K., RICHARDSON, A. & DARLINGTON, G. J. 1998. Regenerating livers of old rats contain high levels of C/EBPalpha that correlate with altered expression of cell cycle associated proteins. *Nucleic Acids Res*, 26, 3293-9.
- WANG T, QIN L, LIU B, LIU Y, WILSON B, ELING TE, LANGENBACH R, TANIURA S, HONG JS. 2004. Role of reactive oxygen species in LPS-induced production of prostaglandin E2 in microglia. *J Neurochem*. Feb;88(4):939-47.
- WANG L, HIRAYASU K, ISHIZAWA M, KOBAYASHI Y. 1994. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nuc Acid Res*. 11: 1774-1775.

- WEINMASTER, G. 1997. The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci*, 9, 91-102.
- YOUNOSSI ZM, ZHENG L, STEPANOVA M, VENKATESAN C, MIR HM. 2013. Moderate, excessive or heavy alcohol consumption: each is significantly associated with increased mortality in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol*. 37(7):703–9.
- ZHANG, L., THEISE, N., CHUA, M., & REID, L. M. 2008. The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology*, 48, 1598–1607.