

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA ESPLÁCNICA EN
LA COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA EXPERIMENTAL CON
KETOTIFÉN

TESIS DOCTORAL DE:
ARTURO CRUZ CIDONCHA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:
JAIME ARIAS PÉREZ
M^a ÁNGELES ALLER REYERO
CRUZ GARCÍA MARTÍN

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGIA



**MODULACIÓN DE LA RESPUESTA
INFLAMATORIA ESPLÁCNICA EN LA
COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA
EXPERIMENTAL CON KETOTIFÉN**

Memoria para optar al Grado de Doctor
presentada por

ARTURO CRUZ CIDONCHA

Directores:

Prof. Jaime Arias Pérez

Prof^a. M^a Ángeles Aller Reyero

Prof^a. Cruz García Martín

TESIS DOCTORAL

MADRID, 2013

IMPRESO DE INSCRIPCION DE LA UCM

INFORME DE LOS DIRECTORES

EVALUADORES

APROBACION DEL CONSEJO

A mi padre Santiago Cruz

AGRADECIMIENTOS:

Quiero dar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible este trabajo:

- En primer lugar al Prof. Jaime Arias Pérez, Catedrático de Cirugía de la Facultad de Medicina de la U.C.M., por haber aceptado ser codirector de mi Tesis, por su paciencia instruyéndome en Microcirugía, por darme la oportunidad de trabajar junto a él, por su sencillez, y por haberme contagiado su ilusión por la docencia y la investigación.

- A la Prof^a. María Ángeles Aller Reyero, Profesora Titular de Cirugía de la Facultad de Medicina de la U.C.M., por haber aceptado ser codirectora de mi Tesis, por su infinita paciencia y comprensión conmigo, por sus excelentes indicaciones y consejos, y por su enorme capacidad de enseñar.

- A la Prof^a. M^a Cruz García Martín, del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular III, de la Facultad de Medicina de la U.C.M., por haber aceptado ser codirectora de mi Tesis, por haberme permitido trabajar en el laboratorio de bioquímica, por enseñarme a realizar las determinaciones bioquímicas, y por haber tenido tanta paciencia conmigo.

- A María Paz Nava, Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Biológicas de la U.C.M., por haberme enseñado el adecuado manejo de los animales y el método correcto de medición de la presión portal, por haberme abierto las puertas del animalario de la facultad de Ciencias Biológicas, por su paciencia, su cercanía y sus consejos, y por estar siempre pendiente y dispuesta para ayudar.

- A la Dra. Beatriz Diéguez Fernández, por su apoyo y empuje continuo en el inicio y desarrollo de este trabajo y por su amistad.

- Al Dr. Manuel Losada Ruíz con quien pasé tantas horas en el animalario, en el departamento de cirugía y con quien he compartido tantos quebraderos de cabeza en este de trabajo.

- A Fernando Sánchez Patán que con infinita paciencia me enseñó la técnica de la colestasis microquirúrgica experimental en la rata.

- A la Dra. Elena Vara Ameigeiras, del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular III, de la Facultad de Medicina de la U.C.M., por haberme abierto las puertas de su laboratorio para realizar las determinaciones de mi Tesis.

- A la Dra. Patrocinio Vergara Esteras, del Dpto. de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, por ser tan abierta, y por haberme prestado su tiempo y atención en innumerables ocasiones.

- Al personal del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y en especial a su directora Dña. Pilar Bringas de Lastra quienes nos permitieron el uso de sus instalaciones y siempre estuvieron dispuestos a resolver todas mis dudas para el manejo de los animales.

- Al personal del laboratorio de bioquímica de la Facultad de veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona quienes realizaron las determinaciones bioquímicas para la obtención de nuestros resultados.

- Este trabajo no podría haber sido realidad sin el estudio histopatológico de las muestras que realizaron los Dres. del Dpto. de Anatomía Patológica del Hospital Carlos III de Madrid. Agradecer a la Dra. María Teresa Corcuera Pindado su inapreciable colaboración para el estudio de las muestras de tejidos.

- A Pedro Cuesta Álvaro y a Santiago Cano del Centro de Cálculo de la U.C.M., por realizar la estadística y estar siempre dispuestos a nuestras preguntas y dudas.

- A los Laboratorios Novartis, que nos donaron amablemente el Ketotifén.

- Al laboratorio BIO-Nova que realizaron las determinaciones bioquímicas en tejidos.

- A Eva Tavares del Hospital Universitario Virgen de Valme de Sevilla que realizó las determinaciones bioquímicas en Ascitis.

- A Diana Currás que me ayudó en el inicio de este trabajo y fue ejemplo de motivación por la investigación y el conocimiento.

- A Gema de quien he recibido el apoyo necesario sin el cual habría abandonado en múltiples ocasiones.

- A los laboratorios Braum surgical y Covidien que amablemente han colaborado en la financiación de este proyecto.

- Es digna de elogio la calidad humana de este grupo de personas. A todos ellos, les estaré siempre agradecido por haberme tratado con tanto cariño, y por poner su tiempo y sus conocimientos a mi disposición. En este tiempo con ellos, no sólo han sido para mí un referente como científicos, sino también como amigos y personas.

- Este trabajo ha sido parcialmente realizado gracias a la concesión de ayudas a la Investigación:

Ayuda de investigación FISCAM (Fundación para la Investigación de Castilla la Mancha), Ref.nº: PI-2007/64.

Índice de abreviaturas y acrónimos

A

A: Glándula suprarrenal

AB: Ácidos biliares

ACBB11: Canalicular bile salt export pump
(Bomba exportadora canalicular de sales biliares)

ALP: Fosfatasa alcalina

ALT: Alanina amino transferasa

AST: Aspartato amino transferasa

α -SMA: α -smooth muscle actin (alfa actina de músculo liso)

B

B: Bazo

C

CBD: Common bile duct
(Conducto biliar común)

CBP: (Lipid binding protein)
Proteína de unión a lipopolisacáridos

CCL2: Chemoquine ligand 2
(Ligando de quimioquina 2)

CCl₄: Tetracloruro de carbono

CCR2: Chemokine receptor 2
(Receptor de citoquina 2)

CGRP: Péptido relacionado con el gen de la Calcitonina (Calcitonin gen related peptide)

CMQ: Ratas con colestasis microquirúrgica

CMQ+K: Ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén

CO: Monóxido de carbono

Cr: Creatinina

CTFG: Connective tissue growth factor (Factor de crecimiento de tejido conectivo)

CTMC: Connective mast cells
(Células cebadas conectivas)

D

D: Duodenum (Duodeno)

DE: Desviación estándar

DMSO: Dimetil-sulfoxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

Δ PC: Incremento de peso corporal

E

E: Estómago

EGF: Epithelial growth factor
(Factor de crecimiento epitelial)

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ER: Espleno-renal

Eri: Colaterales portosistémicas esplenorenales inferiores o caudales

Ers: Colaterales portosistémicas esplenorenales superiores o craneales

ES: Estadísticamente significativo

F

F: Ligamento falciforme

G

GAGs: Glicosaminglicanos

GGT: Gammaglutamil transferasa

GM-CSF: Factor estimulante de colonias macrófago-granulocito

H

HDL: High Density Lipoprotein (Lipoproteínas de alta densidad)

HGF: Hepatocitary growth factor (Factor de crecimiento

hepatocitario)

HMGB1: High-mobility group protein 1 (Grupo de proteínas de alta movilidad)

H₂S: Sulfuro de hidrógeno

I

ICAM-1: Molecula de adhesión leucocitaria 1

IFCC: International Federation for Clinical Chemistry

IFN- γ : Interferón Gamma

IGF: Insuline-like growth factor

IL: Interleuquinas

iNOS: Oxido nítrico sintasa inducible

IP-10/CXCL10: Interferon inducible-protein 10 (Proteína 10 inducible por interferón)

L

LBP: Lypopolisacaride-binding-protein

LC: Lobulo caudado

LDH: Lactato Deshidrogenasa

LDL: Light Density Lipoprotein (Lipoproteínas de baja densidad)

LK: Left kidney (Riñón izquierdo)

LLD: Lobulo lateral derecho

LLI: Lobulo lateral izquierdo

LLL: Left lateral lobe (Lobulo lateral izquierdo)

LM: Lobulo medio

LPS: Lipopolisacárido

LRV: Left renal vein (Vena renal izquierda)

LSR: Left adrenal gland (Glándula suprarrenal izquierda)

M

MAPK: ERK-mitogen-activated protein kinase

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein 1 (Proteína quimioatrayente de macrófagos 1)

MDC: macrophage-derived chemokine (Quimioquina derivada de los macrófagos)

MDR3: multidrug-resistant 3 protein

MIF: Factor inductor de macrófagos

MIG/CXCL9: Monokine induced by IFN- γ (Monoquina inducida por interferón γ)

ML: Middle lobe (Lóbulo medio)

MMC: Mucosal mast cells (Células cebadas mucosas)

MMP: Metaloproteasas de la matriz tisular

mRNA: Acido ribonucleico mensajero

MRP2: Canalicular conjugate export pump

N

Na: Sodio

NAD⁺ y NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NEFAs: Acidos grasos no esterificados

NF α B/I κ B α : Complejo regulador transcripcional

NF- κ B: Factor de transcripción NF- κ B

NO: Oxido nítrico

O

OATP2, OATPB1: NA-taurocholate cotransporter and organic anion transporting proteins

P

P: Pancreas

PAF: Factor de activación plaquetario

PC: Proceso caudado

PCF: Peso corporal final

PCI: *Peso corporal inicial*

PE: *Peso esplénico*

PH: *Peso hepático*

PDGF: *Factor de crecimiento derivado de las plaquetas*

PE: *Venas periesofágicas*

PGI2: *Prostaciclina*

PP: *Presión portal*

PP: *Colaterales paraportales*

PR: *Colaterales pararectales*

PSO: *Ratas pseudoperadas*

PSO+K: *Ratas pseudoperadas tratadas con ketotifén*

PT: *Peso testicular*

R

R: *Recto*

RI: *Riñón izquierdo*

RANTES: *Regulated on activation of normal T cells-expressed and secreted protein*

RLL: *Right lateral lobe (Lóbulo lateral derecho)*

RMCP-II: *Rat mast cell proteinase II*

ROS: *Especies reactivas de oxígeno*

RT: *Ligamento triangular derecho.*

S

S: *Spleen (Bazo)*

SR: *Glándula suprarrenal*

T

TGC: *Triglicéridos*

TGF- β_1 : *Transforming growth factor (Factor de crecimiento transformador β_1)*

TIMP-1: *Inhibidores tisulares de las MMPs*

TLR-4,2: *Receptores Toll-like*

TNF α , TNF γ : *Factor de necrosis tumoral α y γ*

U

UCM: *Universidad Complutense de Madrid*

V

VCAM: *Molécula de adhesión leucocitaria*

VE: *Vena esplénica*

VEGF: *Vascular endothelial Grow factor (Factor de crecimiento del endotelio vascular)*

VEGF-A: *Vascular endothelial grow factor-recombinant (Factor de crecimiento del*

Abreviaturas y acrónimos

*endotelio vascular-
recombinante)*

VGI: *Vena gástrica izquierda*

VHA: *Vena hepática accesoria*

VLDL: *Very Light Density
Lipoprotein (Lipoproteínas de
muy baja densidad)*

VMS: *Vena mesentérica
superior*

VRI: *Vena renal izquierda*

VVM: *Vasculopatía venosa
mesentérica*

RESUMEN

Introducción. El desarrollo de fibrosis hepática e hipertensión portal en múltiples hepatopatías crónicas de etiología diversa es un proceso multifuncional, mediado por células inflamatorias que, al liberar mediadores fibrogénicos, activan a las células estrelladas y a los miofibroblastos. La administración de ketotifén, un fármaco estabilizador de células cebadas, que inhibe la síntesis y liberación de sus mediadores inflamatorios, en un modelo experimental microquirúrgico de colestasis extrahepática, al inhibir la degranulación de las células cebadas, disminuiría la liberación hepato-intestinal de mediadores inflamatorios y profibrogénicos, consiguiendo así reducir tanto la respuesta inflamatoria esplácnica como la fibrosis biliar secundaria a colestasis

Material y Métodos. Para verificar ésta hipótesis se han estudiado en ratas Wistar pseudo-operadas (PSO; n=15) y con colestasis extrahepática microquirúrgica (CMQ; n=20) la presencia de ascitis, de vasculopatía venosa mesentérica, de hipertensión portal y el desarrollo de circulación colateral portosistémica. Se cuantificaron las concentraciones séricas de parámetros de función hepato-biliar por fotolorimetría, así como los niveles de mediadores pro- y anti-inflamatorios en el ileon terminal, los ganglios linfáticos mesentéricos y el hígado mediante técnicas de inmunoensayo enzimático de tipo *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Por último, se realizó un estudio histopatológico hepático y tinción de Rojo Sirio para cuantificar el área de fibrosis hepática. Los mismos parámetros se evaluaron en ratas PSO (n=20) y en ratas con CMQ (n=20) a las que se administró ketotifen (10 mg/kg/día; v.o.) desde las 24 horas previas a la intervención y durante todo el período postoperatorio de 8-9 semanas

Resultados: Las ratas con colestasis mostraron ascitis, aumento de la presión portal ($p<0.001$), vasculopatía venosa mesentérica y desarrollo de circulación colateral portosistémica con hepato-esplenomegalia ($p<0.001$) y atrofia testicular ($p<0.01$). Además, en las ratas colestásicas se observó hiperbilirrubinemia ($p<0.001$), aumento de la fosfatasa alcalina ($p<0.001$), ácidos biliares ($p<0.001$), aspartato-aminotransferasa ($p<0.001$), colesterol ($p<0.001$), triglicéridos ($p<0.05$) y lipoproteínas de baja (LDL; $p<0.001$) y muy baja densidad (VLDL; $p<0.001$) respecto de las ratas pseudo-operadas. Por el contrario, en éstas ratas se demostró hipoproteinemia ($p<0.001$) e hipoalbuminemia ($p<0.001$) y disminución de la concentración sérica de lipoproteínas de alta densidad (HDL; $p<0.05$). Respecto de la

respuesta inflamatoria esplácnica, en las ratas con colestasis se observó aumento de catalasa en el íleon ($p < 0.01$) y disminuyó en los ganglios linfáticos mesentéricos, glutatión-transferasa y glutatión-peroxidasa disminuyeron también en el íleon y en el hígado, TNF- α aumentó en íleon y ganglios linfáticos mesentéricos, IL-1 β disminuyó en íleon ($p < 0.05$) y ganglios linfáticos mesentéricos y aumentó en el hígado ($p < 0.05$), IL-10 aumentó en íleon ($p < 0.05$), IL-4 aumentó en el íleon ($p < 0.05$) y en el hígado, IL-13 e IL-17A aumentaron en el íleon y disminuyeron en los ganglios linfáticos mesentéricos, la proteína quimioattractante de macrófagos (MCP-1) aumentó en el íleon ($p < 0.05$) y disminuyó en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado ($p < 0.01$), el factor de crecimiento transformador-beta1 (TGF- β 1) aumentó en el íleon y en el hígado y disminuyó en los ganglios linfáticos mesentéricos. En el estudio histopatológico hepático de las ratas colestásicas se observó necrosis y apoptosis hepatocitaria asociado una intensa proliferación epitelial biliar y fibrosis ($p < 0.001$). El tratamiento con ketotifen en las ratas con CMQ redujo la ascitis, el peso corporal, la hepato-esplenomegalia y las concentraciones séricas de bilirrubina total y directa y de ácidos biliares, en tanto que aumentó los niveles séricos de proteínas totales y de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Respecto de las concentraciones de mediadores inflamatorios en el área esplácnica, ketotifen disminuyó los niveles de MCP-1 en el hígado, TNF- α en el íleon y en el hígado ($p < 0.05$) e IL-17A e IL-1 β en el íleon ($p < 0.05$) en tanto que aumentaron las concentraciones de IL-4 e IL-10 en el hígado y de IL-13 en el íleon.

Conclusión. La relevancia del presente trabajo de investigación se fundamenta en la posible extrapolación de los resultados obtenidos a la clínica humana, en la cual la cirrosis, de diferentes etiologías, comporta una elevada morbi-mortalidad en la actualidad. En particular el tratamiento anti-inflamatorio con ketotifen podría ser de utilidad para reducir las complicaciones secundarias a las hepatopatías crónicas de origen biliar.

Palabras clave: colestasis, microcirugía, hipertensión portal, ascitis, inflamación, células cebadas, ketotifén

ABSTRACT

Introduction: The development of hepatic fibrosis and portal hypertension in most cases of chronic hepatic illness from diverse etiologies is a multifunctional process, mediated by inflammatory cells that, when liberate they fibrogenic mediators, they activate star cells and miofibroblasts. Ketotifen, a drug that stabilizes mast cells and inhibits synthesis and liberation of inflammatory mediators, was administered in a cholestasis hepatic microsurgery experimental model, where it inhibits mast cell degranulation which reduces hepatic-intestinal inflammatory and profibrogenic mediators. This achieved a decrease in the splenic inflammatory response as biliar fibrosis secondary to cholestasis.

Material and Methods: In order to verify the hypothesis about the presence of ascitis, venous mesenteric vasculopathy, portal hypertension and the development of portosystemic collateral circulation has been studied in sham-operated Wistar rats (SO; n=15) and in rats with microsurgery extrahepatic cholestasis (MC; n=20). Hepatobiliar function establishes the parameters for seric concentrations by fotocolorimetric tecnicas, as well as the distal ileum, pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators levels, the mesenteric lymphatic nodes and liver by enzymatic immunotest (*enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA*). Finally we perform an hepatic histopathology test and Red Syrius stain to quantify the hepatic fibrosis area. Same parameters were evaluated in sham-operated rats SO (n=20) and in microsurgical cholestatic rats MC (n=20) which were treated with ketotifen (10 mg/kg/day; oral) from 24 hours previous to surgery to the whole postoperative period (8-9 weeks).

Results: Cholestatic rats showed ascitis, rising portal pressure ($p<0.001$), venous mesenteric vasculopathy and porto-systemic collateral circulation with hepato-splenomegaly ($p<0.001$) and testicular atrophy ($p<0.01$). Furthermore, cholestatic rats (MC) showed hiperbilirrubinemy ($p<0.001$), an increase of alcalin phosphatase ($p<0.001$), bile acids ($p<0.001$), aspartate-aminotransferase ($p<0.001$), cholesterol ($p<0.001$), triglicerids ($p<0.05$) and low density lipoproteins (LDL; $p<0.001$) and very low density lipoproteins (VLDL; $p<0.001$) with regard to sham-operated rats. On the other hand, in these rats we noticed hipoproteinemy ($p<0.001$) and hipoalbuminemy ($p<0.001$) and a decrease of seric high density lipoproteins concentration (HDL; $p<0.05$). Relative to splanchnic inflammatory response, in rats

with cholestasis, we showed an increase of catalase in ileum ($p < 0.01$) and a decrease in lymphatic mesenteric nodes; glutation-transferase and glutation-peroxidase also decreased in the ileum and liver, TNF- α increased in the ileum and in the lymphatic mesenteric nodes, IL-1 β decreased in the ileum ($p < 0.05$) and lymphatic mesenteric nodes and increased in the liver ($p < 0.05$), IL-10 increased in the ileum ($p < 0.05$), IL-4 increased in the ileum ($p < 0.05$) and in the liver, IL-13 and IL-17A increased in the ileum and decreased in the lymphatic mesenteric nodes, chemoattractant macrophage protein (MCP-1) increased in the ileum ($p < 0.05$) and decreased in the lymphatic mesenteric nodes and in the liver ($p < 0.01$), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) increased in the ileum and in the liver and decreased in the lymphatic mesenteric nodes. In cholestatic rats hepatic histopathological study showed necrosis and hepatocitary apoptosis associated with an intense bile epithelial proliferation and fibrosis ($p < 0.001$). On the one hand, the treatment with ketotifen in rats with MC decreased ascites, corporal weight, hepato-esplenomegaly and total and direct bylirrubin and bile acids, with increase of the serum levels of total proteins and high density lipoproteins (HDL). As regards the inflammatory mediator concentrations in the splanchnic area, ketotifen decreased the levels of MCP-1 in the liver, TNF- α in the ileum and in the liver ($p < 0.05$), IL-17A and IL-1 β in the ileum ($p < 0.05$). We observed higher levels of IL-4 and IL-10 in the liver and IL-13 in the ileum.

Conclusions: The relevance of this investigative study is based on the possibility of applying the results to a human clinical area, in which cirrhosis of many different etiologies induces currently an elevated morbidity. Particularly, the anti-inflammatory treatment with ketotifen could be useful in order to reduce secondary complications due to biliary chronic liver diseases.

Key words: cholestasis, microsurgery, portal hipertension, ascites, inflammation, mast cells, ketotifen.

ÍNDICE GENERAL

<i>Resumen</i>	<i>Página</i>
I. INTRODUCCION	33
1. COLESTASIS	35
2. ANATOMIA DE LA VIA BILIAR EN LA RATA.....	38
3. COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA EXPERIMENTAL.....	40
4. FISIOPATOLOGIA DE LA COLESTASIS.....	44
5. LAS CELULAS CEBADAS COMO MEDIADORAS DE INFLAMACIÓN Y FIBROSIS.....	53
6. KETOTIFÉN, UN FÁRMACO ESTABILIZADOR DE LAS CÉLULAS CEBADAS.....	65
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
III. MATERIAL Y METODOS	77
1. MATERIAL	79
1.A. ANIMALES.....	79
1.B. INSTALACIONES.....	80
1.B.1. Animalario.....	80
1.B.2. Unidad de microcirugía.....	81
1.B.3. Sala de sacrificio y procesado de muestras.....	81
1.B.4. Area de conservación de muestras.....	82
1.B.5. Eliminación de residuos biológicos.....	82
1.C. FARMACOS.....	82
1.C.1. Anestésicos.....	82
1.C.2. Ketotifén.....	82
1.C.3. Otros fármacos.....	82
1.D. MATERIAL.....	83

ÍNDICE GENERAL

1.D.1. Instrumental quirúrgico.....	83
1.D.1.A. Pinzas.....	83
1.D.1.B. Porta agujas Mayo-Hegar de 12,7 cms.....	83
1.D.1.C. Tijeras.....	83
1.D.2. Material de sutura y ligadura.....	84
1.D.3. Material quirúrgico complementario.....	84
1.D.4. Otros materiales para el procedimiento operatorio y la extracción de muestras.....	84
1.D.5 Material de laboratorio.....	85
1.E. EQUIPOS DE LABORATORIO.....	86
1.E.1. Procesado de muestras.....	86
1.E.2. Estudios bioquímicos en suero	86
1.E.3. Estudio proteínas de fase aguda en sangre.....	86
1.E.4 Determinación de los niveles de mediadores inflamatorios en hígado, ileon y ganglios linfáticos mesentéricos.....	86
1.E.5. Laboratorio de anatomía patológica.....	87
1.E.5.1. Laboratorio general.....	87
1.E.5.2. Laboratorio de inmunohistoquímica.....	87
1.E.5.3. Laboratorio de análisis de imagen con dos sistemas de análisis de imagen.....	88
1.F. REACTIVOS DE LABORATORIO.....	88
1.F.1 Estudios bioquímicos en suero.....	88
- Bilirrubina total y directa.....	89
- ALP.....	89
- Acidos biliares.....	89
- AST.....	89
- ALT.....	89
- GGT.....	90

ÍNDICE GENERAL

- LDH.....	90
- Proteínas totales.....	90
- Albúmina	90
- Urea.....	90
- Creatinina.....	91
1.F.2. Concentraciones séricas de lípidos y lipoproteínas.....	91
- TGC.....	91
- Acidos grasos libres.....	91
- Colesterol.....	91
- HDL-c.....	91
- LDL-c.....	91
- VLDL-c.....	91
1.F.3. TGF β ₁ en sangre.....	92
1.F.4. Niveles de Péptido relacionado con el gen de la Calcitonina (<i>Calcitonin gen related peptide</i> , CGRP) e IL-13 en líquido ascítico.....	92
1.F.5. Niveles de citoquinas en hígado, íleon y ganglios linfáticos mesentéricos..	92
1.F.6. Reactivos para estudio histológico.....	93
- Fijación.....	93
- Inclusion.....	93
- Tincion de Hematoxilina-Eosina.....	93
- Tincion de Rojo Sirio.....	93
2. MÉTODOS	94
2.A. CONDICIONES DE UTILIZACIÓN Y ESTABULACIÓN DE LOS ANIMALES.....	94
2.B. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	94
• Serie I.....	95
• Serie II.....	95
2.C. TÉCNICA ANESTÉSICA.....	96

2.D. TÉCNICA QUIRÚRGICA DE LA PSEUDOPERACION.....	97
2.E. TECNICA QUIRURGICA DE LA COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA... ..	98
2.F. MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO POSTOPERATORIO.....	104
2.G. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES.....	106
2.G.1. Determinacion de la presión venosa portal.....	106
2.G.2. Circulación venosa colateral.....	108
• Circulacion venosa colateral portosistémica.....	108
Area Esplenorrenal.....	108
Area Gastroesofágica.....	108
Area colorrectal.....	109
• Circulacion venosa colateral portohepática.....	110
2.G.3. Vasculopatía venosa mesentérica.....	110
2.G.4. Extracción sanguínea	112
2.G.5. Recogida de muestras histológicas para determinaciones de mediadores inflamatorios.....	113
2. G. 6. Recogida de muestras para estudio histopatológico.....	114
2.H. DETERMINACIÓN SÉRICA DE PRUEBAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA... ..	115
• Bilirrubina total y directa	115
• Transaminasas hepáticas (AST y ALT).....	115
• Fosfatasa alcalina (ALP).....	116
• Gamma-glutamyl transferasa (GGT).....	116
• Lactato deshidrogenasa (LDH)	116
• Acidos biliares.....	117
2.I. DETERMINACION DE PROTEINAS	117
• Proteinas totales	117
• Albúmina	117
• Urea	117

• Creatinina.....	118
2.J. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS Y LIPOPROTEINAS	118
2.K. DETERMINACION DE TGF- β_1	119
2.L. VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA (<i>CALCITONIN GEN RELATED PEPTIDE</i> , CGRP) E IL-13 EN EL LÍQUIDO ASCÍTICO.....	119
2. M. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS EN HÍGADO, ÍLEON Y GANGLIOS LINFÁTICOS MESENTÉRICOS.....	120
2.M.1. Homogeneización de los tejidos	120
2.M.2. Valoración de los niveles tisulares de citoquinas	120
2.M. 3. Determinación de los niveles tisulares de proteínas	121
2.N. ESTUDIO MICROSCÓPICO E HISTOPATOLÓGICO.....	122
2.N.1. Fijación.....	122
2.N.2. Inclusión	122
2.N.3. Procesado de los cortes	123
2.N.4. Tinción y montaje.....	123
• Hematoxilina & Eosina.....	123
• Tricrómico de Masson.....	124
2. Ñ. ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO DE FIBROSIS EN EL PARÉNQUIMA HEPÁTICO CON TINCIÓN DE ROJO SIRIO	124
2.O. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.....	125
IV. RESULTADOS	127
1. SUPERVIVENCIA Y COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS.....	129
1.A. Supervivencia.....	129
1.B. Complicaciones postoperatorias	129
- Pared abdominal.....	129
- Complicaciones neurológicas.....	129

- Colestasis	130
2. HALLAZGOS MACROSCÓPICOS EN LA NECROPSIA.....	130
- Pared abdominal	130
- Complicaciones hemorrágicas.....	130
- Afectación hepática.....	130
- Sistema digestivo.....	132
- Torax.....	132
- Sistema genito-urinario	132
3. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.....	135
4. EVOLUCIÓN DEL PESO HEPÁTICO.....	137
5. EVOLUCIÓN DEL PASO ESPLÉNICO	141
6. EVOLUCIÓN DEL PESO TESTICULAR.....	144
7. CIRCULACION COLATERAL VENOSA PORTOSISTÉMICA.....	146
8. VASCULOPATIA VENOSA MESENTERICA.....	150
9. PRESIÓN PORTAL	151
10. ASCITIS.....	153
10.a. Presencia de ascitis	153
10.b. Volumen de líquido ascítico	153
10.c. Concentraciones de proteína relacionada con el gen de la Calcitonina (CGRP) y de Interleuquina 13 (IL-13) en el líquido ascítico.....	154
11. BIOQUIMICA SANGUÍNEA	156
11a. BT, BD, ALP Y Acidos biliares.....	156
11b. AST, ALT, cociente, GGT, LDH.....	159
11c. Proteínas totales, albumina, urea, creatinina y TGF _{β1}	162
12. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LIPIDOS Y LIPOPROTEINAS.....	166
13. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	171
14. CONCENTRACIONES TISULARES DE MEDIADORES	

ÍNDICE GENERAL

INFLAMATORIOS.....	176
14.A. MEDIADORES ANTIOXIDANTES	176
- Catalasa	176
- Glutation transferasa	178
- Glutation peroxidasa.....	181
14.B. CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS	183
- TNF α	183
- IL-1 β	186
14.C. CITOQUINAS ANTIINFLAMATORIAS	188
- IL-4	188
- IL-10.....	191
- IL-13	193
- IL-17A	195
- MCP-1	197
14.D. FACTORES DE CRECIMIENTO	200
- TGF- β 1	200
- VEGF	202
V. DISCUSIÓN.....	205
VI. CONCLUSIONES.....	227
VII. BIBLIOGRAFIA.....	231

I.INTRODUCCIÓN

1. COLESTASIS

Las enfermedades colestásicas hepáticas son consecuencia de trastornos de la síntesis hepatobiliar y de la excreción de la bilis, lo cual comporta la llegada a la circulación sanguínea de productos biliares (Hirschfield y cols, 2010). En éstas patologías, la lesión de los conductos biliares o de los hepatocitos puede inducir un amplio rango de manifestaciones clínicas que incluyen desde alteraciones aisladas de la bioquímica hepática hasta el fallo hepático o el cáncer hepatobiliar. Las causas del síndrome colestásico pueden ser congénitas, inmunológicas, estructurales, obstructivas/vasculares y tóxicas (Hirschfield y cols, 2010). Se pueden desarrollar varias formas de colestasis, bien por una alteración de la secreción biliar, por una obstrucción del flujo biliar, o por una combinación de ambas. A su vez, el deterioro en el flujo biliar que conduce a la colestasis puede acontecer de forma aguda o crónica. Como consecuencia se produce una retención de ácidos biliares, bilirrubina y otros solutos colefilicos en el hígado y en la sangre y un déficit de ácidos biliares en el intestino.

Aunque los colangiocitos sólo representan una pequeña proporción (3-5%) de las células que forman el parénquima hepático (Alpini y cols., 2001; Hirschfield y cols, 2010), desempeñan un papel fisiopatológico relevante en la composición de la bilis durante su tránsito por la vía biliar, que implica la secreción y absorción de agua, electrolitos y otros solutos orgánicos de la bilis hepatocelular (Alvaro y cols., 1997; Alpini y cols., 2001; Racanelli and Rehermann, 2006; Glaser y cols. 2006). Los colangiocitos son unas células epiteliales ciliadas que delinean la vía biliar, una intrincada red de conductos biliares interconectados que aumentan progresivamente su diámetro desde los conductos de Hering hasta la vía biliar extrahepática (Alpini y cols., 2002; Lorente L y cols., 2009) (Figura 1).

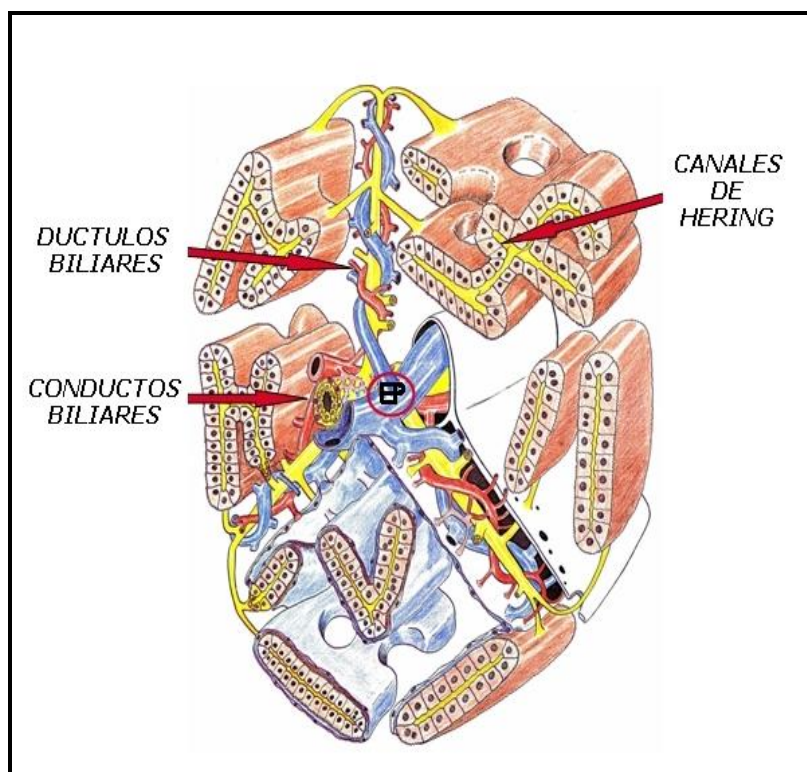


Figura 1. Unidad funcional hepática. Los canaliculos biliares drenan en los canales de Hering y estos a su vez en los ductulos biliares, que desembocan en los conductos biliares interlobulares, situados en los espacios porta (EP). (Arias y cols, 1993)

Los colangiocitos de los grandes conductos biliares interlobulares intervienen fundamentalmente en funciones secretoras, en tanto que los que delimitan los conductos biliares intrahepáticos más pequeños, los colangiolos y los conductos de Hering están implicados en las respuestas inflamatoria y proliferativa (Alpini y cols, 1996; Alpini y cols, 1997). Los cilios de los colangiocitos se extienden desde la membrana plasmática apical hasta la luz del conducto biliar y regulan funciones mecanosensoriales, osmosensoriales y quimiosensoriales (Masyuk y cols., 2006; Masyuk y cols., 2008). La estimulación de los colangiocitos por vías paracrina y endocrina induce la secreción de agua y la alcalinización de la bilis (Srazzabosco y cols, 1991; Kanno y cols., 2001; Esteller, 2008). En éste proceso se integran estímulos prosecretorios (secretina, glucagon, polipeptido intestinal vasoactivo, VIP, acetilcolina, Ach y bombesina) y antisecretorios (somatostatina y endotelina-1) (Fiorotto y cols., 2007; Minagawa y cols., 2007; Srazzabosco y cols, 2009).

El hepatocito es una célula poligonal polarizada que posee una membrana plasmática con una superficie basolateral, localizada en el espacio de Disse,

subyacente a las células endoteliales del sinusoides, y una cara apical que delimita el canalículo biliar (Li y Crawford, 2004). El transporte de proteínas desde la membrana basolateral (sinusoidal) hasta la apical (canalicular) desplaza los ácidos biliares desde la sangre sinusoidal hasta el canalículo biliar mediante una eficiente circulación enterohepática estrechamente regulada (Zollner y Trauner, 2008; Boyer, 2009). La membrana plasmática basolateral contiene proteínas transportadoras que utilizan gradientes de Na^+ y de pH para captar solutos orgánicos desde la sangre hacia el interior del hepatocito. Y la membrana canalicular tiene sistemas de transporte activo que facilitan la secreción de solutos orgánicos hacia la luz canalicular. Receptores nucleares regulan la transcripción de genes que codifican proteínas implicadas en los sistemas de transporte hepatobiliar, de síntesis y detoxificación de ácidos biliares y de fibrogenesis (Fiorucci y cols, 2004; Fickert y cols, 2009; Wagner y cols., 2010). Los ácidos biliares son internalizados a través de la membrana basolateral de los hepatocitos por las proteínas cotransportadora de Na^+ /taurocolato y transportadora de aniones orgánicos (*Na⁺/taurocholate cotransporter and organic anion transporting proteins, OATP2/OATP1*) (Konig y cols., 2006). Los principales solutos orgánicos secretados en la bilis son sales biliares conjugadas con taurina o con glicina (ursodeoxicolato, colato, quenodeoxicolato, deoxicolato y litocolato), fosfatidilcolina, colesterol, glucurónidos de bilirrubina y glutatión (Nathanson y Boyer, 1991; Li y Crawford, 2004). La exportación activa hacia la bilis es mediada por la bomba canalicular exportadora de sales biliares (*canalicular bile SALT export pump, ABCB11*) y por la bomba canalicular exportadora conjugada (*canalicular conjugate export pump; MRP2*). MRP2 regula el transporte canalicular de aniones orgánicos, como la bilirrubina (Hirschfield y cols, 2010). Por último, La formación de micelas mixtas en la bilis resulta de la presencia de ácidos biliares, colesterol y fosfatidilcolina y la bomba exportadora de fosfolípidos proteína 3 resistente a multifármacos (*multi-drug-resistant 3 protein; MDR3*) controla activamente éste proceso (Hirschfield y cols, 2010)

Si la etiología de la colestasis es obstructiva, dependiendo del nivel anatómico de la obstrucción, se clasifica en intrahepática y extrahepática. Las causas más frecuentes de colestasis intrahepática en la clínica humana son la colangitis esclerosante, la cirrosis biliar primaria, la atresia biliar y las hepatopatías de etiología alcohólica, vírica, o farmacológica (Trauner y cols. 1998; Rutherford y cols, 2006;

Hirschfield y cols, 2010; Pakarinen y Rintala, 2011) en tanto que la patología litiásica y tumoral predominan en la colestasis extrahepática (Hirschfield y cols, 2010).

Pero, independientemente de cual sea su causa, este síndrome se manifiesta clínicamente por ictericia, coluria, acolia y prurito (Schaffner y cols. 1979; Sherlock, 1984; Bergasa y cols. 1995a; Bergasa y cols. 1995b; Li y cols. 2004; Heathcote EJ, 2007; Oude Elferink y cols. 2011). Desde el punto de vista bioquímico, la colestasis cursa con niveles séricos elevados de bilirrubina, ácidos biliares (AB), fosfatasa alcalina y γ -Glutamil transferasa e hipercolesterolemia (Li y Crawford, 2004; Shiha y cols. 2009). Finalmente cursa con fibrosis, cirrosis y signos clínicos de insuficiencia hepática y encefalopatía hepática (Boyer y cols 2007; Newton y cols. 2008) Incluso, si la obstrucción es crónica se ha demostrado la evolución tumoral de éste proceso (Xia y cols., 2007; Aller y cols., 2010; Yang y cols., 2011). En conclusión, la patología derivada de la colestasis incluye aspectos morfológicos: acúmulo o estasis de bilis en la vía biliar y en los hepatocitos; funcionales: disminución de la secreción hepática de bilis y del flujo biliar canalicular; y clínicos: retención en la circulación sanguínea de sustancias que normalmente son excretadas en la bilis (Sherlock, 1997; Li y cols. 2004; Zollner y cols, 2008; Chu y cols., 2010; Hirschfield y cols., 2010; Kremer y cols., 2011).

2. ANATOMÍA DE LA VÍA BILIAR EN LA RATA.

El hígado de la rata se compone de cuatro lóbulos, denominados medio (LM), lateral izquierdo (LLI), lateral derecho (LLD) y caudado (LC) que, a su vez poseen una vascularización porto-arterial y un drenaje biliar y venoso individualizado (Castaing y cols. 1980; Lorente y cols. 1995, Lorente y cols., 2009) (Figura 2). Además, algunos autores describen el proceso caudado (PC) como el segmento de parénquima comprendido entre los lóbulos caudado y lateral derecho (Aller y cols. 2008; Lorente y cols. 2009).

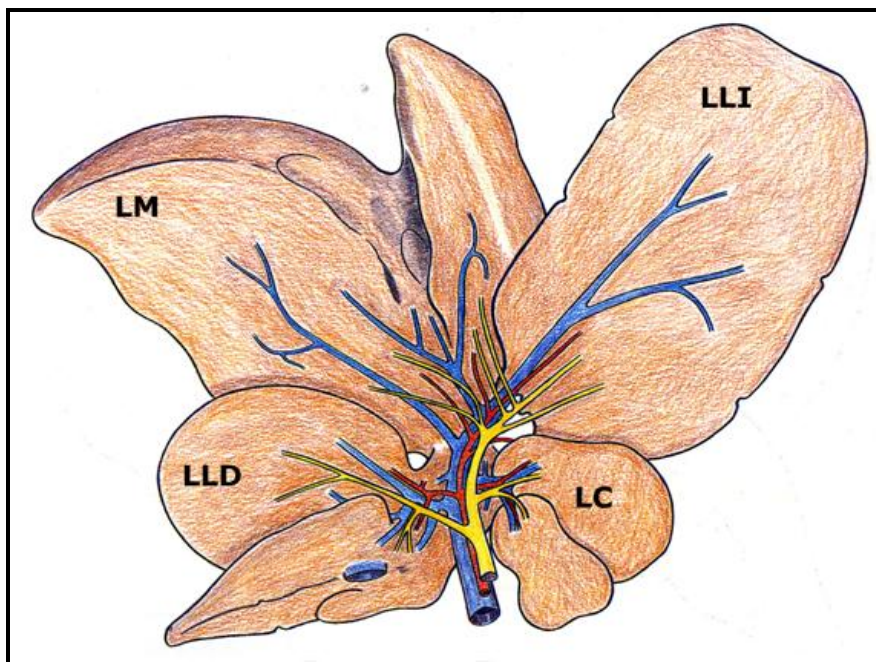


Figura 2. El hígado de la rata se compone de cuatro lóbulos: lateral derecho (LLD), medio (LM), lateral izquierdo (LLI) y caudado (LC) que, a su vez poseen una vascularización porto-arterial y un drenaje biliar y venoso individualizado.

La vía biliar tiene una estructura similar a un árbol, en el cual el colédoco y los conductos biliares lobulares corresponderían al tronco que se ramificarían progresivamente en los conductos biliares interlobulares (Figura 3), los ductulos biliares o canales de Hering y finalmente los canalículos biliares (Figura 1) (Benedetti y cols. 1996; Ref.29; Aller y cols. 2008; Lorente y cols. 2009).

La vía biliar extrahepática en la rata está constituida por el coledoco, que en su trayectoria ascendente recibe en el hilio hepático los siguientes conductos biliares lobulares: conductos inferiores o caudales, correspondientes a los lóbulos caudado y lateral derecho; y conductos superiores o craneales, correspondientes a los lóbulos lateral izquierdo y medio (Aller y cols., 2008; Lorente y cols., 2009) (Figura 3).

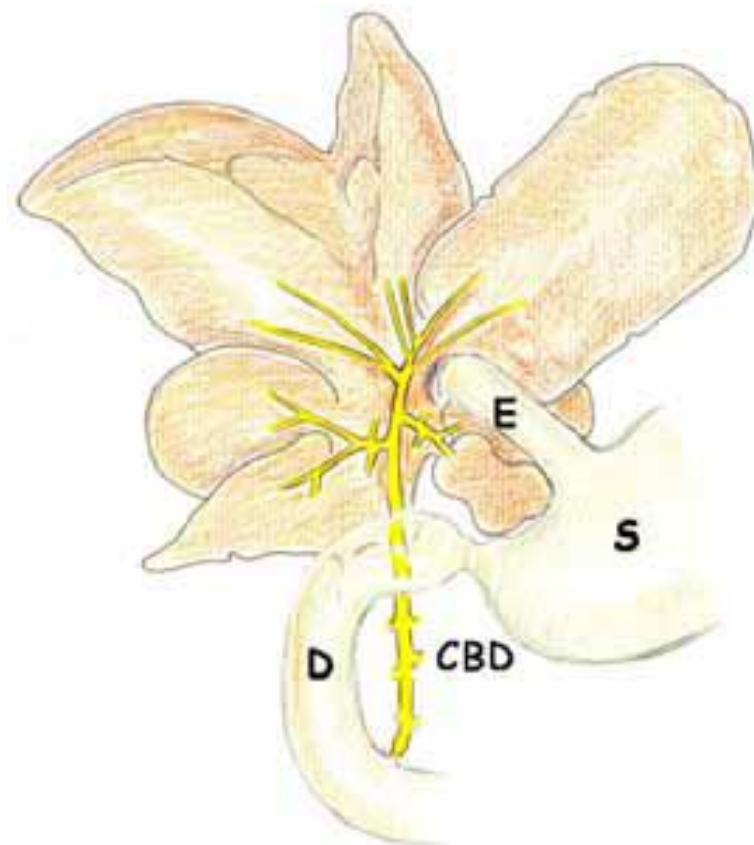


Figura 3: Distribucion mas frecuente de las ramas lobares de primer orden en la rata. CBD:Conducto colédoco; E:Esofago; S:Estómago; D: Duodeno.

3. COLESTASIS EXTRAHEPATICA EXPERIMENTAL

La ictericia obstructiva causa una elevada incidencia de morbi-mortalidad en la clínica humana (O'Connor, 1985; Poupon y cols, 2000). Las severas repercusiones hepáticas y sistémicas de la colestasis (Schaffner y cols. 1979; O'Connor, 1985; Sherlock 1986; Li y cols. 2004; Nguyen y cols., 2010; Chu y cols., 2010; Hirschfield y cols., 2010; Kremer y cols., 2011) han sido la causa de la creación de diversos modelos experimentales que permitan una mejor comprensión de su patogénesis, profilaxis y tratamiento.

La ligadura del colédoco en la rata es un modelo experimental utilizado tanto para el estudio de la hipertensión portal (Katsuta y cols., 2005; Abraldes y cols. 2006) como, en especial, de la colestasis extrahepática (Rodríguez-Garay, 2003; Aller y cols, 2009; Aller y cols., 2010). En esencia, la técnica quirúrgica consiste en la resección del colédoco entre dos ligaduras. Esta técnica es macroquirúrgica, ya que no requiere medios de magnificación para su realización. Sin embargo, las ratas con colestasis extrahepática macroquirúrgica desarrollan un pseudoquiste biliar hiliar por dilatación del extremo proximal ligado del colédoco, que se infecta en muchas ocasiones por microorganismos Gram negativos de procedencia intestinal y los animales fallecen durante las dos primeras semanas de evolución postoperatoria por sepsis secundaria a la existencia de múltiples abscesos intraperitoneales, hepáticos y pulmonares (Aller y cols., 1993, Aller y cols., 2004; Aller y cols., 2009a). El cultivo de la bilis almacenada en éstos pseudoquistes hiliares es positivo y los gérmenes más frecuentes *Escherichia coli* y *Enterococcus* (Aller y cols. 2000), lo cual evidencia que en éste modelo experimental se produce traslocación bacteriana intestinal.

Para evitar estas complicaciones infecciosas propusimos la realización de una técnica microquirúrgica consistente en la resección de la vía biliar extrahepática, que incluye el colédoco hasta el inicio de su porción intrapancreática, en continuidad con los conductos biliares que drenan cada uno de los cuatro lóbulos hepáticos en la rata (Aller y cols., 1993; Lorente y cols., 1995, Aller y cols., 2009a, Aller y cols., 2009b; Aller y cols., 2010). Con esta técnica microquirúrgica la inexistencia de vía biliar extrahepática residual previene la formación de pseudoquistes biliares hiliares, así como de abscesos abdomino-torácicos y reduce la mortalidad respecto al modelo clásico de ligadura y sección del colédoco (Aller y cols., 1993; Aller y cols., 2004; Aller y cols., 2009a, Aller y cols., 2009b; Aller y cols., 2010).

En particular, éste modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica, al conseguir mayor supervivencia, permite obtener a largo plazo un nuevo modelo de fibrosis hepática que puede ser de gran utilidad para el estudio de nuevas terapias antifibrogénicas. En éste sentido, los dos modelos experimentales más utilizados para estudiar la insuficiencia hepática crónica son la administración de tetracloruro de Carbono y la colestasis por ligadura y sección del colédoco (Assimakopoulos y Vagianos, 2009). En el modelo de colestasis extrahepática en la rata se consideran

dos fases evolutivas: precoz, si la colestasis se mantiene cuatro semanas, y tardío cuando se supera este período postoperatorio (Assimakopoulos y Vagianos, 2009). Así, cuando la ictericia obstructiva es aguda la colemia predomina sobre la lesión del parénquima hepático, no existiendo todavía ni hipertensión portal ni cirrosis, si bien induce efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos sobre el corazón (Joubert, 1978; Liu y cols., 2000; Nahavandi y cols. 2001; Mani y cols. 2002; Hajrasouliha y cols. 2004), altera la respuesta vasoconstrictora simpática (Bomzon y cols., 1985; Jacob y cols., 1993) y causa una intensa diuresis y natriuresis, que pueden incluso desembocar en hipovolemia (Green y Better, 1995; Kramer , 1997). Como consecuencia, se producen hipotensión arterial y disfunción renal prerrenal, que es agravada por la endotoxemia que acompaña a éste modelo experimental. Por el contrario, cuando la evolución de la colestasis es crónica (más de cuatro semanas), además de la colemia, la endotoxemia y la traslocación bacteriana intestinal (Deitch y cols., 1990; Clements y cols, 1996; Clements y cols., 1998), se produce una lesión significativa hepática, con cirrosis biliar, hipertensión portal y ascitis (Green y Better, 1995; Geerts y cols., 2008) que se asocia a una lesión renal similar fisiopatológicamente al síndrome hepatorenal de los enfermos cirróticos. Por éste motivo la colestasis obstructiva extrahepática crónica en la rata se ha propuesto como un modelo experimental valido para el estudio de la fisiopatología y de nuevas opciones terapéuticas en ésta grave situación en la clínica humana (Assimakopoulos y Vagianos, 2009)

En general, la mayoría de estos modelos experimentales han sido utilizados para el estudio de aquellos mecanismos patogénicos implicados en los procesos inflamatorios causantes de diversas patologías. En particular, en el caso del modelo experimental de colestasis, se han estudiado la anatomía de la via biliar extrahepática en la rata Wistar (Lorente y cols. 1995), la incidencia de infecciones postoperatorias (Aller y cols. 1993a), la técnica microquirúrgica de colestasis extrahepática en la rata (Aller y cols., 1993b), y, entre las alteraciones hepáticas secundarias a colestasis, los parámetros sanguíneos propios de lesión hepatobiliar, el grado de fibrosis y proliferación biliar (Aller y cols. 2004a; Aller y cols. 2004b) y el metabolismo oxidativo hepato-intestinal (López y cols. 1999) y cerebral (García-Moreno y cols., 2002).

Esta técnica microquirúrgica de colestasis extrahepática puede ser también realizada en el ratón (Aller y cols. 2009a; Aller y cols. 2009b). El hígado del ratón, al igual que el de la rata, está compuesto por cuatro lóbulos que reciben los mismos nombres. La principal diferencia en la vía biliar de ambos roedores es que el ratón posee vesícula biliar. Por ello, si se efectúa ligadura del colédoco se produce una marcada dilatación de la vesícula biliar que puede evolucionar a perforación y coleperitoneo (Abralde y cols. 2006). Por ello la colestasis extrahepática microquirúrgica en el ratón precisa añadir una colecistectomía. La disección, ligadura y sección de los conductos biliares de los lóbulos medio y lateral izquierdo se simplifica si se realiza previamente la disección de la vesícula biliar y del conducto cístico (Aller y cols. 2009a; Aller y cols. 2009b).

La utilización profiláctica de antibióticos de amplio espectro (Ceftacidima 50mg/kg) y la administración semanal de vitamina K1 (8 mg/kg i.m.) permite reducir la mortalidad precoz de éstos animales (Beck y Lee, 1995; Huang y cols. 2003; Akimoto y cols, 2005; Abralde y cols. 2006).

A largo plazo, ambos modelos de colestasis extrahepática, macro y microquirúrgica, cursan con hepatomegalia asociada al desarrollo de una intensa fibrosis y proliferación biliar, fibrosis y de un moderado grado de infiltración inflamatoria portal, así como de muerte hepatocitaria por necrosis y/o apoptosis, si bien la pérdida de la arquitectura hepática normal típica de cirrosis se observa en raras ocasiones (Kountouras y cols. 1984; Aller y cols. 1993; Aller y cols. 2004; Abralde y cols. 2006).

Respecto de las alteraciones extrahepáticas destacan la ictericia, la coluria (Huang y cols. 2003; Aller y cols. 2004), la hipertensión portal con esplenomegalia y circulación colateral portosistémica (Aller y cols. 1993; Huang y cols. 2003; Aller y cols. 2004; Chan y cols. 2004; Katsuta y cols. 2005), la insuficiencia renal (Assimakopoulos y Vagianos, 2009) la encefalopatía hepática (Bergasa y cols., 1992; Garcia-Moreno y cols. 2002; García-Moreno y cols. 2005; Butterworth y cols., 2009; Huang y cols. 2010; Magen y cols. 2010; Assimakopoulos y cols. 2010; Eslimi y cols. 2011) y la ascitis (Huang y cols. 2003; Aller y cols., 2010a; Aller y cols. 2010b). Por lo tanto, la colestasis extrahepática experimental no es sólo un modelo

idóneo para estudiar la patología hepática secundaria a la obstrucción biliar, sino también sus complicaciones extrahepáticas.

4. FISIOPATOLOGIA DE LA COLESTASIS

Las alteraciones hepáticas que se producen como consecuencia de la colestasis extrahepática han sido comparadas a las que protagonizan la curación de las heridas, esto es, la proliferación epitelial y, en particular, la fibrogénesis (Bissell, 2004; Aller y cols., 2008; Meran y Steadman; 2011). La patogenia de la fibrosis hepática consiste en un depósito excesivo de colágeno fibrilar y otras proteínas de la matriz extracelular que distorsiona la arquitectura hepática e induce capilarización sinusoidal e hipertensión portal. En esencia, la fibrosis hepática es un proceso dinámico de reparación tisular aberrante en el que los fenómenos claves son la activación y transformación de las células estrelladas hepáticas quiescentes en células similares a miofibroblastos, por un proceso de transición epitelio-mesenquimal de tipo 2, con el subsiguiente incremento en la síntesis de proteínas, como actina de músculo liso- α , de colágeno, metaloproteasas de la matriz, inhibidores tisulares de metaloproteasas y proteoglicanos (Mormone y cols., 2011; Meran y Steadman, 2011; Fragiadaki y Mason, 2011).

Inmediatamente después de la obstrucción completa de la vía biliar en la rata se produce un intenso incremento (60%) de la presión biliar intraductal (Slott y cols. 1990; Azmaiparashvili y cols. 2009) y esto es seguido por alteraciones patológicas de la matriz extracelular (Desmouliere y cols. 1997). Por el contrario, la descompresión biliar, al suprimir el estrés mecánico, revierte las lesiones hepáticas inducidas por la ligadura del colédoco (Ramm y cols. 2000; Matsumoto y cols., 2002; Costa y cols. 2003; Kirkland y cols. 2010). Estos estudios demuestran la relevancia de la energía mecánica en la etiopatogenia de la patología hepática secundaria a la obstrucción de la vía biliar.

La respuesta del hígado de los roedores a la lesión obstructiva biliar implica su reprogramación transcripcional, favoreciendo la activación de genes reguladores del metabolismo, de la proliferación celular y de la remodelación de la matriz de forma secuencial y limitada en el tiempo (Campbell y cols. 2004; Wang y cols. 2008). Aunque se produce una activación predominante de genes metabólicos en todas las fases posteriores a la ligadura del colédoco, desde una fase inmediata (1 día) hasta una fase tardía (21 días), la afectación de vías metabólicas específicas es diferente dependiendo de la duración de la obstrucción (Campbell y cols. 2004). En tanto que algunos genes son activados en el periodo precoz de la colestasis, por ejemplo genes implicados en la disrupción del metabolismo lipídico y en la fibrosis, otros genes, como son los implicados en mecanismos de protección celular frente a la agresión por acumulación tóxica de ácidos biliares, son inhibidos (Kojima y cols. 2004).

Después de la ligadura del colédoco el hígado de la rata sufre severas alteraciones hemodinámicas, portales y arteriales, que pueden comportar lesiones por isquemia-reperusión y estrés oxidativo (Huang y cols. 2009; Yang y cols. 2012; Oguz y cols., 2012). El aumento de la resistencia vascular en el sistema portal hepático secundario a colestasis extrahepática produce hipertensión portal (Ohara y cols. 1993; Li y Yang, 2005; Van Steenkiste y cols. 2010) e isquemia hepática, asociadas a una síntesis deficitaria del enzima Oxido Nítrico Síntasa-inducible (iNOS) y de oxido nítrico (NO) (Barón y cols. 2000; Lee y cols., 2011).

La vía biliar es vascularizada por el plexo peribiliar (Gaudio y cols. 1996; Li y cols. 2007; Toki y cols. 2011), localizado alrededor de los conductos biliares de menor calibre, haciéndose así progresivamente más estrecho y más simple (Gaudio y cols. 1996). Estas características del plexo peribiliar permiten asumir que el aumento de presión intraductal con dilatación de la vía biliar en la colestasis extrahepática podría comprimir el plexo peribiliar con la consiguiente isquemia de la vía biliar. Sin embargo, se ha descrito que después de la disminución del flujo sanguíneo a través de la vena porta se produce un aumento del flujo arterial hepático o "*hepatic arterial buffer response*" (Lautt, 1983). Además, dos semanas después de ligadura del

colédoco en la rata se produce una proliferación significativa del plexo peribiliar, que drena por pequeñas vénulas en ramas de la vena porta y en los sinusoides hepáticos (Gaudio y cols. 1996). A su vez, la lesión por isquemia-reperfusión ha sido implicada en la patogénesis de la colestasis intrahepática (Tanaka y cols. 2006; Toki y cols., 2011).

Las ratas con ligadura del colédoco sufren una excesiva acumulación de ácidos biliares hidrofóbicos que son considerados la causa principal de hepatotoxicidad (Gartung y cols., 1996; Poli, 2000). Además, se produce un deterioro parcial de las funciones de la cadena transportadora de electrones mitocondriales y estrés oxidativo (Poli, 2000; Huang y cols. 2003). La retención y el acúmulo de sales biliares hidrofóbicas (tauro- y glicoquenodesoxicolato) puede inhibir la actividad antioxidante hepática de catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reducido y superóxido dismutasa, así como inducir necrosis hepatocitaria al activar la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Orellana y cols. 1997; Wang y cols. 2007; Portincasa y cols. 2007; Assimakopoulos, 2007; Arduini y cols. 2011). Existe por tanto una estrecha relación entre la ictericia obstructiva experimental y el estrés oxidativo (Orellana y cols. 1997; Assimakopoulos y cols. 2004; Wang y cols. 2007). Así, se ha demostrado que el tratamiento con antioxidantes mejora el estado redox celular hepático (Assimakopoulos y cols. 2004; Soyly y cols. 2006), y las funciones hepáticas al inhibir la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Soyly y cols. 2006; Assimakopoulos y cols. 2007; Portincasa y cols. 2007; Tahang y cols. 2007).

Por consiguiente, en la fase precoz tras ligadura del colédoco en la rata el insuficiente aporte de oxígeno que sufre el hígado, como consecuencia de las alteraciones hemodinámicas, así como a la incorrecta utilización del oxígeno por la hepatotoxicidad de las sales biliares, constituirían factores etiológicos esenciales de la inhibición del metabolismo energético hepático. Como consecuencia, el hígado reduce su capacidad funcional para poder satisfacer las necesidades metabólicas tisulares. La lesión oxidativa hepática podría disminuir el contenido intracelular de proteínas que participan en la síntesis energética y en las funciones de membrana, como son las proteínas reguladoras del transporte de H₂O e iones (Portincasa y cols.

2007), lo cual induciría edema intersticial y celular. Además, el aumento de peroxidación lipídica hepática, un marcador de estrés oxidativo (Portincasa y cols. 2007), puede relacionarse con el aumento de la permeabilidad de membrana, el aumento de la degradación de los componentes de la matriz extracelular y el edema (Kennett y Davies, 2007).

La acumulación intersticial de fragmentos de Glicosaminoglicanos (GAGs) sería un importante mecanismo de la formación del edema debido a las propiedades hidrofílicas de GAGs, en particular de hialuronan (Day y de la Motte, 2005; Cantor y Nadkarni, 2006; Stern y cols. 2006; Kennett y Davies, 2007; Yung y Chan 2007; Bartlett y cols. 2007; Jiang y cols. 2007). GAGs son largas cadenas de polisacáridos no ramificadas compuestas de unidades repetidas de disacáridos que tienden a adoptar conformaciones en espiral, muy extendidas y que ocupan un gran volumen en relación con su masa. Estos polisacáridos atraen y atrapan agua e iones, con lo cual forman geles hidratados, aunque permiten el flujo a su través de nutrientes para las células (Alberts y cols. 1983; Rhodes y Simons, 2007; Jiang y cols. 2007; Solís-Herruzo y cols., 2011). En situaciones de inflamación hialuronan es más polidisperso y tiende a formas de menor peso molecular, favoreciendo así la infiltración edematosa de los tejidos (Jiang y cols. 2007), el flujo del líquido intersticial y el gradiente de presión del sistema linfático (Chen y Fu, 2005).

Además, la tensión mecánica producida por la ligadura del colédoco puede alterar por mecanotransducción la remodelación de los proteoglicanos y de GAGs en el intersticio (Evanko y cols. 2007). Virtualmente todos los órganos y tejidos están organizados en jerarquías estructurales y poseen una capacidad de respuesta mecánica inmediata aumentando su rigidez en proporción directa al estrés mecánico aplicado (Ingber, 2006). La rigidez de la matriz extracelular y la tensión mecánica que resulta de la adhesión celular a sustratos rígidos es fundamental para determinar el fenotipo expresado por muchas células en cultivo (Bischofs y Schwarz, 2003).

En el modelo de fibrosis biliar por CCl_4 en la rata se ha descrito la inducción precoz de rigidez hepática. Este aumento de la consistencia y/o rigidez hepática parece ser el resultado del aumento de la cantidad de matriz neoformada, de la reticulación de la matriz y, posiblemente de otras variables desconocidas (Georges y

cols. 2007). Este aumento precoz en la rigidez hepática podría ser la causa de la diferenciación de los miofibroblastos en las patologías hepáticas (Georges y cols. 2007; Muddu y cols. 2007). La expresión de la función miofibroblasto aporta a las células estrelladas hepáticas activadas la capacidad para comportarse como células musculares lisas y, por consiguiente, responden a las sustancias vasoactivas contrayéndose (Lee y Friedman, 2011). Además, la contracción de las células estrelladas activadas regula el diámetro de la vascularización hepática y altera el flujo sanguíneo y la presión hepática (Winaw y cols. 2008).

La adquisición posterior en la evolución del hígado colestásico de un fenotipo inmune afecta a las células parenquimatosas (hepatocitos y colangiocitos), a las no parenquimatosas (células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer y miofibroblastos) y a las células sanguíneas que migran al intersticio hepático (Azouz y cols. 2004; Morwood y Nicholson, 2006; Szabo y cols. 2007; Muddu y cols. 2007; Winaw y cols. 2008). Sin embargo, el espacio intersticial parece ser el que modula la actividad inflamatoria de las células inmunes tras la ligadura del colédoco en la rata (Aller y cols, 2008). En particular, los fragmentos de matriz extracelular y sus receptores ejercen importantes efectos sobre las células inflamatorias y, por ello, se considera que están claramente implicados en la evolución de la respuesta inmune intersticial (Morwood y Nicholson, 2006; Adair-Kirk y Señor, 2007; Yung y Chan 2007). Las Metaloproteasas de la matriz (MMPs) son una familia de enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular que son expresadas en los tejidos inflamados (Cuenca y cols. 2006; Malemud, 2006; Zitka y cols., 2010; Löffek y cols., 2011) y, en particular, en el hígado colestásico (Roeb y cols. 1997; Harty y cols. 2005; Bergheim y cols. 2006). La destrucción enzimática de la matriz extracelular cursa con la liberación inmediata de los mediadores secuestrados en dicha matriz (Stern y cols. 2006; Yung y Chan, 2007).

Los fragmentos de la matriz extracelular están constituidos por moléculas con funciones proinflamatorias que pueden potenciar la respuesta inmune activando la respuesta inmune innata y la adquirida (Morwood y Nicholson, 2006). Así, las proteínas de la matriz extracelular y el hialuronan ejercen una función proinflamatoria uniéndose a los receptores *Toll-like* (TLR)-4 y TLR-2 (Szabo y cols. 2007), con activación del complejo regulador transcripcional NF α B/I κ B α y la

producción de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-1 β , y de quimioquinas que inducen la activación y el reclutamiento intersticial de leucocitos (Morwood y Nicholson, 2006). Los linfocitos T, una vez activados, se polarizan hacia la producción de distintos perfiles de citoquinas (Zhu y cols., 2010; Yagi y cols., 2011). El tipo 1 (Th₁) sintetiza Interferon γ (IFN- γ) e IL-2 y, los de tipo 2 (Th₂) producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Las citoquinas Th₂ están implicadas fundamentalmente en la mediación de la inflamación alérgica y los trastornos fibroproliferativos crónicos (Azouz y cols. 2004).

Los macrófagos residentes en el hígado, o células de Kupffer, se localizan fundamentalmente en el área periportal del lobulillo y, debido a su localización, podrían desempeñar un papel fundamental en la lesión secundaria a isquemia-reperfusión (Kolios y cols. 2006; Abu-Amara y cols, 2010; Jaeschke y cols., 2012). Pero las células de Kupffer están también implicadas en la inflamación hepática que produce la colestasis mediante la liberación de sustancias biológicamente activas que inducen un proceso inmunopatogénico (Minter y cols. 2005; Abrahám y cols., 2008; Zandieh y cols., 2011; Cheng y cols., 2011).

Las células de Kupffer están claramente afectadas en la obstrucción biliar (Minter y cols. 2005; Abrahám y cols., 2008; Zandieh y cols., 2011; Cheng y cols., 2011) y muestran una activación de la fagocitosis y una marcada respuesta proinflamatoria frente a endotoxina y a la proteína de unión a lipopolisacárido (*lypopolysaccharide-binding protein*, LBP), ambas aumentadas en colestasis extrahepática (O'Neil y cols. 1997; Minter y cols. 2005; Kolios y cols. 2006; Isayama y cols. 2006; Minter y cols., 2008; Kassel y cols., 2011). La hipersensibilidad a endotoxina en colestasis es la causa de la síntesis aumentada de citoquinas proinflamatorias y del aumento de la peroxidación lipídica (Harry y cols. 1999; Isayama y cols. 2006; Abrahám y cols., 2008), con agravamiento de la apoptosis que, finalmente progresa a necrosis (Moazzam y cols. 2002; Iida y cols., 2010). Sin embargo, la deplección de células de Kupffer agrava la inflamación y la necrosis hepatocelular en ratones con colestasis (Gehring y cols. 2006). La respuesta proinflamatoria inducida por LPS en ratas con ligadura de coledoco es inhibida por lipoproteínas de alta densidad (HDL), que, a su vez, inhibe las vías proinflamatorias

hepáticas, restaura la actividad de eNOS y reduce la presión portal (Thabut y cols. 2007).

La inflamación se asocia siempre a la infiltración intersticial por leucocitos, un proceso que es regulado por quimioquinas (Aller y cols. 2006; Mantovani y cols., 2011). En la colestasis extrahepática monocitos/macrófagos infiltran el hígado, que hiperexpresa a su vez proteína quimioattractora de monocitos (*monocyte chemoattractant protein*, MCP-1), una quimioquina CC y, como resultado éstos monocitos favorecen la respuesta inflamatoria (Imamura y cols. 2005; Sigal y cols., 2010). Además, la colestasis extrahepática estimula la síntesis de quimioquinas CXC que son, en parte, responsables de la infiltración de los tractos portales por neutrófilos (Saito y cols. 2000; Gujral y cols. 2003; Patsenker y cols., 2008; Aller y cols 2010)

Los neutrófilos son componentes esenciales de la respuesta inflamatoria precoz a la agresión que sufre el hígado por colestasis (Shivakumar y cols. 2004; Laschke y cols., 2010; Jaeschke 2011;). En la colestasis extrahepática experimental la infiltración intersticial por neutrófilos ocurre ya a los tres días de la ligadura del colédoco (Levy y cols. 1993; Gujral y cols. 2003; Georgiev y cols. 2008). Las células del epitelio biliar contribuyen a la inflamación produciendo quimioattractantes de neutrófilos (Saito y Maher, 2000; Dold y cols., 2010). Además, las células de Kupffer activadas por la endotoxemia portal secundaria a colestasis, estimulan la liberación de quimioquinas por los hepatocitos, lo cual implica a su vez la infiltración por neutrófilos (Wakabayashi y cols., 2008)

En esencia, la inflamación crónica hepática y la fibrogénesis constituyen un agregado dinámico de linfocitos, macrófagos y células del estroma relacionadas por interacciones autocrinas y paracrinas (Holt y cols., 2008). En ratas con ligadura de colédoco a largo plazo persiste una importante migración celular alrededor de la triada portal y de la vena central que se asocia con un aumento de citoquinas proinflamatorias en el hígado (Fernández-Martínez y cols. 2006). Sin embargo, las citoquinas proinflamatorias inducen una respuesta hepatocitaria heterogénea al estímulo colestásico con una inhibición selectiva de los hepatocitos de la zona periportal (Donner y cols. 2007).

Ambos tipos celulares presentes en el intersticio hepático, las células estrelladas y los miofibroblastos, tienen la capacidad de expresar un fenotipo inmune. En particular, las células estrelladas hepáticas sintetizan un amplio espectro de mediadores inflamatorios, como quimioquinas (MCP-1, RANTES), factor de activación plaquetario (*platelet activation factor*, PAF), IL-8 y moléculas de adhesión leucocitaria (ICAM-1, VCAM), que son necesarias para el reclutamiento y la activación de los leucocitos en el intersticio (Bataller y Brenner, 2005; Rockey, 2006; Iredale, 2007; Gressner y cols. 2007; Friedman, 2008; Wasmuth y cols, 2010; Wasmuth y Weiskirchen, 2010). El alojamiento de leucocitos en el espacio intersticial hepático es favorecido por las células estrelladas hepáticas ya que éstas células expresan MMPs, lo cual aumenta la degradación de la matriz extracelular (Rockey, 2006; Gressner y cols., 2007; Aller y cols., 2010a; Day y cols., 2005). Por lo tanto, las células estrelladas hepáticas cambian su fenotipo contráctil a un fenotipo inmune. Se considera que éstos dos fenotipos están íntimamente relacionados, e incluso son interdependientes (Rockey, 2006 ;Aller MA, 2010a.)

La infiltración del hígado colestásico por células inflamatorias (monocitos, neutrófilos) también sería secundaria a traslocación bacteriana intestinal. Endotoxinas y bacterias de procedencia intestinal alcanzarían el hígado en elevadas concentraciones como consecuencia del aumento de la permeabilidad de la barrera mucosa intestinal (Balzan y cols. 2007). La traslocación bacteriana intestinal es una complicación de la hipertensión portal y, por consiguiente, se produce en ratas con ligadura de colédoco (Garcia-Tsao y Wiest, 2004; Sztrymf y cols. 2005; Karatepe y cols., 2010; Huang y cols., 2011). Las bacterias que colonizan la luz intestinal constituyen un gran reservorio de productos microbianos, como LPS, endotoxinas y otros fragmentos de la pared bacteriana, que son capaces de inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Garcia-Tsao y Wiest, 2004). Por lo tanto, la traslocación bacteriana es un mecanismo etiopatogénico de infecciones bacterianas en la colestasis experimental (Sztrymf y cols. 2005; Abdeldayem y cols., 2007). El aumento de la producción de TNF- α puede inducir traslocación bacteriana en ratas con cirrosis y ascitis ya que el bloqueo de TNF- α es capaz de inhibirlo sin aumentar la incidencia de infecciones sistémicas (Sztrymf y cols., 2004; Francés y cols. 2007; Aller y cols. 2010b; Corradi y cols., 2011)

Las fases evolutivas tardías del modelo experimental de colestasis extrahepática se caracterizan por el desarrollo de angiogénesis, esto es, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a expensas de vasos pre-existentes (Kurz y cols. 2003; Davis y cols., 2011; Geudens y Gerhardt, 2011). Aunque el objetivo final de la proliferación endotelial es formar nuevos vasos sanguíneos para el transporte de oxígeno, sustratos y células sanguíneas (fase vascular), el endotelio posee otras funciones antes de que los nuevos vasos se desarrollen (fase prevascular) (Aller y cols. 2007a, Aller y cols. 2007b). Así, en las fases iniciales de la respuesta inflamatoria (fenotipos de isquemia-reperfusión y leucocitario), las nuevas células endoteliales podrían adoptar una función anti-inflamatoria. Dichas propiedades, antioxidantes y anti-inmunes, favorecerían la resolución, así como la progresión al fenotipo angiogénico vascular (Aller y cols. 2007b). La angiogénesis requiere la migración de células endoteliales al espacio intersticial, con la consiguiente proliferación y diferenciación en capilares (Aller y cols. 2007b).

En ratas con ligadura de colédoco la proliferación de los conductillos biliares, como ocurre en la organogénesis hepática, precede a la proliferación de los microvasos que los vascularizan. Después de una semana de ligadura de colédoco, a pesar de la intensa proliferación biliar, el plexo arterial peribiliar mantiene su arquitectura normal. Por el contrario, después de 2 a 4 semanas de evolución se desarrolla una significativa proliferación de la microvascularización que se extiende desde el plexo peribiliar de los tractos biliares (Gaudio y cols. 1996; Glaser y cols, 2009; Glaser y cols., 2011).

El papel fundamental que ejercen los colangiocitos en la angiogénesis que ocurre después de la ligadura del colédoco en la rata ha sido corroborado al asociar la ligadura de la arteria hepática a la colestasis por ligadura del colédoco. En ésta situación, el hígado sufre un aumento de la apoptosis de colangiocitos, se altera la proliferación de los colangiolos con disminución de la secreción de factor de crecimiento de endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) por los colangiolos y desaparece el plexo peribiliar. Curiosamente, las funciones de los colangiocitos y, por lo tanto, la integridad del plexo peribiliar son preservadas mediante el tratamiento con VEGF-A recombinante (Gaudio y cols. 2006). Igualmente, en el trasplante de hígado en el ser humano la regeneración biliar se

produce a expensas de una proliferación inicial del compartimento epitelial, seguido del compartimento vascular que parece ser inducido por la expresión epitelial de VEGF-A (Van den Heuvel y cols. 2006).

5. LAS CELULAS CEBADAS COMO MEDIADORAS DE INFLAMACIÓN Y FIBROSIS.

En la producción de la fibrosis biliar secundaria a colestasis extrahepática por ligadura y sección del colédoco han sido implicados mediadores de los sistemas nervioso: Norepinefrina; inmune: citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, y endocrino: el sistema renina-angiotensina. A su vez, la fibrosis hepática que se produce en roedores tras la ligadura y sección del colédoco es la consecuencia de un proceso inflamatorio de origen biliar (Kershenovich y Weissbrod 2003; Li y Crawford 2004; Aller y cols., 2011) cursando, por lo tanto, con las alteraciones propias de la inflamación: estrés oxidativo y nitrosativo y deterioro de la actividad antioxidante, edema de los tractos portales, activación de los macrófagos hepáticos y reclutamiento de células inflamatorias, en particular infiltración neutrofílica de los espacios periductulares hepáticos y de células cebadas en los espacios porta y en los septos portales en la vecindad de los capilares del plexo arterial peribiliar (Rioux y cols., 1996; Takechita y Shibayama 2005). En este sentido, la fibrosis biliar es similar al proceso de reparación tisular que ocurre en la curación de las heridas y que se caracteriza por acúmulo de proteínas de la matriz extracelular, en particular de colágeno (Aller MA y cols., 2008).

Aunque todas las células hepáticas tienen un potencial fibrogénico, son las células estrelladas hepáticas las principales productoras de colágeno en el hígado. Sin embargo, en tanto que las células estrelladas hepáticas activadas son el principal tipo celular fibrogénico en las áreas pericentrales, los miofibroblastos portales pueden predominar cuando la lesión hepática tiene lugar alrededor de los tractos portales, como es el caso de la colestasis extrahepática, en la cual se produce una intensa respuesta fibrótica en los tractos portales (Lazaridis y cols., 2004; Mormone y cols, 2011; Lee y Friedman 2011). De hecho, se ha demostrado que los fibroblastos portales son capaces de transdiferenciarse en miofibroblastos en modelos

experimentales de fibrosis en roedores, tras ligadura del colédoco, y en la cirrosis biliar humana (Kinnman y Housset, 2002; Kruglov y cols., 2006; Omenetti y cols., 2008, Omenetti y cols., 2011).

Las células cebadas o mastocitos están ampliamente distribuidas por prácticamente todos los tejidos vascularizados del organismo, donde se localizan en estrecha proximidad con los vasos sanguíneos y los nervios (Galli y cols. 2005). Son especialmente abundantes en los lugares anatómicos que están directamente expuestos al medio ambiente, como son el tracto gastrointestinal, la piel y las vías aéreas (Galli y cols. 2005; Metz y cols. 2007). Se ha demostrado que las células cebadas están presentes en el hígado, tanto en condiciones normales como patológicas en el ser humano y en la rata (Farrel y cols. 1995; Rioux y cols. 1996). Múltiples estudios han comprobado que los mastocitos están implicados en diversas hepatopatías (Farrel y cols. 1995; Armbrust y cols. 1997; Yamashiro y cols. 1998; Matsunaga y Terada, 2000), demostrándose así que éstas células inmunes tienen un papel más amplio de lo que se pensaba originalmente (Franceschini y cols. 2006).

Las células cebadas contienen histamina, heparina, serinproteasas, como quimasa y triptasa, y citoquinas multifuncionales (Theoharides y cols., 2012), que son importantes mediadoras de los procesos de cicatrización y curación de las heridas (Artuc y cols. 1999). Por lo tanto, las células cebadas desempeñan un papel clave en la remodelación tisular y la fibrosis. Diversos mediadores sintetizados por estas células, como triptasa, TGF- β y TNF- α , pueden inducir la proliferación de fibroblastos y de células estrelladas hepáticas y la síntesis de colágeno por distintos tipos celulares (Gordon y Galli 1994; Vliagoftis y Befus 2005; Moon y cols., 2013). Las células cebadas producen además Metaloproteasas de la matriz (MMP-1, MMP-2 y MMP-9), así como inhibidores tisulares de MMPs (TIMP-1) (Atamas y White 2003), lo cual indica que esán también implicadas en la degradación de la matriz extracelular, contribuyendo por tanto a un desequilibrio entre su síntesis y su degradación (Armbrust y cols., 1997).

Las células cebadas activadas producen gran cantidad de factores fibrogénicos y quimiotácticos que inducen la proliferación de los fibroblastos y la síntesis de colágeno (Welle 1997; Valent y cols., 1998). Las células cebadas, por tanto,

contribuyen a la fibrosis, remodelación y reparación tisular y se acumulan en la enfermedad inflamatoria intestinal en el ser humano, incluyendo la colitis ulcerosa, el síndrome de intestino irritable y la enfermedad de Crohn (He 2004), así como en la enteropatía hipertensiva portal en la rata (Díez-Arias y cols., 2001; Prieto y cols., 2005). Además, las células cebadas están implicadas en el desarrollo de fibrosis en patologías del cartílago articular, la piel, el pulmón, el riñón y el hígado (Armbrust y cols., 1997; Kondo y cols., 2001).

En el hígado se acumulan células cebadas en múltiples enfermedades (Farrel y cols., 1995), como son la hepatopatía alcohólica, la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la atresia biliar, la hepatolitiasis, el rechazo crónico del injerto hepático y en la colestasis biliar. Al igual que en otros órganos y tejidos, en el hígado las células cebadas deben estar implicadas en la respuesta inmune local y en el mantenimiento y la reparación del tejido conectivo (Kennelly y cols., 2011).

En el hígado, las células cebadas secretan varios mediadores que promueven el crecimiento y la proliferación de los fibroblastos y que estimulan la producción de proteínas de la matriz extracelular por los fibroblastos y las células estrelladas (Takeshita y Shibayama 2005). De hecho, existe una correlación positiva entre el grado de acumulación de células cebadas y la extensión del depósito de matriz en pacientes con hepatopatías crónicas (Farrel y cols. 1995). Incluso en la actualidad se considera que la proliferación ductular biliar, unido a la fibrosis y a la infiltración hepática por células cebadas son los cambios característicos de la hepatopatía colestásica (Takeshita y Shibayama 2005).

Se ha comprobado que la degranulación de las células cebadas está implicada en la disrupción de los complejos motores celulares secundaria a la acción de la colecistoquinina, por lo tanto, las células cebadas están activamente implicadas en el control fisiológico y patológico de la motilidad intestinal (Saavedra 2003), así como en la permeabilidad de la mucosa intestinal, en la adherencia bacteriana a la mucosa y en el inicio de la inflamación intestinal.

En el hígado colestásico se produce la infiltración por células inflamatorias (monocitos, neutrófilos, células cebadas), en parte como consecuencia de

traslocación bacteriana intestinal. Sin embargo, el origen de la respuesta inflamatoria podría estar localizada en los propios colangiocitos, que sufren tanto la hiperpresión biliar y el efecto tóxico de los ácidos biliares, como la posible isquemia secundaria a la compresión del plexo arterial peribiliar (Nakamura y cols. 1997; Gaudio y cols. 2006; Allen y cols., 2011). En éste sentido, la respuesta inflamatoria inicial en los colangiocitos estimularía su proliferación, activaría las células hepáticas que poseen capacidad proinflamatoria (células de Kupffer y macrófagos), induciría la angiogénesis secundaria a la isquemia arterial, favorecería la infiltración portal por leucocitos y, finalmente promovería la fibrogénesis.

Las células cebadas participan en el desarrollo de fibrosis hepática, tanto en roedores como en el ser humano (Armbrust y cols. 1997; Matsunaga y cols. 1999). La ligadura del colédoco en la rata, un modelo de fibrosis hepática (Kountouras y cols. 1984), cursa con un aumento de las células cebadas en el hígado (Mori y cols. 1966; Rioux y cols. 1996). Sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo por el cual las células cebadas participan en el desarrollo de fibrosis. Ya que la ligadura del colédoco en la rata produce una inflamación hepática (Ramadori y Saile, 2004a) y muchos mediadores liberados por las células cebadas son pro-inflamatorios (Galli y cols. 2005; Metz y cols. 2007; Theoharides y cols., 2012), se podría especular que la activación de las células cebadas influiría en la fibrosis hepática en el contexto de una respuesta inflamatoria crónica. En este sentido, la fibrosis asociada a la remodelación tisular, ambas mediadas por los mastocitos, podrían ser una de las principales consecuencias de la inflamación hepática crónica (Bachelet y cols. 2006; Metz y cols. 2007). Por ello, se ha sugerido que la fibrogénesis hepática se asemeja a un proceso de cicatrización (Ramadori y Saile, 2004a; Ramadori y Saile, 2004b; Aller, 2008).

Las interacciones entre las células cebadas y los fibroblastos son fundamentales en la génesis de la fibrosis (Gruber, 2003; Albrecht y cols. 2005). Las células cebadas pueden comunicarse con los fibroblastos, lo cual induce su activación y la subsiguiente modulación de algunos aspectos de la fibrosis (Albrecht y cols. 2005; Au y cols. 2007). Sin embargo, los resultados de un estudio que utilizaba ratas *Ws/Ws*, deficientes en células cebadas, sugirió que un aumento de células cebadas en el hígado podría estar asociado con fibrosis, pero que no era la

causa (Sugihara y cols., 1999). Además, las células cebadas deben participar en la fibrinolisis produciendo MMP-1 en los estadios tardíos, tanto de la fibrosis como de la cirrosis experimental (Jeong y cols., 2002). Ya que las terapias efectivas de la cirrosis hepática deben estar basadas en la comprensión de su patogenia (Friedman, 2007), un mejor conocimiento de ésta acción dual, pro- y anti-fibrogénica de las células cebadas en la fibrosis biliar experimental sería de gran interés.

Las células cebadas en el hígado fibrótico pueden además estar implicadas en la arterialización hepática ya que la estructura de los sinusoides cambia y es similar a la de los capilares (Zimmermann y cols., 1999). Este cambio se denomina “capilarización sinusoidal” y las células cebadas pueden ser elementos clave en éste proceso de transformación de las células endoteliales sinusoidales en células endoteliales de tipo capilar (Zimmermann y cols., 1999; Franceschini y cols., 2006). La capilarización altera el intercambio fisiológico entre el plasma y los hepatocitos y es la causa principal del empeoramiento de la función hepática (Zimmermann y cols., 1999).

La hiperplasia de las células cebadas se asocia con la proliferación biliar durante la colestasis extrahepática (Takeshita y Shibayama, 2005; Franceschini y cols., 2006). Este hallazgo sugiere que la acumulación de células cebadas en las tríadas portales puede estar implicado en la proliferación biliar. La recanalización del colédoco previamente ligado comporta un incremento brusco y transitorio del número de células cebadas, que se asocia con un rápido aumento del número de células epiteliales biliares apoptóticas. Así, las células cebadas intersticiales hepáticas pueden estar implicadas en la remodelación hepática mediante la inducción de apoptosis (Takeshita y Shibayama, 2005).

Por lo tanto, se podría especular que el papel de las células cebadas en la colestasis extrahepática experimental es doble, es decir, que cambia a lo largo de la evolución del hígado colestásico. En fases evolutivas precoces las células cebadas participarían en el proceso proinflamatorio que induce la proliferación biliar y la fibrogénesis (Rioux y cols., 1996). Sin embargo, la colestasis prolongada al modificar el medio ambiente induciría un cambio en el fenotipo de los mastocitos, promoviendo la fibrolisis al inducir metaloproteasas y, subsiguientemente la

degradación de la matriz (Jeong y cols., 2002). Este supuesto papel protector y antifibrótico de las células cebadas en la colestasis crónica explicaría el incremento persistente de su número durante la producción de fibrosis y/o cirrosis hepática, que se asocia con un marcado descenso de miofibroblastos y de macrófagos en las regiones periportales (Jeong y cols., 2002). Las células cebadas, debido a su localización periportal, inducirían la apoptosis del epitelio biliar reduciendo la apoptosis hepatocitaria y éste puede ser otro mecanismo por el cual las células cebadas inducen una actividad antifibrogénica, así como la preservación de los hepatocitos (Canbay y cols., 2004; Ghavami y cols., 2005).

Al corregir el imbalance epitelial producido por la colestasis entre los dos tipos de células epiteliales hepáticas, biliar (proliferación) y hepatocitario (apoptosis), los mastocitos intentarían limitar la fibrosis característica de la inflamación hepática crónica. Estas acciones protectoras pueden ser asumidas en algunas circunstancias por las células cebadas que protagonizarían entonces el control de la inflamación (Kinet, 2007). La hiperexpresión de citoquinas proinflamatorias por los colangiocitos colestásicos también podría regular tanto las alteraciones en la secreción biliar (Geier y cols., 2003) como la supervivencia de los propios colangiocitos (Wolf y Vierling 1993).

La ligadura del colédoco en la rata causa la proliferación biliar con elongación del árbol biliar, así como su ramificación (Nakanuma y cols., 1997; Masyuk y cols., 2001). A su vez, la proliferación biliar induce la proliferación vascular o angiogénesis. La vía biliar se rodea de un plexo vascular arterial que procede de las ramas de la arteria hepática (Nakamura y cols., 1997). Durante el desarrollo embrionario las células epiteliales biliares migran a través del mesénquima y se transforman en túbulos durante el estadio de formación de la vía biliar intrahepática (Roberts y cols., 1997). A su vez, el plexo vascular arterial peribiliar se desarrolla y madura en relación con el tracto biliar. Sin embargo, en tanto la vía biliar madura, el plexo vascular periarterial permanece inmaduro y continúa proliferando hasta que alcanza su madurez a lo largo de la vida postnatal (Nakamura y cols., 1997). En la colestasis extrahepática la proliferación biliar también parece preceder a la proliferación vascular (Gaudio y cols., 2006). Trás la ligadura del colédoco en la rata la proliferación de colangiocitos es un proceso rápido que consigue ocupar el

30% del total de las células hepáticas, en tanto que en el hígado normal los colangiocitos representan el 2% de la masa celular hepática (Alvaro y cols., 2006). La proliferación de colangiocitos es modificada por neuropéptidos, factores de crecimiento y hormonas. En particular, el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) protagoniza la hiperplasia ductular. VEGF-A y VEGF-C aumentan en los conductos biliares de ratas con ligadura del colédoco ya que pueden ser secretados por los colangiocitos (Gaudio y cols., 2006). Puesto que VEGF también regula la angiogénesis, parece lógico suponer que los colangiocitos proliferantes controlan, mediante la liberación de VEGF, la formación de un plexo vascular que suministre sangre para cubrir las demandas funcionales del epitelio biliar intrahepático proliferante (Gaudio y cols., 2006)

La inflamación de origen biliar también puede inducir la apoptosis de los hepatocitos. La hiperproducción de citoquinas (TNF- α) se ha asociado a la apoptosis hepatocitaria (Ding y Yin, 2004). En los síndromes colestásicos destaca la activación del factor de transcripción NF- κ B ya que las elevadas concentraciones de ácidos biliares en los hepatocitos activan NF- κ B (Miyoshi y cols., 2001; Zollner y cols., 2005). La activación de NF- κ B, a su vez, promueve la expresión de ligandos asociados a muerte celular por las células de Kupffer, como Fas y TNF, que son citotóxicos para el hígado (Nanji y cols., 1999; Ding y cols., 2004; Malhi y cols., 2006).

Las células progenitoras de células hepáticas ó células madre también podrían desempeñar un importante mecanismo en la proliferación biliar. En lesiones hepáticas por D-Galactosamina la regeneración del hígado ocurre a expensas de células epiteliales biliares, denominadas células ovas, que derivan probablemente de los canales de Hering. Ya que las células biliares que proliferan expresan α -1-fetoproteína, esta reactivación de genes fetales ha planteado la existencia de un proceso de retrodiferenciación en la colestasis (Kuhlmann y Peschke 2006).

En la colestasis extrahepática la alteración hepática predominante es la marcada proliferación ductular con una infiltración inflamatoria portal moderada y apoptosis hepatocitaria (Sánchez-Patán y cols., 2008), constituyendo un modelo

experimental de fibrosis biliar a largo plazo (Aube y cols., 2007; Sánchez-Patán y cols., 2008).

La fibrosis hepática post-ligadura del colédoco en roedores es la consecuencia de un proceso inflamatorio de origen biliar (Kerhenobich y Weissbrod, 2003; Li y Crawford, 2004). La fibrosis hepática es la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular entre las que se incluye el colágeno (Bataller y Brenner, 2005; Rockey 2006; Gressner y cols., 2007). Un concepto fundamental respecto de la etiopatogenia de la fibrosis hepática es que éste proceso representa una respuesta de cicatrización por parte del organismo frente a otra agresión que es similar a la respuesta de otros órganos a una agresión recurrente (Rockey, 2006; Aller y cols., 2008; Aller y cols., 2010c)

El estrés oxidativo y enzimático y la infiltración por células inflamatorias en la colestasis obstructiva experimental podrían estar implicados en la patogenia de la proliferación de células epiteliales biliares y en la reduplicación y ramificación de los conductos y conductillos biliares (Kilicoglu y cols., 2008). Así, se ha sugerido que el efecto hepatoprotector de la miel en ratas con ligadura del colédoco podría ser secundario a sus actividades antioxidante y anti-inflamatoria (Kilicoglu y cols., 2008).

Una intensa proliferación biliar en los espacios porta caracteriza a la colestasis extrahepática microquirúrgica a largo plazo en la rata. Los conductos biliares proliferantes invaden las zonas 1 y 2 del acino de Rapaport, pero no la zona 3 o pericentral (Aller y cols., 2004) y ésta es la razón de que sea considerada una proliferación “atípica” (Alvaro y cols., 2007).

En esencia, la respuesta fisiopatológica del hígado cuando se alteran tanto el flujo biliar (colestasis extrahepática) como portal (capilarización sinusoidal e hipertensión portal) es la atrofia del área hepática afectada y la hipertrofia del área no afectada (Black y Behrns, 2002). Histopatológicamente, el complejo atrofia-hipertrofia se caracteriza por fibrosis septal en el hígado atrófico con necrosis biliar en mosaico, apoptosis y proliferación ductular (Black y Behrus, 2002; Kilicoglu y cols. 2008).

Los colangiocitos son un epitelio biológicamente importante por los múltiples procesos celulares en los que participan, incluyendo el transporte de agua, iones y solutos (Boger y Larusso, 2007). Estas células epiteliales biliares han sido propuestas como la “diana” principal de los ácidos biliares en el hígado. Los ácidos biliares alteran significativamente la secreción, la proliferación y la supervivencia de los colangiocitos (Xia y cols., 2006). Así, los ácidos biliares pueden antagonizar la pérdida de conductillos biliares inducida por la denervación colinérgica en la rata con ligadura de colédoco (Marzioni y cols., 2006). Sin embargo, durante su intensa proliferación en colestasis obstructiva, los colangiocitos adquieren un fenotipo neuroendocrino y secretan múltiples sustancias, entre las que se incluyen neurotransmisores (serotonina) (Marzioni y cols., 2005), neuropéptidos (péptidos opioides, como met-enkefalina) (Moezi y cols., 2006; Mombeini y cols., 2006; Nelson y cols., 2006; Marzioni y cols., 2007), hormonas (prolactina) (Bogorad y cols., 2006) y sus receptores (estrógenos) (Alvaro y cols., 2007) y factores de crecimiento, como el Factor de crecimiento similar a Insulina (*Insuline-like growth factor*, IGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*; PDGF), el factor de crecimiento hepatocitario (*hepatocyte growth factor*, HGF), TGF- β y VEGF (Marzioni y cols., 2006; Alvaro y cols., 2007). La activación de células progenitoras hepáticas en el hígado colestásico es regulada por factores neuronales y neuroendocrinos que modulan la biología de los colangiocitos malignos y no-malignos (Marzioni y cols., 2006).

La activación de las células estrelladas hepáticas es un factor patogénico clave en la producción de fibrosis hepática ya que los miofibroblastos resultantes son principalmente responsables del ensamblaje del tejido conectivo (Rockey, 2006; Gressner y cols., 2007; Proell y cols., 2007). Múltiples y variados estímulos contribuyen a la inducción y el mantenimiento de la activación de las células estrelladas hepáticas, como son el estrés oxidativo, los neurotransmisores (Norepinefrina), la cascada Renina-Angiotensina, citoquinas (IL-4, IL-13), quimioquinas y factores de crecimiento, p.ej. el factor de crecimiento transformador β_1 (*transforming growth factor* β_1 ; TGF β_1) y el factor de crecimiento de tejido conectivo (*connective tissue growth factor*; CTGF) (Sedlacek y cols., 2001; Rockey, 2006; Muddu y cols., 2007; Gressner y cols. 2007; Proell y cols. 2007; Friedman,

2008; Sánchez-Patán y cols., 2008). En particular, los radicales libres de oxígeno son capaces de activar NF- κ B y así, la producción de citoquinas proinflamatorias (Aller y cols., 2004). Se establecería por tanto una relación entre estrés oxidativo, inflamación y fibrogénesis (Ramadori y Saile, 2004). Además, las células epiteliales que proliferan también son una importante fuente de CTGF en la rata con fibrosis biliar (Sedlacze y cols., 2001).

En la colestasis los ácidos biliares inducen apoptosis de los hepatocitos y se ha propuesto que dicha apoptosis facilita a su vez la activación de las células estrelladas hepáticas (Canbay y cols., 2002). Por lo tanto, en la colestasis extrahepática los ácidos biliares están implicados tanto en la proliferación biliar como en la fibrogénesis (Isayama y cols., 2006). Además, la endotoxemia presente en colestasis (Ingoldby y cols., 1984) también podría exacerbar la fibrogénesis hepática. En ratones con colestasis extrahepática, la administración de LPS favorece la fibrogénesis hepática. Esta acción fibrogénica de LPS está mediada por CD₁₄ y TLR-4 (*Toll-like receptor-4*) y es estimulada por la proteína de unión a lipopolisacárido (*lipid binding protein*; LBP) (Isayama y cols., 2006). Ratones con ligadura del colédoco y déficit de CD4 no expresan TNF- α , IFN- γ , factor inductor de macrófagos (*Macrophage induction factor*, MIF), ni TGF β , una citoquina con potente acción fibrogénica (Yang y cols., 2003; Isayama y cols., 2006). Aunque la retención de ácidos biliares por sí sola es suficiente para producir lesión hepatocelular, proliferación biliar, respuesta inflamatoria moderada y discreta fibrosis, cuando se asocia a estímulo por LPS, mediado por el receptor CD₁₄, se activan macrófagos y aumenta la síntesis de agentes oxidantes y de citoquinas y, en consecuencia, la fibrosis (Isayama y cols., 2006).

Las células estrelladas hepáticas, al ser estimuladas por PDGF, por factor de crecimiento epitelial (*epithelial growth factor*; EGF) y TGF β ₁ expresan MMP-2, que induce su migración. La migración de las células estrelladas hepáticas es dependiente de Integrinas ya que la administración de anticuerpos anti-integrinas α_1 y α_2 inhiben dicha migración (Yang y cols., 2003). Otros mediadores que activan a las células estrelladas hepáticas son neurotransmisores, como noradrenalina, que aumentan la expresión hepática de TGF- β ₁ (Oben y cols., 2004), leptina (Ikejima y cols., 2002) y

Angiotensina II, que no solo aumenta la fibrosis hepática, sino que promueve el estrés oxidativo, la inflamación y la trombogénesis (Bataller y cols., 2005). Así, las células estrelladas hepáticas son posteriormente estimuladas de forma paracrina por trombocitos, leucocitos polimorfonucleares, células cebadas y linfocitos que infiltran el hígado, pero también por células de Kupffer, células endoteliales sinusoidales y hepatocitos para diferenciarse en miofibroblastos (Szabo y cols., 2007; Gressner y cols., 2007; Sánchez-Patán y cols., 2008). Las células estrelladas hepáticas podrían también tener su origen en la médula ósea y adquirir el fenotipo miofibroblasto si está presente el medioambiente hepático estresor adecuado (Gressner y cols. 2007; Friedman, 2008).

El miofibroblasto hepático es la principal célula responsable de la promoción del depósito de colágeno fibrilar en el hígado colestásico (Bataller y Brenner, 2005; Gressner y cols., 2007). La gran plasticidad de los miofibroblastos hepáticos sugiere que incluso podrían coexistir diversos inmunofenotipos en la fibrosis biliar crónica, p.ej. portal, septal, intermedios o de transición y perisinusoidales (Cassiman y cols., 2002). La coexistencia de transición epitelio-mesenquimal del epitelio biliar o de los hepatocitos ha sido también propuesta en ésta patología (Sicklick y cols., 2006; Henderson e Iredale, 2007; Friedman, 2008). La coexpresión de marcadores de células epiteliales y mesenquimales por algunas células del hígado adulto sugiere que la existencia de transición epitelio-mesenquimal puede producirse también durante la vida post-natal. En los hígados fetales la transición epitelio-mesenquimal constituye un mecanismo implicado en el desarrollo hepático (Chagraoui y cols., 2003). Asimismo, algunos hepatocitos adultos podrían ser capaces de sufrir una transición epitelio-mesenquimal ya que progenitores epiteliales hepáticos, esto es, las células ovals, expresan conjuntamente marcadores epiteliales y mesenquimales, en tanto que las células estrelladas hepáticas pueden ser inducidas para que expresen genes que las confieren un fenotipo epitelial (Sicklick y cols., 2006). Se explicaría así que conductillos biliares proliferantes en niños con atresia biliar expresen el marcador mesenquimal α -SMA. Por lo tanto, la transición desde el fenotipo epitelial al fenotipo mesenquimal en la colestasis extrahepática constituiría un nuevo mecanismo productor de fibrosis (Zavadil y cols., 2005; Sicklick y cols., 2006).

Dada la plasticidad de las células estrelladas hepáticas y de las células del parénquima hepático (eje hepatocito-colangiocito), puede hipotetizarse que durante la evolución del hígado colestásico éstas células pueden expresar los mismos fenotipos que se suceden en la respuesta inflamatoria post-traumática (Aller y cols., 2004; Aller y cols., 2006): un fenotipo de isquemia-reperfusión (hipóxico), un fenotipo leucocitario (con respuesta pro- y anti-inflamatoria) y, por último, un fenotipo angiogénico con proliferación biliar y fibrosis.

Durante éstas fases evolutivas los colangiocitos podrían adoptar un comportamiento similar a las células tumorales con una complejidad metabólica progresiva (neuroendocrina), que se asocia a una complejidad estructural creciente. En éste supuesto, el tipo de tumor que se desarrolla sería benigno, a pesar de su importante capacidad para invadir el parénquima. Este tumor biliar “atípico” parece capaz de inducir una respuesta inflamatoria en el hígado remanente o “hígado hepatocitario del huésped”. Además, es posible que éste hígado compuesto por

hepatocitos del huésped pueda participar en el desarrollo del tumor biliar por un proceso denominado “desmoplasia”. Esto consiste en células fibroblásticas y matriz extracelular, elementos inflamatorios de respuesta inmune, representados por linfocitos, macrófagos y células dendríticas, con angiogénesis, evidenciada por los vasos sanguíneos neoformados (Mareel y Leroy , 2003). En esencia, todos los elementos que constituyen la respuesta inflamatoria participan en ésta “reacción del hígado del huésped”, que puede tener un objetivo trófico para el desarrollo del tumor colestásico biliar. La persistencia de ésta respuesta inflamatoria durante una evolución más prolongada induciría un grado más intenso de desdiferenciación tumoral (Arias y cols., 2005; Arias y cols., 2006; Arias y cols., 2007), produciendo una transformación celular maligna como ocurre en el ser humano cuando se produce un cáncer de la vía biliar o colangiocarcinoma (Marzioni y cols., 2006; Yang y cols., 2011).

6. KETOTIFÉN: UN FÁRMACO ESTABILIZADOR DE LAS CÉLULAS CEBADAS

El Fumarato de ketotifén se designa químicamente como 4-(1-metilpiperidin-4-ylideno)-4,9 dihidro-10H-benzo [4,5] ciclohepta[1,2-b] tiofén-10-1 hidrogeno(E)-butanodieno, su fórmula es $C_{19}H_{19}NOS.C_4H_4O_4$ y su masa molecular $425.5g.mol^{-1}$ (Mihun y cols., 1984; Frag y cols., 2011) (Figura 4). Ketotifen es un potente y selectivo antagonista H1 no competitivo (Martin y Roemer, 1977; Abounassif y cols., 2005) que actúa directamente sobre la membrana celular de las células cebadas estabilizando su estructura al evitar la fusión implicada en la exocitosis y, por lo tanto, previene la liberación de mediadores inmunológicos (Gilles y cols., 2003; Greiner y cols., 2003).

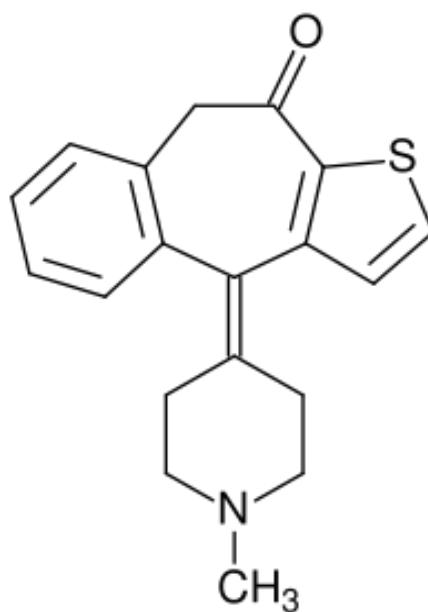


Fig 4: Fórmula estructural del fumarato de ketotifén: (4-(1-metilpiperidin-4-ylideno)-4,9 dihidro-10H-benzo [4,5] ciclohepta[1,2-b] tiofén-10-1 hidrogeno(E)-butanodieno)-(C₁₉H₁₉NOS.C₄H₄O₄)

Ketotifén es bien absorbido tras su administración oral, alcanzando sus concentraciones plasmáticas un pico a las 2-4 horas (Grant y cols., 1990). La biotransformación de ketotifen es realizada por los microsomas hepáticos utilizando cuatro rutas metabólicas en el ser humano: demetilación, N-oxidación, N-glucuronidación y cetorreducción (Le Bigot y cols., 1983; Breyer-Pfaff y cols., 2000). El aclaramiento plasmático del fármaco es bifásico, con una vida media de

eliminación de 22 horas en el ser humano adulto (Grant y cols., 1990). Sin embargo, existen diferencias de especie respecto del metabolismo de ketotifén y en la rata es metabolizado por los hepatocitos más rápidamente que en el ser humano (50 nmoles/h/10⁶ cél. vs 12 nmoles/h/10⁶ cél) (Le Bigot y cols., 1987).

Este fármaco produce mínimos efectos colaterales y su administración común por vía oral ha facilitado su uso en la clínica humana desde hace muchos años (Repchinsky y cols., 2001; Bassler y cols., 2004). Además, ketotifen puede ser seguro administrado por vía sistémica y numerosos estudios han permitido mejorar la permeabilidad cutánea de éste fármaco haciendo posible su aplicación tópica en asma y procesos alérgicos (Chiang y cols., 1998; Bhattacharya y Ghosal; 2001; Inoue y cols., 2005). Estos estudios permitieron en el futuro la aplicación local de ketotifen en el ser humano, administrándolo directamente en la zona cutánea lesionada para reducir la cicatrización excesiva, las contracturas patológicas y, en definitiva mejorar la calidad de vida de los pacientes. En particular, los hallazgos obtenidos al estudiar modelos experimentales en el cerdo permiten garantizar la realización en el futuro de estudios clínicos con ketotifen en los pacientes quemados.

Para facilitar su administración por vía intraperitoneal y evitar su rápida biodegradación, ketotifen ha sido encapsulado en microesferas de Poli(D,L-lactido) y de Poli(D,L,-lactido-co-glicólido). Después de su administración intraperitoneal las microesferas se detectan en el tejido adiposo y se comprueba la liberación eficaz de ketotifen (Guerrero y cols., 2008). El diseño de microesferas con ketotifen ha permitido utilizar con éxito esta vía de administración en la profilaxis y el tratamiento de la respuesta inflamatoria secundaria a la hipertensión portal en la rata (Sanchez-Patán y cols., 2008a; Sanchez-Patán y cols., 2008b).

Ketotifén posee una actividad citoprotectora gastrointestinal y es antiinflamatorio (Schoch, 2003; Penissi y cols. 2003) y es un fármaco profiláctico muy útil en el asma bronquial, la rinitis alérgica y otras enfermedades alérgicas. En este sentido, ketotifen ha demostrado su efectividad en la inflamación de las vías aéreas al inhibir la síntesis y liberación de quimioquinas Th1 y Th2 por monocitos tras su estimulación por LPS. Así, disminuyen la quimioquina derivada de macrófagos (*Macrophage-derived chemokine; MDC*), una quimioquina de tipo Th2

implicada en el reclutamiento de células Th2 hacia las áreas de inflamación expuestas al alérgeno, pero también las quimioquinas Th1 monoquina inducida por interferon- γ (*monokine induced by interferon-gamma*; MIG/CXCL9) y proteína-10 inducible por interferon (*interferon-inducible proteína 10*; IP-10/CXCL10). Este efecto supresor de ketotifen sobre la liberación de MDC e IP-10 está mediado, al menos en parte, por la inhibición de la expresión de de p38- y ERK-*mitogen-activated proteína kinase* (MAPK) (Hung y cols., 2007). Ketotifen ha demostrado además su capacidad para eliminar la ascitis y las adenopatías abdominales en pacientes con Síndrome Hipereosinofílico Idiopático, una patología sistémica caracterizada por la infiltración eosinofílica que suele afectar al tracto gastrointestinal (Tang y cols., 1997; Casella y cols., 2011).

Además ha demostrado su acción terapéutica en el colon irritable, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Jones, 1998; Klooker y cols., 2010; O'Sullivan, 2011; Ford y Talley, 2011), así como en diferentes modelos experimentales de colitis, reperfusión intestinal y de ileo postoperatorio (De Jonge y cols., 2004; Serra y cols., 2006; The y cols., 2009). La administración de ketotifen a ratas expuestas a la acción crónica de ovoalbúmina reduce significativamente la infiltración intestinal por células cebadas y el contenido de RMCP-II, bloqueando la hipermotilidad intestinal asociada a éste modelo de inflamación alérgica intestinal. Estos resultados avalan la relevancia de las células cebadas en la actividad motora del tracto gastrointestinal (Traver y cols., 2010). Además, ketotifen también ejerce una acción beneficiosa en la diarrea producida por el cólera, que implica la liberación de mediadores pro-inflamatorios, como citoquinas, prostaglandinas y óxido nítrico. Así se evidencia el importante papel que también tienen las células cebadas en la secreción intestinal (Rocha y cols., 2003).

Ketotifen tiene la capacidad de reducir significativamente las alteraciones de la microcirculación que se producen en la mucosa intestinal como consecuencia de la inflamación producida por la administración de fármacos como la indometacina, lo cual indica los efectos de la degranulación de las células cebadas en la patología inflamatoria intestinal (Ruh y cols, 2000)

La degranulación de las células cebadas pancreáticas tienen un importante papel en la activación de la respuesta inflamatoria local y sistémica en las fases iniciales y en la progresión de la pancreatitis aguda (Lopez-Font y cols., 2010). Por ello, la administración de fármacos estabilizadores de mastocitos, como ketotifen, en ratas con pancreatitis aguda disminuye el acúmulo de células cebadas en el páncreas, reduce el edema, la infiltración por neutrófilos, los niveles séricos de amilasa y la actividad de mieloperoxidasa. La acción protectora de ketotifen en ésta patología se atribuye al bloqueo de la degranulación de las células cebadas y, por tanto de la liberación de mediadores proinflamatorios, y a la estimulación de la síntesis de NO (Yönetçi y cols., 2001; Lopez-Font y cols., 2010)

Curiosamente, ketotifen también ejerce efectos metabólicos beneficiosos, lo cual ha permitido plantear la estabilización de las células cebadas como una nueva opción terapéutica en la obesidad y la diabetes (Wang y Shi, 2011). El tejido adiposo blanco de los pacientes obesos contiene un gran número de células cebadas y los niveles séricos de triptasa en estos pacientes son también más elevados que en sujetos normales. Por eso, la estabilización de las células cebadas con ketotifen aumenta el gasto energético, mejora la sensibilidad periférica a la insulina y reduce la ganancia de peso corporal (Wang y Shi, 2011). Igual que los macrófagos y los linfocitos T, los mastocitos son células inflamatorias que participan en la etiopatogenia de múltiples enfermedades inflamatorias, como las alteraciones cardiovasculares y los trastornos metabólicos. De hecho, en modelos experimentales se ha comprobado recientemente la participación de las células cebadas en la obesidad y la diabetes tipo 2 (Wang y Shi, 2011). Aunque los mecanismos por los que las células cebadas participan en la patobiología de éstas enfermedades metabólicas aún no se conocen completamente, la administración de fármacos estabilizadores de estas células constituyen una esperanza para estos enfermos que padecen estas patologías inflamatorias crónicas de gran prevalencia en la actualidad (Zhang y Shi, 2012; Xu y Shi, 2012).

La estabilización de las células cebadas con diversos fármacos, entre ellos ketotifen mejora la supervivencia en los pacientes con sepsis al inhibir la liberación extracelular de HMGB1 a la circulación sistémica por las células apoptóticas (Ramos y cols., 2010). En un modelo de peritonitis séptica por punción y ligadura del ciego se ha demostrado que la degranulación sistémica de las células cebadas aumenta la

mortalidad (Seeley y cols., 2011) Estos hallazgos confirman la participación de las células cebadas regulando la muerte celular en la sepsis y representa una alternativa terapéutica para la patología infecciosa en la clínica humana que podrá ser utilizada en un futuro próximo (Ramos y cols., 2010).

Por último, ketotifén ha demostrado su efectividad en diversas patologías fibróticas, como son la estenosis esofágica secundaria a quemaduras por álcalis (Yukselen y cols., 2004), en el edema sólido persistente del acné (Jungfer y cols., 1993), en la fibrosis cutánea (Walker y cols., 1990; Gallant-Behn, y cols., 2008) o la urticaria (Egan y cols., 1997), en las patologías fibróticas de la cicatrización (Kischer y Bailey 1972; Garbuzenko y cols. 2002; Gallant-Behm y cols., 2008), en la esclerodermia (Claman, 1990; Ng, 2006), en la mastocitosis sistémica (Povoa y cols., 1991), en las contracturas articulares post-traumáticas (Monument y cols., 2010; Monument y cols., 2012), en el tratamiento de la infertilidad masculina (Oliva y cols., 2006) y en el tratamiento del asma (Schwarzer y cols., 2004) o de los procesos inflamatorios de la conjuntiva (Kidd y cols., 2003; Woerly y cols., 2003). La hiperplasia de células cebadas es un hallazgo muy común en el tejido fibroso y en patologías fibróticas, tanto sistémicas, como la artritis reumatoide, la fibrosis pulmonar y la fibrosis hepática, como cutáneas (queloides, cicatrices hipertróficas, fibroproliferativas y retráctiles (Lee y Vijayasingam; 1995; Harunari y cols., 2005).

Las células cebadas sintetizan gran cantidad de mediadores profibróticos, como proteasas, factores de crecimiento y citoquinas, muchas de las cuales ejercen efectos mitogénicos sobre los fibroblastos y los miofibroblastos. Además, las células cebadas estimulan la proliferación y la contractilidad de los fibroblastos, así como la síntesis de colágeno, la contracción de las heridas y la remodelación tisular (Kischer y Bailey 1972; Skold y cols. 2001; Garbuzenko y cols. 2002; Moyer y cols. 2004; Iba y cols. 2004). En particular, las células cebadas se localizan en íntima relación con los fibroblastos, miofibroblasto y con neuronas sensitivas en la piel, lo cual permite sugerir la implicación de éstas células en neuroinflamación (Alving y cols, 1991; Hart y cols., 2005)

La estabilización de las células cebadas con ketotifen parece afectar al hipotético “eje neural-celula cebada-miofibroblasto” y, subsiguientemente a la

expresión del fenotipo hipercontractil, al modular la composición del medioambiente durante la cicatrización cutánea y articular (Hildebrand y cols 2007; Gallant-Behn y cols., 2008). Estas evidencias experimentales han permitido proponer la implicación de éste eje en procesos patológicos en múltiples tejidos asociados con excesiva contracción y depósito de matriz extracelular, así como sugerir la administración de ketotifen como profilaxis y tratamiento para reducir la contracción excesiva de la cicatriz, así como la fibrosis en la clínica humana (Gallant-Behn y cols., 2008).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El desarrollo de fibrosis hepáticas en múltiples hepatopatías crónicas de etiología diversa es un proceso multifuncional, mediado por células inflamatorias que, al liberar mediadores fibrogénicos, activan a las células estrelladas y a los miofibroblastos. Estas células intrahepáticas se activan y proliferan precozmente (5 días) tras la ligadura del colédoco en la rata, en tanto que a las tres semanas de evolución postoperatoria, cuando la fibrosis hepática es muy intensa, se produce una marcada hiperplasia y degranulación de células cebadas en el hígado. En este período evolutivo, las células inflamatorias que infiltran el área esplácnica y las células cebadas, que infiltran los tractos portales, liberan múltiples mediadores pro-inflamatorios y profibrogénicos que agravan las respuestas inflamatorias esplácnica y sistémica, así como la transformación fibrótica en la cirrosis biliar.

La administración del fármaco anti-inflamatorio ketotifén antes de la intervención quirúrgica (24 horas previas) y durante el postoperatorio, cuando la fibrosis hepática está completamente establecida, al inhibir la degranulación de las células cebadas que infiltran el hígado, disminuiría la liberación esplácnica y hepática de mediadores inflamatorios y profibrogénicos y conseguiría reducir y/o revertir la fibrosis biliar secundaria a colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata.

OBJETIVOS

1. En un modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica se pretende demostrar el efecto beneficioso aportado por el tratamiento con ketotifen, un fármaco antiinflamatorio estabilizador de células cebadas.
2. El tratamiento con ketotifen en dicho modelo experimental reduciría la insuficiencia hepática, el grado de hipertensión portal así como las alteraciones macroscópicas espláncicas entre las que destacan la ascitis.
3. El tratamiento con ketotifen reduciría la concentración espláncica de mediadores proinflamatorios vinculados a una respuesta de tipo Th2 y esta sería la causa de la disminución de las complicaciones secundarias a la colestasis extrahepática.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.A. ANIMALES

Se utilizaron 61 ratas macho adultas de la cepa Wistar procedentes de las instalaciones homologadas para la cría de animales de experimentación que posee Harlan Interfauna Ibérica S.L. Sant Feliu de Codines (Barcelona). Todos los ejemplares cumplían los requisitos de salud para animales de experimentación recomendados por la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)*, con pesos corporales comprendidos entre 215 y 335 gramos ($260,934 \pm 38,754$ g). Para su estudio, el total de animales se dividió en cuatro grupos:

Serie I:

- **Grupo PSO (n=15):** Animales pseudo-operados en los que se realiza laparotomía media y disección de la vía biliar extrahepática y que se sacrifican entre las ocho y las nueve semanas de la intervención.
- **Grupo CMQ (n=16):** Animales con colestasis extrahepática microquirúrgica, que consiste en la resección individualizada de los conductos biliares que drenan los cuatro lóbulos que constituyen el hígado de la rata, en continuidad con el colédoco hasta el inicio de su porción intrapancreática y que se sacrifican entre las ocho y las nueve semanas de la intervención.

Serie II:

- **Grupo PSO+K (n=13):** Animales pseudo-operados en los que se realiza laparotomía media y disección de la vía biliar extrahepática y que se

sacrifican entre las ocho y las nueve semanas de la intervención. A éstos animales se les administra por vía oral ketotifen (10mg/kg/día).

- **Grupo CMQ+K (n=17):** Animales con colestasis extrahepática microquirúrgica, que se sacrifican entre las ocho y las nueve semanas y a los que se administra por vía oral ketotifen (10mg/kg/día)

1.B. INSTALACIONES

1.B.1. Animalario

El transporte desde el proveedor se realizó en las condiciones establecidas según la normativa vigente sobre comercio, sanidad y bienestar animal, es decir en un medio adecuado y en contenedores homologados.

La estabulación se efectuó en una sala acreditada para tal fin en el animalario que la Universidad Complutense de Madrid (UCM) posee en la Facultad de Medicina. Dicho animalario es un centro de asistencia a la investigación con registro nº 28079-15 ABC-M en la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la Comunidad Autónoma de Madrid que cumple con los requerimientos legislativos relativos a la experimentación animal (R.D. 1201/2005).

El animalario de la UCM cuenta con instalaciones óptimas homologadas para la cría, mantenimiento y cuarentena de animales de experimentación, así como también con instalaciones propias para la investigación, quirófanos y laboratorios anejos para la manipulación y toma de muestras y alojamiento de roedores durante el postoperatorio.

Los animales se mantuvieron en grupos de cuatro dentro de cajas de Plexiglas de 42x65x15 cm (Letica, España) móviles con lecho de viruta (Panlab S.L. Barcelona).

1.B.2. Unidad de Microcirugía

La técnica quirúrgica en la que se fundamenta el modelo se realizó en la Unidad de Microcirugía de la Facultad de Medicina de la UCM, en una sala que dispone de:

- Mesa de trabajo de 80 x 100 cm y sillas.
- Sillas ergonómicas ajustables en altura.
- Refrigerador para conservación de los fármacos anestésicos.
- Lámpara fase de brazo doble adaptable, con una bombilla de 100 watos Osram Concentra.
- Centrífuga refrigerada superspeed Du Pont Instrument (GIRALT Sorval® RC-5B).
- Balanza precisión para pesado de los animales Jadever LPW-1260 nº certificado PM-245/04 (Jadever Scale Co.LTD, Taiwan).
- Arcón congelador Koxka a -80 °C.
- Microscopio operatorio Carl Zeiss OPMI 1-DFC nº serie 211069.
- Contenedores desechables de residuos biológicos cortantes y punzantes.

1.B.3. Sala de sacrificio y procesado de muestras

Dispone de los siguientes elementos:

- Mesa de trabajo.
- Sillas ergonómicas ajustables en altura.
- Lámpara halógena de brazo con bombilla de 60 W.
- Contenedor hermético con bolsa para residuos biológicos.
- Contenedores desechables de residuos biológicos cortantes y punzantes.
- Centrífuga.
- Contenedor de nitrógeno líquido.
- Elementos de protección individual: guantes y gafas.
- Recipiente para inmersión de muestras en nitrógeno líquido.
- Pinza para inmersión de las muestras.

1.B.4. Área de conservación de muestras

Se realizó en un espacio habilitado para ese fin en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid en un congelador que conserva las muestras a -80°C .

1.B.5. Eliminación de residuos biológicos

Los residuos biológicos se almacenaron en espera de su eliminación en un área especial que dispone de un congelador tipo arcón modelo ZCF320L/2 Zanussi (Electrolux Home Products España, S.A. Madrid). La eliminación y destrucción de los residuos biológicos fue llevada a cabo por la empresa CONSENUR SL.

1.C. FÁRMACOS

1.C.1 Anestésicos

- Ketamina (Imalgene®1000 . Laboratorios Merial, S.A.).
- Xilacina (Rompun® solución 2% . Bayer HealthCare).

1.C.2. Ketotifen

- Ketotifen: fumarato de (4-(1-metil-4-piperidileno)-4*H*-benzo[4,5]ciclohepta[1,2-*b*]tiofen-10(9*H*)-uno (Sigma Chemicals, St Louis, USA)

1.C.3. Otros fármacos

- Ceftriaxona (D.C.I.) (sódica), 500 mg. (Ceftriaxona Normon 500mg EFG Lab. Normon S.A. Madrid).

- Fitomenadiona, vit. K 1 ampollas 1,0 ml con 10 mg (Konakion ® mm Roche Farma, S.A. Madrid).
- Buprenorfina (Buprex®).

1.D. MATERIAL

1.D.1. Instrumental quirúrgico

1.D.1.A Pinzas

- Clamp de paños BACKHAUS de 13.3 cm (2)
- Disección con dientes de 13cm (1)
- Disección de Adson con dientes de 12cm (1)
- HALSTED mosquito curva sin dientes de 12.7 cm (2)
- HALSTED mosquito recta sin dientes de 12.7 cm (2)
- Pinza de Heiss recta (1)
- Pinza de Heiss curva (1)
- Pinza de microcirugía recta de 10.5 cm. (1)
- Pinza de microcirugía curva de 10,5 cm.(1)

1.D.1.B Porta-agujas Mayo-Hegar de 12,7 cm. (1)

1.D.1.C Tijeras

- De Metzenbaum curva de 14 cm (1)
- De Mayo recta de 14cm (1)
- Tijera de microcirugía recta de 15 cm. (1)

1.D.2. Material de sutura y ligadura

- Seda trenzada como ligadura 3/0 Silkam®. B. Braun España.
- Seda negra trenzada como ligadura 7/0 Silkam®. B. Braun España.
- Sutura de VICRYL (poliglactina 910) aguja curva 3/0. Ethicon Inc.
- Sutura de seda negra trenzada aguja curva de 4 /0 Silkam®. B. Braun España.

1.D.3. Material quirúrgico complementario

- Paños quirúrgicos.
- Guantes de exploración de látex natural sin polvo. Talla 7 ¹/₂ (King™ Amebil S.A. Vizcaya. España)
- Guantes quirúrgicos de látex natural con polvo (estériles). Talla 7 ¹/₂ (Medi-Grip® Plus. Ansell Ltd. UK)
- Gasas de 10 × 10cm . (Envase de 10 unidades Texpol® .Manresa. España)
- Torundas de algodón pequeñas montadas (Algodones del Bages,S.A. Barcelona. España)

1.D.4. Otros materiales para el procedimiento operatorio y la extracción de muestras

- Guantes de protección frente a mordedura de animales
- Bloque de plastilina de 10 × 2 × 3 cm
- Jeringas de 10, 5 y 2 ml BD Discardit™ II (Becton Dickinson S.A. Fraga. Huesca. España)
- Agujas de tipo Luer 20G 0,91×25,4 mm (monoject magellan Safety Needle . Tyco Healthcare Group LP.USA)
- Agujas de tipo Luer 21G 0,82×38,1 mm (monoject magellan

- Safety Needle . Tyco Healthcare Group LP.USA)
- Aguja de tipo Luer 25G 0,51×15,8 mm (monoject magellan Safety Needle . Tyco Healthcare Group LP.USA)
- Hoja de bisturí de acero estériles del nº 11 (Albion Surgical Limited Sheffield. England)
- Solución Salina isotónica: ClNa, 0.9 g/100ml. Envase 10 ml B.Braun.
- Contenedor cilíndrico de polietileno para residuos biológicos marca Consenur de 30 litros fabricado según norma DIN-30739.
- Contenedor de polipropileno para residuos biológicos punzantes y cortantes marca Biocompact 1,8 litros (Sanipick Plastic SA. Madrid)
- Bolsas de plástico de 15 litros para residuos biológicos
- Recipiente de acero inoxidable para transporte de nitrógeno líquido Airliquide GT 2 (Airliquide España)
- Guantes de protección frente frío Midera 10

1.D.5. Material de laboratorio

- Pipetas Pasteur de 1 ml.
- Micropipetas JENCONS automáticas variables de 0.5-10 µl, 5-50 µl, 200-1000 µl (Labsystem) y puntas de pipetas desechables (Labcenter)
- Tubos de centrifuga 10ml (BD Vacutainer™. BD Vacutainer Systems. Plymouth. UK).
- Microtubos para muestras de suero (Eppendorf Ibérica, S.L. Madrid).
- Tubos de polipropileno de 50 ml para muestras de tejido (BD Falcon™ NY USA).

1.E. EQUIPOS DE LABORATORIO

1.E.1 Procesado de muestras

- Centrífuga angular Nahita modelos 2610 ref. 2610000 OF.
- Balanza analítica de precisión AB 204 Mettler Toledo nº serie:1113043273 (Mettler-Toledo S.A.E. L'Hospitalet de Llobregat Barcelona).

1.E.2 Estudio bioquímico en suero

- Autoanalizador Olympus AU400 nº serie 311267. Olympus Optical España S.A.

1.E.3 Estudio de proteínas de fase aguda en sangre

- Lector de placas ELISA EMS Reader MF V2.9-0

1.E.4 Determinación de los niveles de mediadores inflamatorios en hígado, ileon y ganglios linfáticos mesentéricos

- Homogeneizador eléctrico Polyton. (Brinkmann Instruments, Inc. Westminster, NY. USA).
- Sonicador.
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro.

1.E.5 Laboratorio de anatomía patológica

El procesado de las muestras histológicas y su posterior estudio microscópico se efectuó en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Carlos III de Madrid (INSALUD). Este Centro cuenta con:

1. Laboratorio general:

- Mesa de tallado de órganos con aspiración.
- Procesador automático de tejidos con vacío.
- Estación de trabajo para inclusión.
- Teñidor automático.
- Montador automático de cubreobjetos.
- Criocentrífuga.
- Microtomos motorizados.
- Baños de flotación.
- Criostato.
- Balanzas de precisión.
- Congeladores de -20°C.
- Estufas de incubación.
- Estufas de secado.
- Vórtex.
- Agitador orbital.
- Agitadores magnéticos.
- Microscopios ópticos convencionales.
- Fotomicroscopio.
- Microscopio de fluorescencia.
- Cabina de extracción de gases.

2. Laboratorio de inmunohistoquímica:

- Inmunoteñidor automático.
- Estación de trabajo para técnicas de inmunohistoquímica de tecnología capilar.

- Incubador con termostato 20-56°C.
- Placa calefactora 30-200°C.
- Estufas de incubación.

3. Laboratorio de análisis de imagen con dos sistemas de análisis de imagen:

- a.**
 1. Microscopio motorizado Leica CTR-5000 con epifluorescencia.
 2. Cámara digital Leica DC-300.
 3. Cámara digital Leica DC-350F.

 4. Software Leica Qwin V3.
 5. Impresora HP Photosmart 7960.

- b.**
 1. Microscopio Nikon Labophot 2 con epifluorescencia
 2. Cámara de vídeo b/n Hitachi KP-140.
 3. Cámara de vídeo color Hitachi KP-C503.
 4. Software MIP4 de C.I.D.
 5. Impresora laser Epson EPL-6100.

4. Equipamiento común:

- Cámara fotográfica digital Nikon Coolpix 950.
- Videoimpresora Mitsubishi.
- Videocopiadora Polaroid.
- Sistema macro para fotografía.

1.F. REACTIVOS DE LABORATORIO

1.F.1 Estudios bioquímicos en suero

- **Bilirrubina total y directa:**

- *Total Bilirrubin Olympus System Reagent y Direct Bilirrubin Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR 6111 y OSR 6112).
- *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **Fosfatasa alcalina (ALP)**

- *ALP Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6104).
- *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).???

- **Acidos biliares**

- *Acidos biliares* : Kit de método enzimático colorimétrico de ácidos biliares (Randox Laboratories Ltd. United Kingdom Cat.No.BI3863)

- **Aspartato aminotransferasa (AST)**

- *AST Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6109).
- *Pyridoxal phosphate liquid (P5P)* (Olympus Irlanda ref. 60106).
- *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **Alanina aminotransferasa (ALT)**

- *ALT Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. SR6107).
- *Pyridoxal phosphate liquid (P5P)* (Olympus Irlanda ref. 60106).

- *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **γ - glutamiltransferasa (GGT)**
 - *GGT Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6120).
 - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300)

- **Lactato deshidrogenasa (LDH)**
 - *LDH Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6126).
 - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **Proteínas totales**
 - *Tot Proteins Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. 80016)
 - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300)

- **Albúmina**
 - *Albumin Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6102).
 - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **Urea**
 - *Urea Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6134).
 - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **Creatinina**

- *Creatinin Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6178).
- *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).

1.F.2. Concentraciones séricas de lípidos y lipoproteínas

- **TGC**

- *Kit* comercial proveniente de la firma Randox, Crumlin, Reino Unido.

- **Acidos grasos libres (NEFA's)**

- *Kit* comercial proveniente de la firma Randox, Crumlin, Reino Unido.

- **Colesterol Total**

- *Kit* comercial proveniente de la firma Randox, Crumlin, Reino Unido.

- **HDL-c**

- *Kit* comercial proveniente de la firma Randox, Crumlin, Reino Unido.

- **LDL-c**

- *Kit* comercial proveniente de la firma Randox, Crumlin, Reino Unido.

- **VLDL-c**

- *Kit* comercial proveniente de la firma Randox, Crumlin, Reino Unido.

1.F.3. TGF- β_1 en sangre.

- *Kit comercial* Transforming growth factor β_1 *ELISA*. IBL International GMBH.

1.F.4. Niveles de Péptido relacionado con el gen de la Calcitonina (*Calcitonin gen related peptide*, CGRP) e IL-13 en líquido ascítico:

- Péptido relacionado con el gen de la Calcitonina (CGRP)

- Rat CGRP Enzyme Immunoassay Kit (ELISA)
(SPI Bio, Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France)

- Interleuquina 13 (IL-13)

- Rat IL-13 Enzyme Immunoassay Kit (ELISA)
(Biosource, Invitrogen S.A., Barcelona, Spain).

1.F.5. Niveles de citoquinas en hígado, íleon y ganglios linfáticos mesentéricos:

- Tampón de lisis que contiene 1 mmol/l de fenilmetilsulfonil flúor (PMSF; Sigma Chemical Company), y 1 μ g/ml de pepstatina A (Sigma Chemical Company), aprotinina (Sigma Chemical Company), antipaína (Sigma Chemical Company) y leuceptina, en tampón fosfato a pH 7,2 (Biofluids, Rockville, Md.) conteniendo un 0,05% de azida sódica (Sigma Chemical Company).
- *Enzyme Linked-Immuno-Sorbent-Assay* (ELISA) kits para Catalasa, glutatión transferasa, glutatión peroxidasa, TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-13, IL-17A, *Monocyte Chemoattractant Protein* (MCP-1), Factor de Crecimiento transformador beta 1 (*Transforming Growth Factor* β_1 ; TGF- β_1) y Factor de

crecimiento de endotelio vascular (Vascular endothelial growth factor; VEGF) (DIACLONE SAS, Besançon, Francia).

1.F.6. Reactivos para estudio histológico

- Fijación

- Formol tamponado al 10%

- Inclusión

- Agua destilada
- Alcohol etílico (70°,96°,100°)
- Xilol
- Parafina

- Tinción de Hematoxilina-Eosina

- Hematoxilina de Harris
 - Agua destilada 400ml
 - Glicerina 100ml
 - Iodato potásico 0,1ml
 - Sulfato alumínico potásico 20g.
 - Hematoxilina 0,5g.
- Eosina 1g.
- Agua destilada 100ml

- Tinción de Rojo-Sirio

- Solución Picro-RojoSirio 0,1% (Swet et al. 1964):
 - Pícrico acuoso saturado 250ml
 - Rojo-Sirio F3B 0,5 g.

- Solución Picro-Fast green
 - Pírico acuoso saturado 250ml
 - Fast green 0,5 g.
- Agua destilada

2. MÉTODOS

2.A. CONDICIONES DE ESTABULACIÓN Y UTILIZACIÓN DE LOS ANIMALES

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la legislación vigente en nuestro país sobre el cuidado y la utilización de animales de laboratorio, por la cual España adopta la normativa de la Unión Europea de 1996 sobre el uso de animales con fines científicos. Se ha incorporado a nuestro ordenamiento legal con fecha de 10 de Octubre de 2005 en el R.D. 1201/2005, sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos (B.O.E.nº 252, viernes 21-10-2005) (Aller et al. 2009a).

Los animales se mantuvieron en cajas de policarbonato (42 x 65 x 15 cm, Leticia. España) móviles con lecho de viruta (Panlab S.L. Barcelona), en condiciones estables de luz y oscuridad, distribuidos en ciclos de 12 horas (de 8 a 20 horas y de 20 a 8 horas respectivamente), a una temperatura ambiente de 22 ± 2 °C y con una humedad relativa de 65-70 %. Un sistema de aire acondicionado garantizó la renovación y la climatización del aire. Se alimentaron con una dieta sólida estándar para roedores de laboratorio (rata AO4 dieta de mantenimiento: 17,6% proteínas, 43,3% almidón 2,5% lípidos, Panlab, España) y agua *ad libitum*) (Aller et al. 2009a).

2.B. DISEÑO EXPERIMENTAL

Las ratas fueron agrupadas aleatoriamente para su estudio en los siguientes grupos :

Serie I:

Animales a los que no se les administra el fármaco en el agua de bebida.

- **Grupo PSO (n=15):** Animales pseudo-operados a los que se realiza laparotomía media y disección de la vía biliar extrahepática y que se sacrifican entre las ocho y las nueve semanas de la intervención.(Figura 5)
- **Grupo CMQ (n=20):** Animales con colestasis extrahepática microquirúrgica, que consiste en la resección individualizada de los conductos biliares que drenan los cuatro lóbulos que constituyen el hígado de la rata, en continuidad con el colédoco hasta el inicio de su porción intrapancreática y que se sacrifican entre las ocho y las nueve semanas del postoperatorio. (Figura 5)

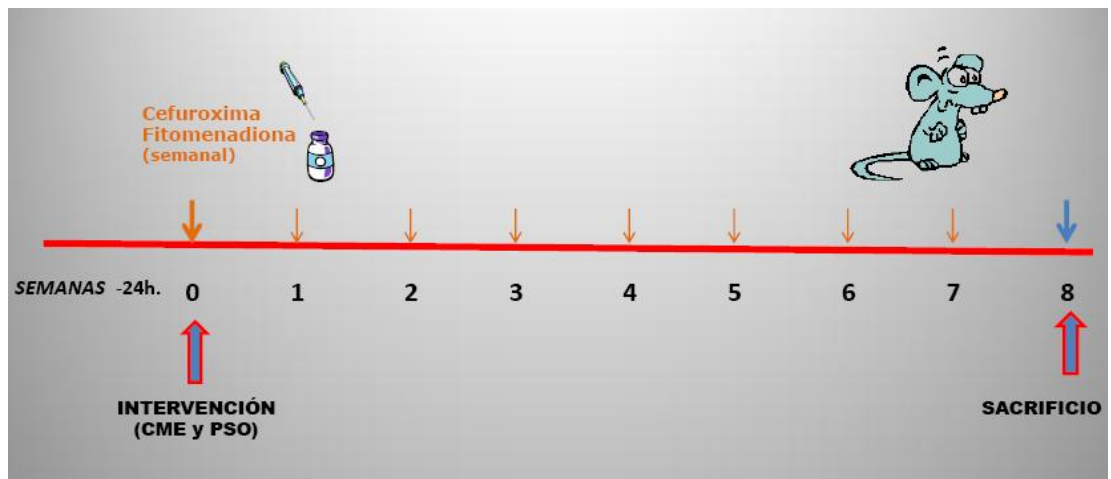


Figura 5: Esquema cronológico de los pasos a los que se somete a las ratas pseudo-operadas (PSO) y con colestasis microquirúrgica (CMQ) a lo largo de las ocho semanas de duración del modelo experimental.

Serie II:

Animales a los que se administra fármaco (ketotifén) disuelto en el agua de bebida desde las 24 horas previas a la intervención y durante todo el período postoperatorio hasta el sacrificio.

Independientemente del método anestésico elegido por cada grupo de investigación, debe conseguir suficiente relajación muscular para que la cirugía pueda ser realizada

fácilmente, debe bloquear la actividad refleja para impedir la activación del Sistema Nervioso Autónomo y, por lo tanto alteraciones de la frecuencia y el ritmo cardíaco y, lo más importante, la técnica anestésica debe procurar un grado suficiente de pérdida de conciencia por hipnosis que, unido a la analgesia, impida que el animal sufra dolor. En definitiva, el objetivo fundamental de la anestesia es causar a los animales de experimentación el mínimo distrés físico y psicológico asociado a la cirugía experimental (Aller y Nava, 2009).

Entre los múltiples métodos de anestesia descritos en la rata los fundamentales son los que utilizan la vía inhalatoria o la parenteral. Respecto de ésta última vía, en la última década se ha generalizado en roedores la administración de combinaciones de fármacos y, en particular la asociación del anestésico disociativo ketamina con el analgésico alfa-2 agonista xilacina para aquellas intervenciones quirúrgicas de duración media (de 10 a 60 minutos) en las que se precisa un plano de anestesia quirúrgica profunda (Aller y Nava, 2009). Por éstas razones en el presente trabajo la inducción y el mantenimiento anestésico se realizaron mediante la administración intraperitoneal de una mezcla de ketamina (80 mg/Kg) y Xilacina (12 mg/Kg).

2. D . TÉCNICA QUIRÚRGICA DE PSEUDO-OPERACIÓN

Con la rata en decubito supino se realiza una laparotomía media xifopubiana, las asas intestinales se cubren con una gasa humedecida en solución salina isotónica (0.9%) , y son desplazadas hacia el lado izquierdo del animal. A continuación y, tras colocar un bloque de plastilina en la zona dorsolumbar, se secciona el ligamento falciforme, situado entre los lóbulos hepáticos lateral izquierdo y caudado, y posteriormente los ligamentos triangulares izquierdo y derecho. (Figura 7)



Figura 7: Laparotomía media y sección del ligamento falciforme

Las maniobras anteriores permiten una exposición adecuada del hilio hepático y la tracción ligera del duodeno hacia el lado izquierdo permite visualizar la vía biliar, que es la estructura hiliar más superficial en la rata (Lorente y cols. 2009). Tras disecar el colédoco, se introduce el intestino en la cavidad peritoneal, y la pared abdominal se cierra en 2 planos: peritoneo, músculo y aponeurosis mediante sutura continua reabsorbible Vycril[®] (polyglactin 910) de 4/0, y piel con sutura continua de seda de 4/0.

2. E. TÉCNICA DE COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA EXTRAHEPÁTICA

El parénquima hepático en la rata está constituido por cuatro lóbulos: lateral derecho (LLD), medio (LM), lateral izquierdo (LLI) y caudado (LC) y cada uno de ellos posee una vascularización portal y arterial y un drenaje venoso y biliar independientes (Lorente y cols. 2009)(Figura 8). Esta característica anatómica permite reseca los conductos biliares que drenan cada lóbulo hepático en continuidad con el colédoco mediante la utilización de una técnica microquirúrgica (Aller y cols. 1993; Aller y cols, 2009b)

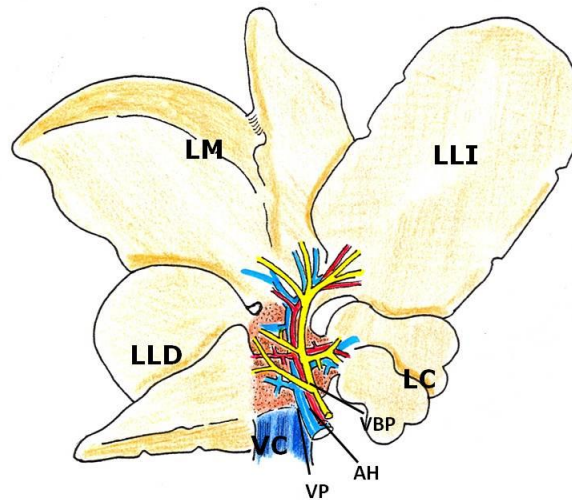


Figura 8: Representación del hígado de ratona con sus cuatro lóbulos y su vascularización. LM: Lóbulo Medio. LLI: Lóbulo Lateral Izquierdo. LLD: Lóbulo Lateral Derecho. LC: Lóbulo Caudado. VC: Vena Cava. VP: Vena Porta. AH: Arteria Hepática. VBP: Vía Biliar Principal.

Tras anestesia mediante intraperitoneal de ketamina (80mg /Kg) y xilacina (12 mg/Kg), con el animal en decúbito supino, se realizó una laparotomía media xifopubiana y se seccionó el ligamento falciforme.(Figura 9)

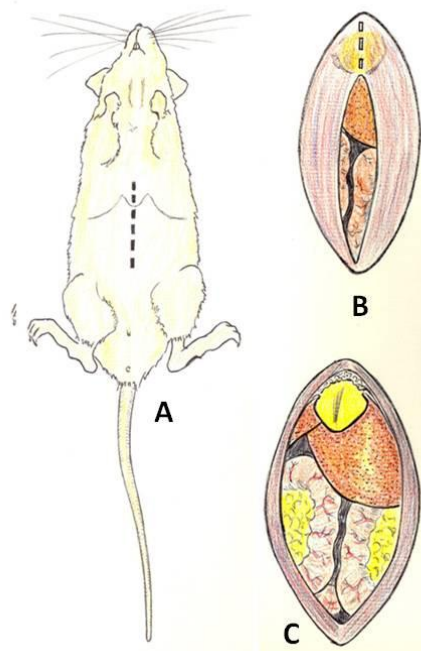


Figura 9: A: Laparotomía xifo-pubiana. B y C Apertura laparotómica con exposición del apéndice xifoideo, hígado y asas intestinales.

III-MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se extrajeron las asas intestinales, desplazándolas hacia el lado izquierdo del animal y se protegieron con una gasa humedecida en solución salina isotónica (0.9%). Después de colocar un bloque de plastilina en la zona dorso-lumbar los lóbulos hepáticos superiores se evertieron sobre el tórax y también se cubrieron con una gasa empapada en suero salino. Estas maniobras permitieron una correcta exposición de la totalidad de la vía biliar extrahepática. A continuación se seccionan el ligamento falciforme (situado entre el LLI y el LC), y posteriormente los ligamentos triangulares izquierdo y derecho.(Figura 10)

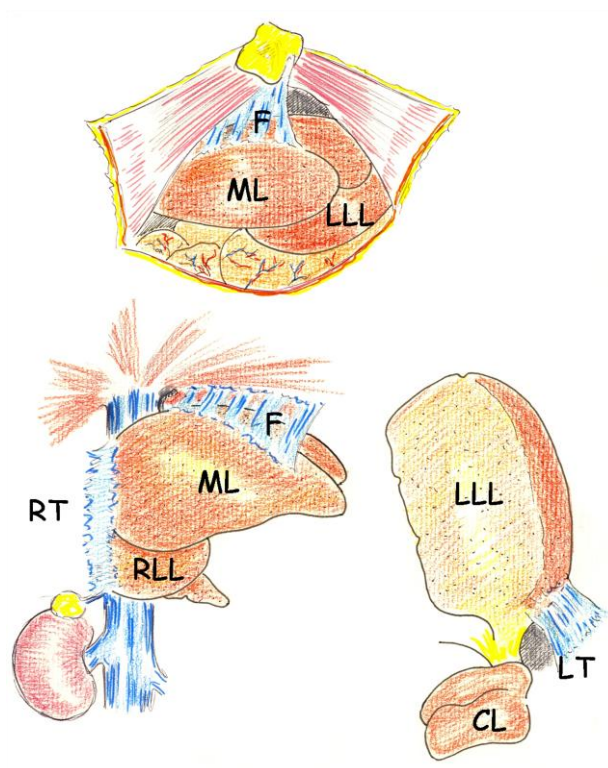


Figura 10: Exposición de los diferentes lóbulos hepáticos de la ratona. F: Ligamento falciforme. ML: Lóbulo medio. LLL: Lóbulo lateral izquierdo. RLL: Lóbulo lateral derecho. RT: Ligamento triangular derecho.

Para las siguientes fases de la intervención es necesario utilizar un microscopio operatorio binocular como medio de magnificación (Aller y Arias, 2009)(Figura 11), ya que la disección y sección de los conductos biliares de los cuatro lóbulos hepáticos debe ser realizada sin lesionar la vascularización portal o arterial de estos lóbulos.

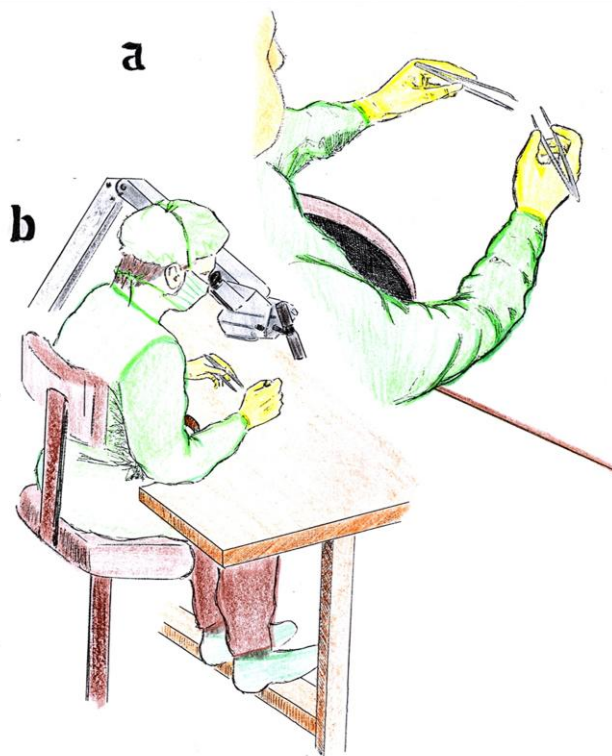


Figura 11: a: Técnica de manejo de las pinzas de microcirugía. B: Técnica de utilización del microscopio binocular.

La tracción del duodeno hacia la izquierda del animal permite visualizar el colédoco, que se liga y se secciona proximalmente al inicio de su porción intrapancreática(Figura 12A). Esta maniobra, al producir dilatación de la vía biliar extrahepática, facilita la identificación y posterior disección del colédoco y de los conductos biliares procedentes de los cuatro lóbulos hepáticos que constituyen el hígado de la rata. El colédoco, una vez seccionado, se desplaza proximalmente y se disecciona hasta el origen de los conductos biliares propios del LLD y del LC.(Figura 12B)

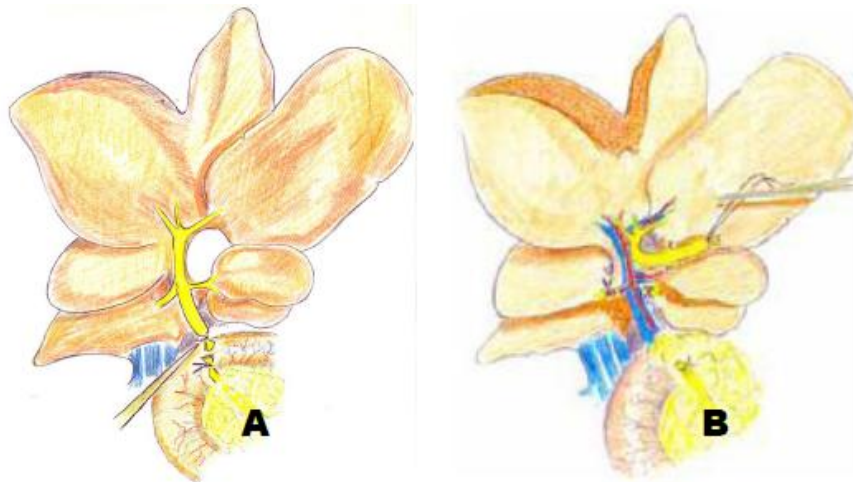


Figura 12: A: Ligadura y sección distal de la vía biliar principal. B: Separación de la vía biliar principal y disección craneal tras la sección distal.

Después de disecar el conducto biliar del LC y de identificar la rama de la arteria hepática de este lóbulo, se liga y se secciona el conducto biliar lo más próximo posible de su salida del parénquima hepático(Figura 13). La disección, ligadura y sección del conducto biliar del LLD se realiza de igual forma.

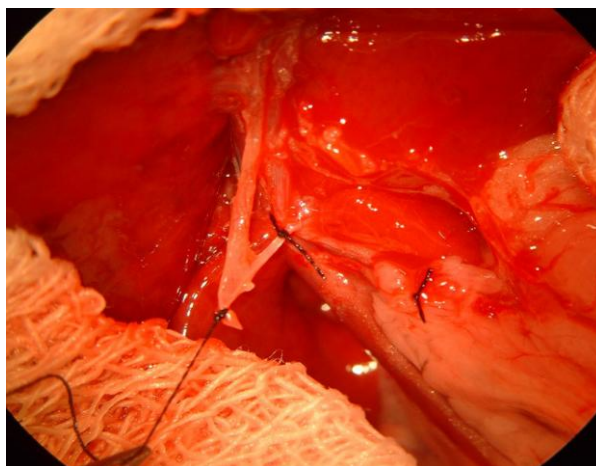


Figura 13: Tracción del colédoco y ligadura de los conductos biliares procedentes del lóbulo caudado(LC).

Se continúa la disección del colédoco en sentido craneal, liberándolo del tejido graso y de las adherencias peritoneales, e individualizándolo de la arteria hepática, y de la vena porta hasta los conductos biliares procedentes del lóbulo medio (LM)(Figuras 14 y 15).

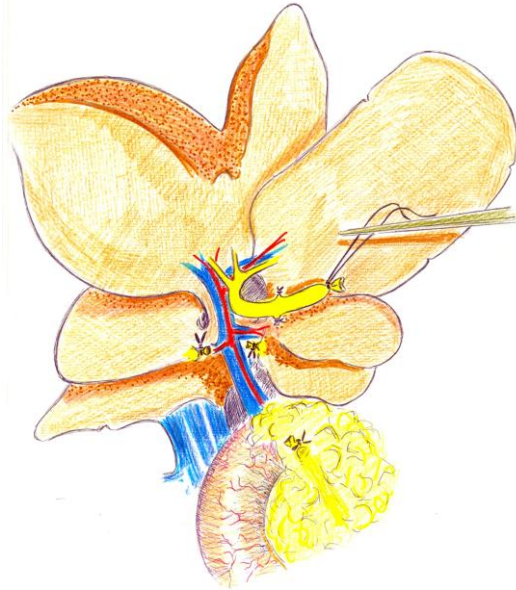


Figura 14: Tracción del colédoco y ligadura de los conductos biliares procedentes del lóbulo caudado(LC) y lóbulo lateral derecho(LLD) con exposición de la arteria y venas hepáticas.

Estos últimos se disecan y se ligan independientemente. Por último, se disecciona, se liga y se secciona el conducto biliar del LLI (Aller y cols. 1993; Aller y cols, 2009b)(Figura 16)

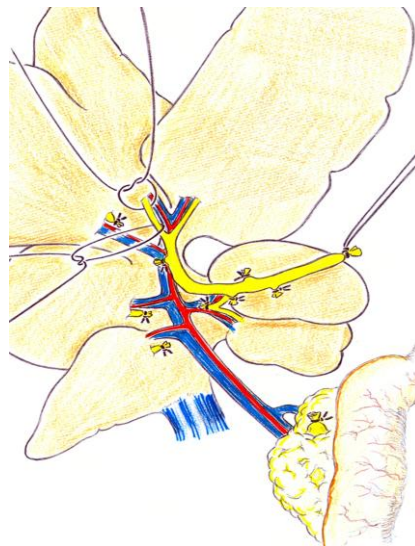


Figura 15: Aspectos del hilio hepático de la rata tras la sección microquirúrgica de los ductos biliares que drenan a los cuatro lóbulos hepáticos en continuidad con el conducto biliar principal.

Previa comprobación de la integridad de la vascularización portal y arterial de los lóbulos hepáticos, así como de la inexistencia de sangrado procedente de alguna lesión inadvertida del parénquima hepático, se reintegran las asas intestinales

al interior de la cavidad abdominal y se procede al cierre del plano peritoneo-músculo-aponeurótico con continua reabsorbible vycril[®] (polyglactin 910) de 4/0, y de la piel con sutura continua de seda de 4/0.

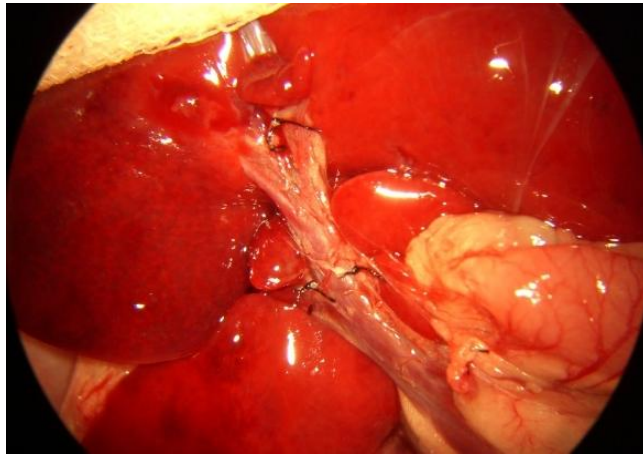


Figura 16: Exposición del hilio hepático apreciando la arteria hepática y la vena porta tras la extirpación de la vía biliar principal y de los ductos lobares.

2. F. MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO POSTOPERATORIO

Una vez finalizada la intervención las ratas se colocaron en una caja de policarbonato (42 x 65 x 15 cm, Leticia. España) sobre un lecho de viruta especial para roedores de laboratorio (Panlab), que permite su estabulación en un medio limpio y seco, con luz poco intensa y en un ambiente tranquilo hasta que se recuperan de la anestesia. Debido a la especial sensibilidad de los pequeños roedores a la hipotermia (Rodríguez, 1989; Aller y Nava, 2009), la prevención de la hipotermia postoperatoria es de fundamental importancia. Por ello, inmediatamente después de la intervención el animal se colocó cerca de una fuente de calor (una lámpara) sobre una manta eléctrica para mantener la temperatura corporal en el rango aconsejado para las ratas adultas (25-30°C) (Waynforth y Flecknell, 2004).

Además en los roedores, es importante controlar la respiración durante el postoperatorio inmediato ya que es común la depresión respiratoria durante este

periodo. Esta complicación es especialmente peligrosa ya que suele pasar inadvertida hasta que los animales sufren hipoxia e hipercapnia.

Durante una intervención quirúrgica, en particular si como en éste modelo experimental se realiza una laparotomía, se pierden abundantes fluidos por evaporación, lo cual se agrava ya que las ratas generalmente son incapaces de ingerir líquidos durante las primeras 12-24 horas del p.o. Por tanto, se deben aportar aproximadamente 40-80ml/kg/24h preferiblemente por vía oral si el animal ha recuperado la conciencia. En caso de que no se hayan recuperado del íleo paralítico se administra una solución salina-dextrosa (4% dextrosa, 0.18% salino) o salina (0.9%) por vía intraperitoneal o subcutánea (Aller y Nava, 2009).

La realización de una laparotomía con manipulación de las asas intestinales y resección de la vía biliar en la rata cursa con un importante dolor p.o. En particular, las ratas Wistar tras sufrir una laparotomía adoptan posturas sugerentes de dolor abdominal arqueando la espalda, aumentan su frecuencia respiratoria y reducen la ingesta de líquidos y sólidos. Por éste motivo, como terapia analgésica se administró el opioide Buprenorfina (0.05mg/kg/12h) por vía subcutánea durante las primeras 24 horas de p.o. (Aller y Nava, 2009). Buprenorfina ha sido muy utilizado en medicina veterinaria durante las últimas tres décadas porque proporciona un nivel de analgesia excelente y produce una mínima depresión cardíaca y/o respiratoria.

Los animales fueron sacrificados a las 8-9 semanas del período post-operatorio, durante el cual se les administró por vía i.m. profunda un antibiótico de amplio espectro (Ceftazidima; 50 mg/kg; una vez a la semana) y Vitamina K1 (Fitomenadiona; 8mg/kg; una vez a la semana) como profilaxis anti-infecciosa y anti-hemorrágica, respectivamente (Aller et al. 2009b).

Ketotifen, un fármaco estabilizador de la membrana de los mastocitos, se administró en el agua de bebida tras ser disuelto a una concentración de 0.15mg/ml que aporta una dosis del fármaco de 10mg/kg/día (Serna y cols. 2006) desde la sexta semana del p.o. hasta que las ratas fueron sacrificadas la 8^a-9^a semana del p.o. Se comprobó diariamente la cantidad de agua ingerida por cada rata para asegurar que

estaban recibiendo niveles terapéuticos del fármaco (dosis umbral terapéutica de 10mg/Kg/día, por lo que eran necesarios 16,6 ml/día para una rata de 250 g). Las ratas que ingerían menos agua de la necesaria para mantener niveles plasmáticos terapéuticos de ketotifen fueron rechazadas para el estudio.

2. G. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Concluido el tiempo de evolución previsto para su estudio (8-9 semanas), se procedió a la anestesia de los animales con ketamina (80 mg/kg) y xilacina (12 mg/kg) por vía intraperitoneal para su estudio y posterior sacrificio. Tras laparotomía media, el líquido ascítico es aspirado con una jeringa estéril, se mide su volumen y se centrifuga a 3500 rpm durante 15 minutos para separar las células peritoneales. A continuación, se divide en tres alícuotas y se conserva a -42 °C hasta su utilización para determinar diferentes mediadores.

2.G.1. Determinación de la presión venosa portal

La presión venosa portal puede ser medida por un método directo o indirecto. En el primer caso, tras la anestesia, se realiza una laparotomía media y se procede a su medición por canulación de la vena ileocólica o de una pequeña vena ileal con un catéter PE 50, fijando el catéter con una gota de cianoacrilato para que la punta del catéter se fije en la parte distal de la vena mesentérica superior (Bernadich C. y cols., 1998) .

También es posible la medición indirecta de la presión portal por punción intraesplénica, insertando una aguja 20G en el parénquima esplénico (Figura 17). El catéter se conecta en ambos métodos a un registrador de presión Powerlab 200 (ML 201) con un transductor de presión Sensoror (SN-844), asociados a un programa de ordenador Chart V 4.0 (ADI Instruments) (Figura 18). El sistema se calibra antes de cada experimento.

III-MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha demostrado una excelente correlación entre la presión en la pulpa esplénica y la presión portal medida en la vena mesentérica superior (Kravetz y cols, 1986). Por ello, el método empleado en nuestro caso fue el de medición por punción intraesplénica (Figura 17)



Figura 17: Punción intraesplénica insertando una aguja 20G en el parénquima esplénico para medir indirectamente la presión portal.



Figura 18: Sistema de medición de la presión portal: registrador de presión Powerlab 200 (ML 201) con transductor de presión Sensoror (SN-844), asociados a un programa de ordenador Chart V 4.0 (ADI Instruments).

2. G. 2. Circulación venosa colateral

Tras laparotomía media y determinación de la presión venosa portal, se procedió a la observación del territorio esplácnico, estudiando las áreas en las que se desarrolla la circulación venosa colateral en la rata. Esta circulación colateral puede ser de dos tipos: portosistémica o portohepática.

- CIRCULACIÓN VENOSA COLATERAL PORTOSISTÉMICA:

- **Área Esplenorrenal:** Se forman la vena *esplenorenal craneal* (anterior o proximal), y la *esplenorrenal caudal* (posterior o distal), que drenan a distinta altura en la vena suprarrenal izquierda (figura 19).

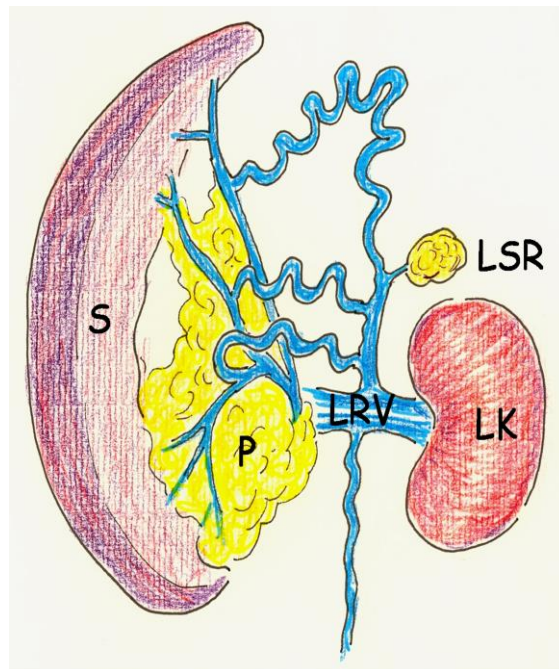


Figura 19: Clases de circulación colateral esplenorrenal en la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata. S: bazo. P: páncreas. LRV: vena renal izquierda. LK: riñón izquierdo. LSR: glándula suprarrenal izquierda.

- **Área Gastroesofágica:** Las colaterales paraesofágicas son dos venas tortuosas y de grueso calibre que ascienden por la cara anterior y posterior del esófago: *venas paraesofágica anterior y posterior* (Figura 20).

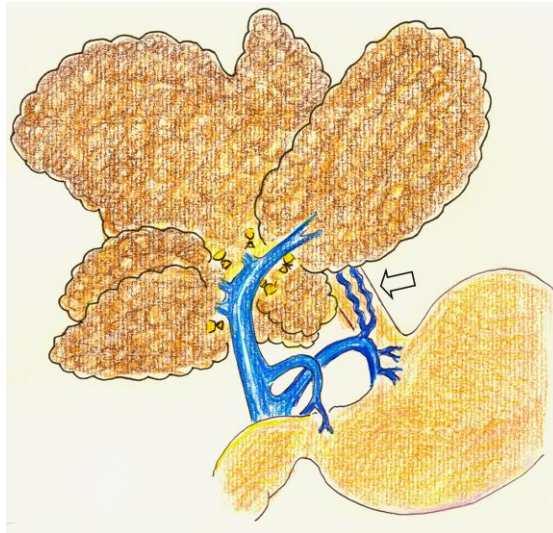


Figura 20: Circulación colateral paraesofágica en la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata.

- **Área Colorrectal:** Se localiza la vena mesentérica inferior, que se continúa con las *venas hemorroidales* en situación pararectal izquierda (Figura 20).

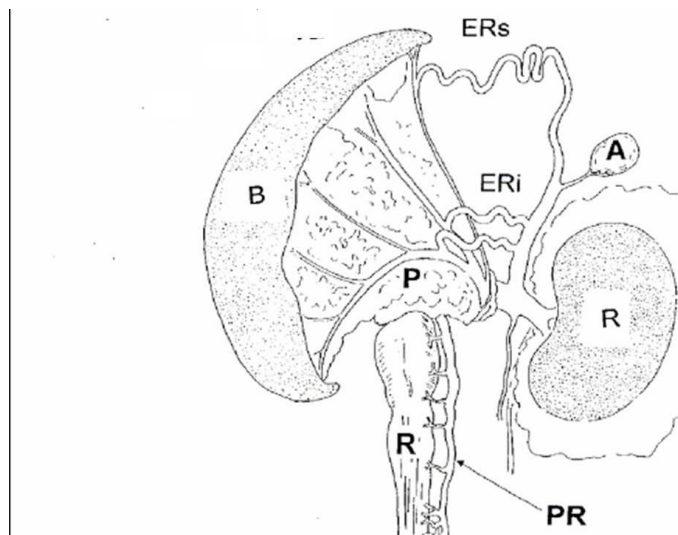


Figura 21: Representación esquemática de la circulación colateral esplénica en ratas con colestasis microquirúrgica a los 8 meses de evolución postoperatoria. Colaterales portosistémicas esplenorenal superior o craneal (ERs) e inferior o caudal (ERi) y colaterales pararectales (PR). LM: lóbulo medio; LLD: lóbulo lateral derecho; E: estómago; VGI: vena gástrica izquierda; VE: vena esplénica; B: bazo; P: páncreas; R: riñón; A: glándula suprarrenal; R: recto. (Dieguez y cols., 2002)

- CIRCULACIÓN COLATERAL PORTOHEPÁTICA

- La **vena hepática accesoria**, que produce la revascularización portal hepática cuando alcanza el hilio (Figura 22).
- **Las venas colaterales portoportales**, que se desarrollan en el hilio hepático, son poco numerosas y su tamaño es muy pequeño para ser consideradas como una vía de revascularización hepática efectiva (Figura 22).

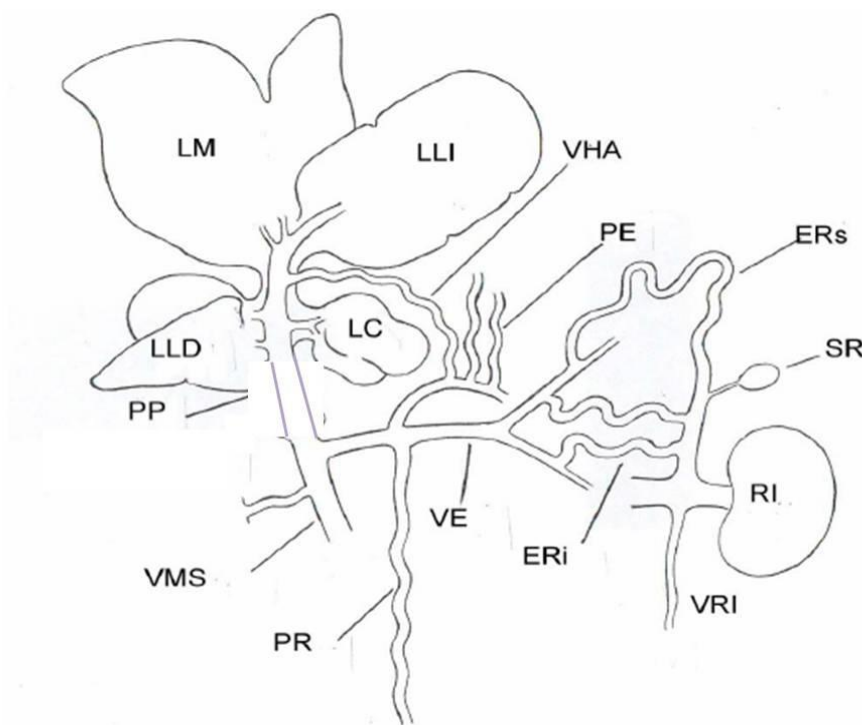


Figura 22. Tipos de circulación colateral portohepática y portosistémica. LLD: lóbulo lateral derecho hepático; LM: lóbulo medio hepático; LLI: lóbulo lateral izquierdo; LC: lóbulo caudado; VHA: vena hepática accesoria; PE: venas paraesofágicas, ERs: colateral esplenorenal superior; SR: glándula suprarrenal; RI: riñón izquierdo; VRI: vena renal izquierda. Eri: colateral esplenorenal inferior; VE: vena esplénica, PR: colateral pararrectal; VMS: vena mesentérica superior; PP: colaterales paraportales. (Dieguez y cols. , 2002)

2. G. 3. Vasculopatía venosa mesentérica

Se denomina vasculopatía venosa mesentérica a la dilatación y tortuosidad de las ramas de la vena mesentérica superior. Se consideran tres grados de vasculopatía venosa mesentérica (Aller y cols, 2001)(Figura 23):

- **Grado 0:** aspecto macroscópico normal de las ramas de la vena mesentérica superior.
- **Grado I:** dilatación y tortuosidad de las ramas mesentéricas, secundarias al clampaje de la vena mesentérica superior.
- **Grado II:** dilatación y tortuosidad espontáneas de las ramas de la vena mesentérica superior.

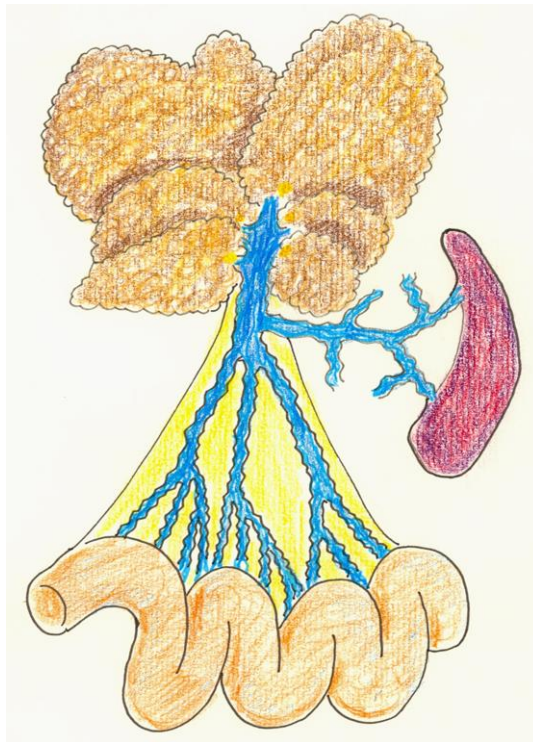


Figura 23: Representación esquemática de la vasculopatía venosa mesentérica de grado II de una ratona con colestasis microquirúrgica a las ocho semanas de la intervención

Para su estudio, se extrajeron parcialmente las asas intestinales, situando el árbol mesentérico por su región ileocecal, donde se visualizaron con facilidad las ramas de la vena mesentérica superior. Esto es, las ramas de primer y segundo orden o proximales, por su vecindad con la vena mesentérica superior, y las de tercer y cuarto orden o distales, por su vecindad con el intestino (íleon y ciego) (Castañeda y cols, 2000)(Figura 24).

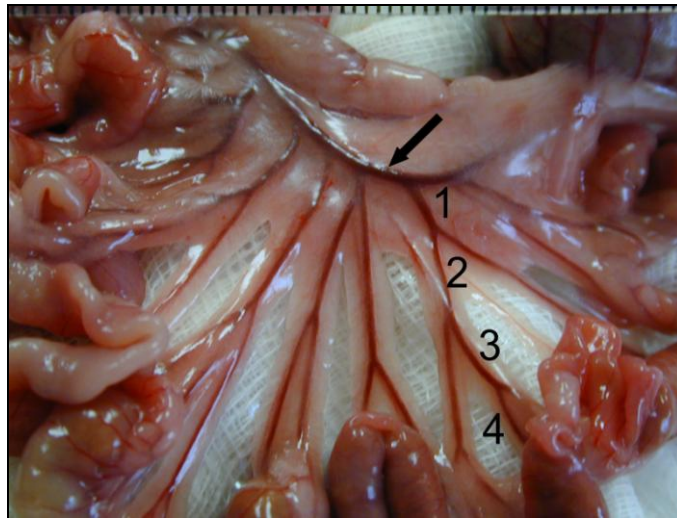


Figura 24: Vascularización venosa mesentérica en la que se observa la vena mesentérica superior (flecha) y sus ramas venosas de primer (1), segundo (2), tercer (3) y cuarto (4) orden.

2.G. 4. Extracción sanguínea

Tras realizar un estudio macroscópico de la cavidad abdominal, medir la presión portal y valorar los signos macroscópicos sugerentes de hipertensión portal, como son el desarrollo de vasculopatía venosa mesentérica y de circulación venosa colateral, se procedió a la extracción de sangre de la vena cava inferior infrahepática, obteniéndose entre 5 y 8 ml de sangre en cada animal (Figura 25). Esta maniobra deja al animal exangüe, falleciendo por shock hipovolémico. La sangre se conservó refrigerada en hielo (4°C), y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos para obtener el suero que, tras dividirse en tres alícuotas, se conservó -42 °C hasta su utilización para determinar diferentes marcadores bioquímicos.



Figura 25: Extracción de sangre venosa de rata procedente de la vena cava inferior tras realización de laparotomía xifopúbica y desplazar el paquete intestinal hacia el lado izquierdo exponiendo el espacio retroperitoneal.

2.G.5. Recogida de muestras histológicas para determinaciones de mediadores inflamatorios.

- 1. Extracción de una muestra de hígado.** Una muestra del lóbulo medio (LM) hepático fue introducida en tubos Eppendorf, sumergidos en nieve carbónica, que posteriormente fueron almacenados en un congelador a -42°C hasta su estudio.
- 2. Extracción del Complejo Linfático Mesentérico Superior.** Los ganglios que componen el Complejo Linfático Mesentérico Superior en la rata (Figura 26) se extirparon y se pesaron, y a continuación se introdujeron en tubos Eppendorf, sumergidos en nieve carbónica, que posteriormente se almacenaron en un congelador a -42°C hasta su estudio.

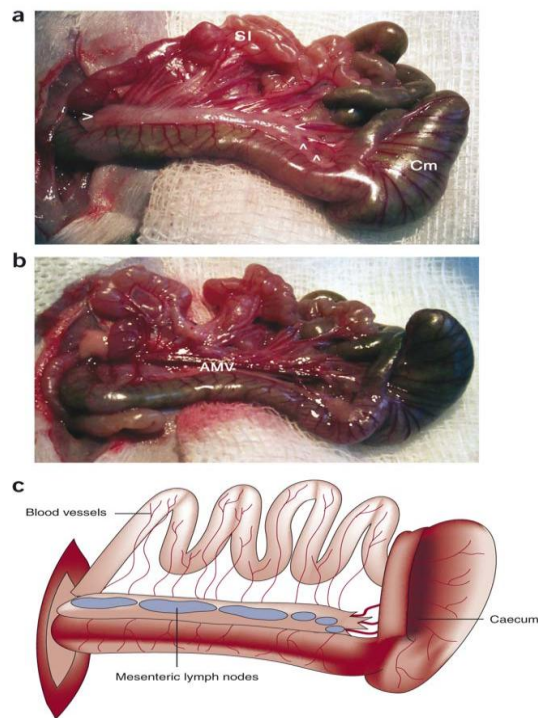


Figura 26: Anatomía del aparato digestivo de la rata: 1: Parte del duodeno; 2: Yeyuno; 3: Íleon; 4: Unión ileocecal; 5: Complejo linfático mesentérico superior; 6: Vasos sanguíneos y linfáticos del mesenterio; 7: Ciego; 8: Ápex del ciego; 9: Colon. (Olds y cols, 1979)

- 3. Extracción del íleon.** Se tomó una muestra de íleon terminal, a 1 cm de la unión ileocecal. Una vez extraído se pesó, y a continuación se introdujo en tubos Eppendorf, que se conservan en nieve carbónica -y posteriormente en un congelador a $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$ - hasta su estudio.

2. G. 6. Recogida de muestras para estudio histopatológico:

Durante la necropsia de los animales se procedió a la resección del hígado, individualizándose sus lóbulos anteriores y posteriores, y se tomó una muestra del lóbulo medio derecho, que se transfirió a un tubo que contenía Formol al 10% para su posterior estudio histopatológico. Además, se extrajeron muestras de íleon terminal, se eliminó su contenido mediante la perfusión intraluminal de solución salina isotónica y se introdujeron en tubos que contenían formol al 10% para su posterior estudio histopatológico. Por último, también se extirparon el bazo y los testículos para ser registrado su peso.

2.H. DETERMINACIÓN SÉRICA DE PRUEBAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA.

- Las concentraciones séricas de *bilirrubina total y directa* se determinaron por una técnica fotolorimétrica, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Olympus Irlanda ref. OSR 6111 y OSR 6112, respectivamente). Esta técnica consiste en una diazoreacción basada en el principio de Jendrassik y Gróf (Dumas y cols 1985). En medio ácido la *bilirrubina conjugada* reacciona con una sal para formar azobilirrubina (azopigmento). Esto es lo que se denomina *bilirrubina directa*. Si a la muestra de suero y reactivo añadimos una sustancia aceleradora (cafeína y agentes surfactantes) conseguimos que reaccione el total de la *bilirrubina*, denominando a la diferencia entre la total y la directa fracción indirecta (no conjugada). La concentración de *bilirrubina* presente en el plasma es proporcional a la concentración de azopigmento que se produce (Higgins y cols. 2006). La utilización de un reactivo compuesto por ácido sulfanílico, ácido clorhídrico y dimetil sulfóxido (DMSO) permite la formación de azobilirrubina por una reacción de diazotación, que es de color rojo cereza. La absorbancia de la muestra se valora por espectrofotometría a una longitud de onda de 555 nm (530-580) y a 20-25°C (Martineck y cols, 1966).

- Se determinaron la concentración de las *transaminasas hepáticas*, *Aspartato Aminotransferasa (AST)* y *Alanin Aminotransferasa (ALT)* utilizando un test cinético espectrofotométrico de ultravioleta optimizado según estándar de la *International Federation for Clinical Chemistry (IFCC)* (Schuman y cols. 2002a, Schuman y cols. 2002b, Schuman y cols. 2006) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Olympus Irlanda refs. OSR6109 y SR6107, respectivamente). La valoración de AST se fundamenta en la reacción del α -cetoglutarato y el aspartato, catalizada por la AST, transformándose en L-Glutamato y oxalacetato, cuya reacción con NADH e Hidrogeniones da lugar a malato y a NAD^+ , por acción de la enzima Malato Deshidrogenasa. El método de valoración se basa en esta oxidación del NADH a NAD^+ , y se mide el valor medio de los incrementos de extinción por minuto mediante un test U.V. cinético (normativa IFCC) a una longitud de onda de 334 nm, 340 nm y 365 nm. La técnica de determinación de la ALT sigue estos mismos principios, si bien en este caso los sustratos de la reacción catalizada por la ALT son

el α -cetoglutarato y la L-Alanina, que se convierten en L-glutamato y piruvato. Aquí, es el piruvato el que se combina con NADH e hidrogeniones para dar -por una reacción catalizada por la enzima Lactato Deshidrogenasa- Lactato y NAD^+ (Bergmeyer y cols, 1976; Bergmeyer y cols, 1978; Bergmeyer y cols, 1980).

- La **fosfatasa alcalina (ALP)** se determina utilizando un test cinético fotocolorimétrico según estándar de la *International Federation for Clinical Chemistry (IFCC)* (Olympus Irlanda ref. OSR6104), que se basa en la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico en medio alcalino, produciendo fosfato inorgánico y el correspondiente resto orgánico con el que se había esterificado. Para su valoración se utiliza un test cinético optimizado con el que se mide el valor medio de los incrementos de extinción por minuto a una longitud de onda de 405 nm y a 25 °C, 30°C y 37°C, siguiendo el protocolo DGKC (Annon y cols, 1970; Heussament y cols, 1977)

- Para la cuantificación sérica de las concentraciones de **γ - glutamil-transferasa (GGT)** se utilizó un método fotocolorimétrico (*GGT Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6120)). GGT cataliza la transferencia de un grupo γ -glutamil de un sustrato donante (γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida) a un receptor (glicilglicina), produciéndose γ -glutamilglicilglicina y 5-amino-2-nitrobenzoato. El aumento de la concentración de éste último produce cambios en la absorbancia en una longitud de onda de 410 nm, siendo por tanto la misma directamente proporcional a la actividad enzimática de GGT. (Schuman y cols. 2002c, Panteghini M, 2006).

- Para la determinación de las concentraciones séricas de **Lactato deshidrogenasa (LDH)** se utilizó un test cinético espectrofotométrico de ultravioleta (*LDH Olympus System Reagent*, Olympus Irlanda ref. OSR6126) recomendado por el Comité Escandinavo de Enzimas (SCE). LDH es una enzima que cataliza la reducción de piruvato a lactato en un medio con pH neutro produciéndose en esta reacción la oxidación (consumo) de NADH. La concentración de NADH se monitoriza mediante la absorbancia en la longitud de onda de 340nm. La disminución en la absorbancia por minuto ($\Delta A / \text{min}$) es proporcional a los

micromoles de sustrato transformado en ese periodo de tiempo y, por lo tanto es proporcional a la actividad de la LDH (*Scandinavian Committee on Enzymes*, 1974)

- Para la determinación de las concentraciones séricas de **ácidos biliares** se utilizó un método cinético fotocolorimétrico enzimático (Randox Laboratories Ltd. United Kingdom Cat.No.BI3863). En una primera reacción los ácidos biliares son oxidados por la enzima 3- α hidroxisteroide dehidrogenasa, con la subsiguiente reducción del Thio-NAD a Thio-NADH. La tasa de formación de éste último compuesto se valora midiendo los cambios en la absorbancia específica en 405 nm.

2.I. DETERMINACIÓN DE PROTEINAS.

- Las **proteínas totales** se determinaron mediante el test colorimétrico “Biuret”, basado en que los grupos -CO-NH- unidos entre sí dan una reacción con formación de color violeta con las sales cúpricas en medio alcalino, siendo la más representativa y simple la que da con el reactivo de Biuret. Se valora la absorbancia de la muestra por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm.

Es en la actualidad, constituye el método más exacto y simple para la determinación de las proteínas totales (Henry y cols, 1957; Peters y cols, 1968).

- La **albúmina** sérica se cuantificó mediante el test fotocolorimétrico denominado “verde de bromocresol” (Olympus Irlanda ref. OSR6102), en el cual la muestra se combina con este colorante a determinado pH, produciéndose un cambio de color del indicador, que pasa de amarillo verdoso a verde azulado. La absorbancia de la muestra se valora por espectrofotometría a una longitud de onda de 630 nm a temperatura ambiente (Doumas y cols, 1971; Webster y cols, 1974).

- Los niveles séricos de **Urea** fueron cuantificados con un método enzimático cinético por espectrofotometría ultravioleta (*Urea Olympus System Reagent*; Olympus Irlanda ref. OSR6134). La urea es hidrolizada en presencia de agua y de ureasa dando lugar a un ión amonio y dióxido de carbono. El amonio producido en ésta primera reacción reacciona con 2-oxoglutarato y NADH produciéndose glutamato y NAD⁺ en presencia de GLDH. El descenso en la

concentración de NADH produce una disminución en la absorbancia por unidad de tiempo en la longitud de onda de 340 nm que es proporcional a la concentración de urea (Sampson y cols 1980 ; Lamb y cols 2006)

- Las concentraciones séricas de **Creatinina** se valoraron mediante un test químico cinético fotolorimétrico (*Creatinin Olympus System Reagent*; Olympus Irlanda ref. OSR6178), que se fundamenta en la reacción de Jaffé. La creatinina en un medio alcalino reacciona con el ácido pícrico formando un producto de color amarillo-naranja que es visible en el espectro de longitud de onda de 520/800 nm. La velocidad de cambio en la absorbancia es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra (Folin, 1904; Cook, 1971; Larsen , 1972; Lamb y cols 2006).

2.J. DETERMINACION SERICA DE LIPIDOS Y LIPOPROTEINAS.

Los valores del perfil lipídico fueron determinados a través de la utilización de métodos espectrofotométricos empleando un espectrofotómetro Pharmacia Biotech 1000 (Pharmacia LKB, Uppsala, Suiza), así como un sistema ultramicroanalítico de análisis (SUMA)

Las concentraciones séricas de **triglicéridos (TGD)**, **ácidos grasos libres (NEFA´s)**, **colesterol total**, **lipoproteínas de alta densidad (HDL-c)**, **lipoproteínas de baja densidad (LDL-c)** y **lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-c)** fueron determinadas enzimáticamente mediante la utilización de un *kit* comercial proveniente de la firma Randox, Crumlin, Reino Unido.

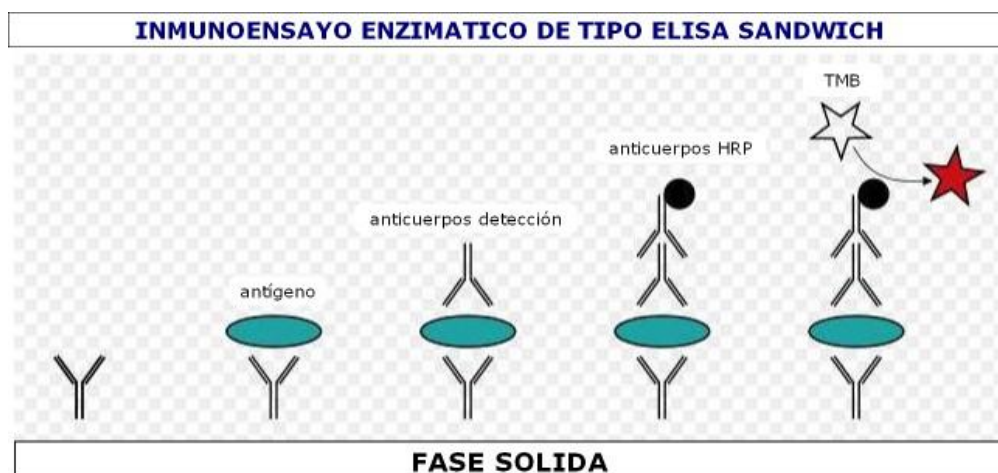


Figura 27: Formación de un “sándwich” de fase sólida constituido por Anticuerpo-Antígeno-Anticuerpos-Enzima.

2. K. DETERMINACION SERICA DE TGF- β_1

Para valorar las concentraciones sericas de TGF- β_1 se utilizaron técnicas *ELISA*, de acuerdo a las instrucciones aportadas por el fabricante (IBL-International. GMBH)

2.L. VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA (*CALCITONIN GEN RELATED PEPTIDE*, CGRP) E IL-13 EN EL LÍQUIDO ASCÍTICO.

Para valorar las concentraciones de **CGRP** e **IL-13** en el líquido ascítico se utilizaron técnicas *ELISA*, de acuerdo a las instrucciones aportadas por el fabricante (SPI Bio, Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France y Biosource, Invitrogen S.A., Barcelona, Spain; respectivamente).

2. M. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS EN HÍGADO, ÍLEON Y GANGLIOS LINFÁTICOS MESENTÉRICOS.

La determinación de las concentraciones tisulares de citoquinas se realizó mediante una técnica de inmunoensayo enzimático de tipo *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), utilizando kits comerciales específicos para rata (BioNOVA Científica Ltd., Madrid, España).

2.M.1 *Homogeneización de los tejidos.*

Las muestras de tejido congelado se introdujeron en tubos de polipropileno (Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park, Estados Unidos) que contenían tampón de lisis a 4 °C (10 ml de tampón/g de tejido). El tampón de lisis contiene fenilmetilsulfonil flúor (PMSF; Sigma Chemical Company), pepstatina A 1 µ g/ml (Sigma Chemical Company), aprotinina (Sigma Chemical Company), antipaína (Sigma Chemical Company) y leuceoptina en tampón fosfato a pH 7,2 con el 0,05% de azida sódica. Las muestras se homogeneizaron 3 veces durante 30 s con un homogeneizador eléctrico (Polytron; Brinkmann Instruments, Westminster, Estados Unidos) a máxima velocidad. A continuación, las muestras son “sonicadas” 5 veces, y se congela el sobrenadante a -80°C para permitir la formación de agregados macromoleculares. Tras su descongelación a 4° C se centrifugaron a 3.000 rpm y se midió el volumen final de homogeneizado con una pipeta graduada. Los homogeneizados tisulares se almacenaron a - 80 °C hasta la realización de la determinación cuantitativa de las citoquinas.

2.M.2. *Valoración de los niveles tisulares de citoquinas.*

La cuantificación de los niveles tisulares de Catalasa, glutatión transferasa, glutatión peroxidasa, TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-13, IL-17A, *Monocyte Chemoattractant Protein* (MCP-1), Factor de crecimiento transformador beta 1 (*Transforming Growth Factor* β 1; TGF- β 1) y Factor de crecimiento de endotelio vascular (Vascular endothelial growth factor; VEGF) se realizó mediante un método *Enzyme Linked-Immuno-Sorbent-Assay* (ELISA), utilizándose kits específicos para

rata, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (DIACLONE SAS, Besançon, Francia).

2.M. 3. Determinación de los niveles tisulares de proteínas.

Para valorar las concentraciones de proteínas en las muestras tisulares se utilizó un método químico espectrofotométrico. Se prepara una solución patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) a una concentración de 1 mg/ml en PBS. Posteriormente, se añaden a las cubetas de lectura del espectrofotómetro 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ l de dicha solución, y se completan hasta un volumen final de 800 μ l de PBS (es decir, añadiremos 798, 796, 792, 788, 784 y 780 μ l de PBS). Añadimos a todas las cubetas 200 μ l de reactivo de Bradford (BIO-RAD Protein Assay) y dejamos actuar 5 minutos. Posteriormente, se procede a la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro Ultrospect III (Pharmacia) a 595 nm., calibrándolo en blanco sin proteína, que contiene 800 μ l de PBS y 200 μ l de reactivo de Bradford, y se realiza la curva patrón.

Para calcular la cantidad de proteína de las muestras del complejo linfático mesentérico superior (CLMS) y del íleon fue necesario hacer una dilución 1/10 en PBS, porque al estar muy concentradas, quedaban fuera de la curva patrón. Se extrapola el valor de la absorbancia obtenida de la muestra problema sobre la curva patrón, y así se obtuvo la concentración de proteínas. Todas las muestras se valoraron como mínimo dos veces, y posteriormente se realizó la media aritmética de los valores obtenidos.

La cantidad de proteínas presente en las muestras se cuantificó mediante el método Bradford, que está basado en los cambios de color que sufre el reactivo Bradford (Azul de Coomassie) cuando se une a residuos de proteínas, concretamente a aminoácidos básicos (principalmente arginina) y a aminoácidos aromáticos.

2. N. ESTUDIO MICROSCÓPICO E HISTOPATOLÓGICO

Para el estudio histopatológico se procesaron las muestras mediante técnicas de rutina para microscopía óptica:

2.N. 1. Fijación

La fijación de los tejidos es indispensable para evitar los procesos autolíticos o postmortem de las células de forma inmediata, y para que las estructuras tisulares se conserven e inmovilicen. Para esto, se introdujeron los tejidos inmediatamente tras su extirpación en formol tamponado al 10%, que tiene una penetración relativamente rápida en los mismos. El tiempo de fijación para este reactivo es de 12 a 24 horas.

2.N. 2. Inclusión

Tras el tallado de los órganos, las piezas seleccionadas se incluyeron en parafina mediante un sistema automático con temperatura y vacío controlado por ordenador (Histomatic 166 MP, Fisher). En este procesado automático, inicialmente, las piezas se sumergieron en una cubeta con agua destilada. Dado que la parafina no es soluble en agua, previamente a la inclusión hay que deshidratar el tejido para que ésta pueda penetrar en el mismo. Durante este proceso de deshidratación progresiva, se pasan las muestras por cubetas que contienen concentraciones crecientes de alcohol etílico: primero al 70%, después al 96% y por último alcohol absoluto (100%). El tejido se sumerge en cada cubeta 3 veces, durante 10 minutos cada vez, pasando después a la siguiente cubeta y repitiendo este proceso. A continuación, se realiza el aclarado, que es un paso necesario para que se pueda incluir el tejido en parafina, ya que ésta tampoco es soluble en alcohol. El agente más utilizado es el xilol, debido a su rápida acción, si bien se pueden utilizar también benzol o toluol. De esta forma, se sustituye el alcohol etílico (deshidratante) por xilol (sustancia miscible con la parafina), de forma que la parafina se pueda disolver y penetrar en el tejido. Finalmente, en la estación de inclusión, se procedió a la obtención de los bloques de parafina sólidos con la pieza de tejido en su interior. Para ello, se impregna el material en parafina blanda a 46°C durante 1 hora, tiempo tras el cual se realiza un segundo baño en parafina dura a 58°C durante 1 hora. Por último, se

coloca la muestra en una cubeta, se vierte la parafina dura fundida en su interior, y se enfría en hielo.

2.N.3. Procesado de los cortes

Tras la inclusión, se procedió a realizar el corte de las piezas con un microtomo de parafina tipo Minot (Microm), obteniéndose secciones de 4 a 7 μm de grosor. A continuación, las secciones colocadas en un portaobjetos e identificadas se sometieron a un proceso de desparafinado. Para esto, se somete a las preparaciones a tres baños de 3 a 5 minutos en xilol. Posteriormente, se han de hidratar para que los colorantes puedan actuar. Esto se hace utilizando alcohol en concentraciones decrecientes (absoluto, 96 % y 70%) y, finalmente, agua destilada. Las muestras han de estar sumergidas en cada baño entre 3 y 5 minutos.

2.N.4. Tinción y montaje

Finalmente, se llevó a cabo la tinción de las preparaciones con Hematoxilina-Eosina, y Tricrómico de Masson para la posterior observación al microscopio óptico de las diferentes muestras tisulares. Una vez teñidos con los protocolos que se indican a continuación, se debe extraer el agua de la preparación para evitar la opacidad del tejido. La deshidratación se lleva a cabo por alcoholes de gradación creciente. A continuación, se realiza un aclarado con xilol, que disminuye el contraste de los índices de refracción de los componentes de los tejidos y, para finalizar, se procede a su montaje, colocando una gota del medio de montaje (bálsamo de Canadá o un medio sintético) sobre el corte, apoyando y presionando sobre éste el cubreobjetos para eliminar las burbujas. Por último, se limpia el medio de montaje excedente y se deja secar.

- Hematoxilina & Eosina:

Es una tinción general que nos proporciona una visión global de las estructuras tisulares. Los portaobjetos con las secciones desparafinadas se sumergieron en hematoxilina de Harris durante 10 minutos, y después se lavaron en agua destilada durante otros 10 minutos. A continuación se sumergieron en eosina

unos segundos, se lavaron con agua destilada de nuevo y se procedió a su deshidratación en alcoholes y montaje.

- Tricrómico de Masson:

Se ha utilizado para poner de manifiesto las diferentes capas: muscular, tejido conectivo y, además es un colorante que tiene gran afinidad por el tejido fibroso. Los cortes ya hidratados se sumergen en hematoxilina férrica de Weigert's durante 20 minutos, y después se lavan con agua corriente durante 1 minuto. A continuación, se diferencian en alcohol ácido (1% ácido Clorhídrico en alcohol al 70%) durante 10 segundos. Se lava en agua corriente durante 5 minutos. Se tiñe entonces con el reactivo rojo (Briebrich scarlet, fucsina ácida y ácido acético glacial) durante 15 minutos, y se aclara con agua destilada. Se trata con ácido fosfotungsténico al 5% durante 15 minutos y se aclara brevemente en agua destilada. Se elimina el exceso de agua y se observa la preparación para asegurarse de que la tinción es adecuada. Se introduce en la tinción verde durante 1 minuto y se aclara con agua destilada. Después, se trata con ácido acético al 1% durante 3 minutos, y se aclara con agua destilada. Se elimina el exceso de agua y se comprueba que la tinción es adecuada. Para finalizar, se deshidrata en alcoholes de gradación creciente y se monta.

2.Ñ. ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO DE FIBROSIS EN EL PARÉNQUIMA HEPÁTICO CON TINCIÓN DE ROJO SIRIO.

Para valorar el grado de fibrosis en el hígado se utilizó un sistema de análisis de imagen que cuantifica el colágeno del mismo midiendo en secciones histológicas el área teñida con *Rojo Sirio*. Las imágenes microscópicas se captaron con una cámara Leica DC 300 acoplada a un microscopio Leica DM 5000B con pletina motorizada. Se digitalizó un área mínima de 15 mm² de tejido mediante la captación secuencial y automática de imágenes microscópicas obtenidas con el objetivo 10x. Para cuantificar el área teñida por el *Rojo Sirio* respecto al área total del tejido hepático se utilizó el software Leica Qwin. En ésta aplicación informática se desarrolló un procedimiento o rutina que incluyó la segmentación de cada una de las

imágenes con el fin de obtener el área teñida por *Rojo Sirio* en valores numéricos. Así, comparando el valor numérico del área teñida con *Rojo Sirio* respecto al valor numérico del área total analizada se obtiene el porcentaje de área del hígado ocupada por fibrosis.

2. O. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la aplicación informática SPSS versión:15.0 para Windows[®] (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). En primer lugar, se realizó un estudio descriptivo de los resultados obtenidos, expresándolos mediante una medida de centralización (media aritmética) y una medida de dispersión (desviación estándar) ($\bar{x} \pm DE$). Para la comparación de las variables cualitativas entre los diferentes grupos de animales se utilizó la prueba de la Chi-cuadrado, en tanto que para comparar las variables cuantitativas se utilizó la prueba de Análisis de la varianza (ANOVA). En éste último caso, cuando existía un contraste estadísticamente significativo se empleó el test de Duncan para contrastes a posteriori. Previamente, se había comprobado que las variables estudiadas se ajustaban a una distribución Normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

1. SUPERVIVENCIA Y COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS:

1.A. Supervivencia:

De todos los animales que formaron parte del diseño experimental (n=85) sobrevivieron 70 a las ocho-nueve semanas del postoperatorio, correspondiendo 29 de ellos a ratas pseudo-operadas (PSO) y 41 a ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ).

1.B. Complicaciones postoperatorias

Las ratas pseudo-operadas no presentaron complicaciones durante la evolución postoperatoria (p.o.). Por el contrario, las ratas con CMQ sufrieron las siguientes alteraciones:

- **Pared abdominal:**

La cicatriz de la laparotomía mostraba evidentes alteraciones tróficas e incluso algunas ratas desarrollaron *eventraciones*. En 5 ratas con colestasis no tratadas (CMQ) (25%) se evidenció la presencia de eventración mientras que no se demostró en ninguna de las tratadas con Ketotifén. Siete ratas con CMQ (35%) presentaron adelgazamiento y *alteraciones tróficas de la piel* de la laparotomía, en tanto que las ratas colestásicas tratadas con Ketotifén no presentaron estas alteraciones. Por último, tres ratas con colestasis (15%) presentaron *ulceras* y *abscesos* en la piel mientras que en ninguna de las tratadas con Ketotifen aparecieron estas lesiones.

- **Complicaciones neurológicas:**

A las 8-9 semanas del p.o. los animales colestásicos se muestran menos reactivos, disminuyendo su movilidad. Además, las ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática presentan movimientos más lentos respecto a las ratas pseudo-operadas y menor respuesta a los estímulos dolorosos.

- **Colestasis:**

Los animales con CMQ presentaban ictericia cutánea, más evidente en las orejas, las extremidades y la cola, coluria y acolia (Figura 33).

2. HALLAZGOS MACROSCÓPICOS EN LA NECROPSIA

- **Pared abdominal:**

La observación macroscópica de la pared abdominal en las ratas con colestasis (CMQ) cuando se sacrifican los animales, a las 8-9 semanas del postoperatorio, demuestra un significativo déficit de la cicatrización, con atrofia de la capa muscular y en algunas de ellas incluso *eventración* (figura 36). En 5 (20%) ratas CMQ no tratadas se comprobó la existencia de eventración mientras que no se demostró en ninguna de las tratadas con ketotifén. Siete ratas con CMQ (35%) presentaron adelgazamiento y alteraciones tróficas de la piel de la laparotomía mientras que las ratas colestásicas tratadas con ketotifén no presentaron estas alteraciones. Tres ratas con colestasis microquirúrgica (15%) presentaron *ulceras* y *abscesos* en la piel mientras que en ninguna de las tratadas con ketotifén aparecieron estas lesiones.

- **Complicaciones hemorrágicas:**

Al realizar la laparotomía en el momento del sacrificio, en las ratas con CMQ se produce mayor *hemorragia* respecto de las ratas PSO. Además, 3 ratas colestásicas (CMQ) (15%) presentan *hematomas* intramusculares (i.m.) en las áreas de punción para la administración de la profilaxis antihemorrágica y antibiótica en las extremidades inferiores, mientras que las ratas con colestasis tratadas con ketotifén (CMQ+K) no desarrollaron hematomas (i.m.)

- **Afectación hepática:**

En las ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) existe una heterogeneidad de la *afectación hepática* (figuras 28 y 29). Algunos animales

presentan gran fibrosis hepática con aumento de la consistencia del órgano y hepatomegalia franca, asociado a la presencia de un gran volumen de *ascitis* (ocasionalmente hemorrágica), presencia de circulación colateral porto-sistémica, *adenitis mesentérica* hemorrágica e intensa ictericia muco-cutánea. En las ratas con colestasis tratadas con ketotifén (CMQ+K) la mayoría de los animales presentaban *ascitis* escasa o ausente. El hígado en la mayor parte de los casos era congestivo y de color amarillento, pero no pétreo ni de aspecto fibrótico, aunque ocasionalmente se observaba algún foco de necrosis. En la mayoría de éstas ratas tratadas con ketotifén la *presión portal* se situaba en valores entre 5 y 10 mmHg. Un pequeño porcentaje de ratas desarrollaron pequeños quistes biliares a nivel hiliar y parenquimatoso (35% en ratas con CMQ y 27,7% en ratas con CMQ+K) (figura 34). Es menos frecuente la observación de pequeños *abscesos* intrahepáticos y de *focos de necrosis* hepática en ambos grupos. En ocasiones se aprecian *adherencias* epiplóicas al hígado con circulación colateral porto-hepática.

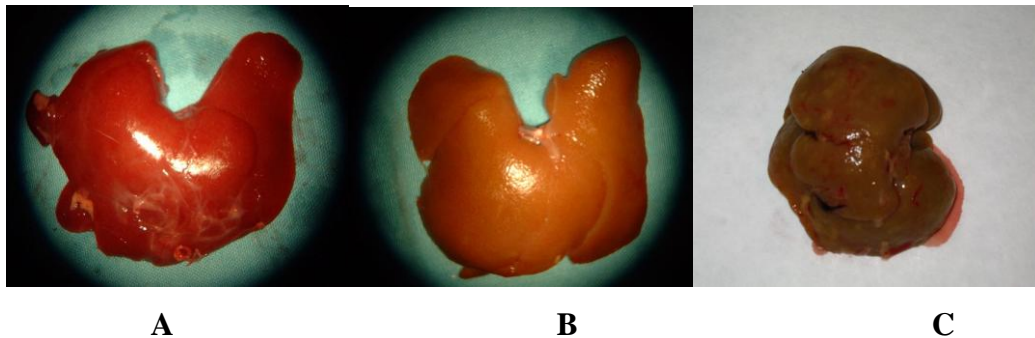


Figura 28: Fotografías comparativas del aspecto macroscópico del hígado en una rata pseudo-operada (A), y otras dos del grupo con colestasis (B y C), en la cual se aprecia la heterogeneidad de la evolución de la fibrosis hepática. Se observa hepatomegalia, ictericia y aumento de la consistencia en grado variable en el hígado colestásico.



Figura 29: Fotografía comparativa del aspecto macroscópico del hígado en una rata pseudo-operada (izquierda) y otra con colestasis microquirúrgica (derecha).

- Sistema digestivo:

Algunas ratas desarrollaron *úlceras gástricas*, más frecuentemente en las ratas colestásicas no tratadas. Las paredes del estómago y del intestino delgado mostraban ocasionalmente un aspecto edematoso y engrosado. Uniformemente en ambos grupos (CMQ y CMQ+K) se observaba *edema retroperitoneal y pancreático*.

Todas las ratas con colestasis presentaban *adenitis mesentérica*, bien congestiva y menos frecuentemente hemorrágica, un 40% en las ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y un 22,2% en las ratas tratadas con Ketotifén (CMQ+K) (figura 35).

En ambos grupos de animales con colestasis (CMQ y CMQ+K) existía una disminución marcada de la grasa del mesenterio.

- Torax:

A nivel torácico se ha comprobado la existencia de *infartos pulmonares* y *derrame pleuro-pericárdico* en algunas ocasiones.(Figura 30)



Figura 30: Corazón y pulmones de rata a la que se somete a colestasis microquirúrgica (CMQ) entre 8 y 9 semanas. Se aprecia tinte icterico en los tejidos así como cardiomegalia e infartos y hemorragias parenquimatosas pulmonares.

- Sistema Genito-Urinario:

Los testículos de las ratas con colestasis de ambos grupos estaban disminuidos de tamaño y atróficos, edematosos y con tinte icterico en comparación con los de las ratas pseudo-operadas (figura 48). Los riñones, sin embargo, presentan mayor

tamaño en las ratas con colestasis microquirúrgica comparándolo con las pseudo-operadas y desarrollan un color verde oscuro.(figura 31)



Figura 31: Fotografía comparativa de los riñones de una rata con colestasis microquirúrgica (parte superior) y de otra pseudo-operada (parte inferior).



Figura 32: Imagen de los órganos extraídos en una rata con colestasis microquirúrgica (CMQ) sacrificada a las 8 semanas de la intervención. Bazo, lóbulos superiores e inferiores hepáticos, riñones y testículos.

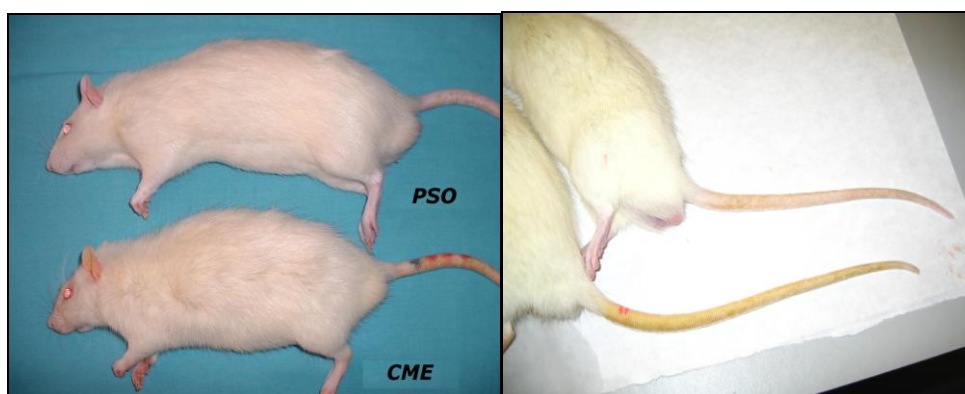


Figura 33: Fotografía comparativa entre una rata pseudo-operada (PSO) y otra con colestasis (CMQ) al final del período de estudio (8-9 semanas), en la cual se observa la ictericia cutánea, en particular en las orejas, las extremidades y la cola.

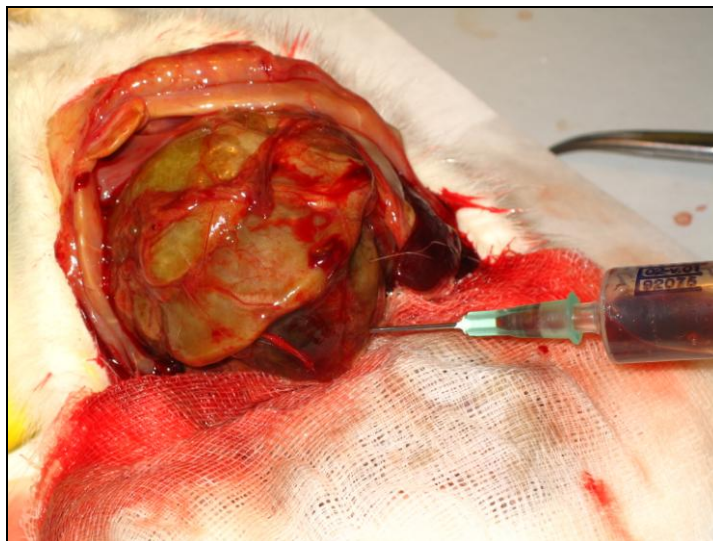


Figura 34: La presencia de quistes hiliares biliares en las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica (CMQ) es ocasional.

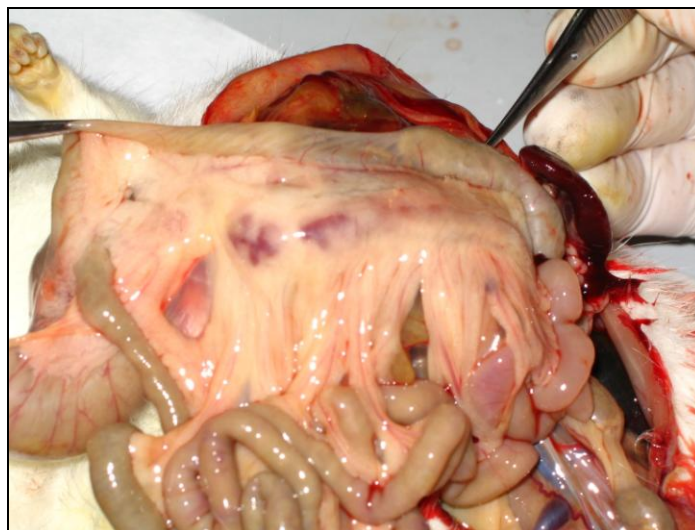


Figura 35: Presencia de adenopatías mesentericas hemorrágicas en una ratona con colestasis extrahepática microquirúrgica (CMQ).

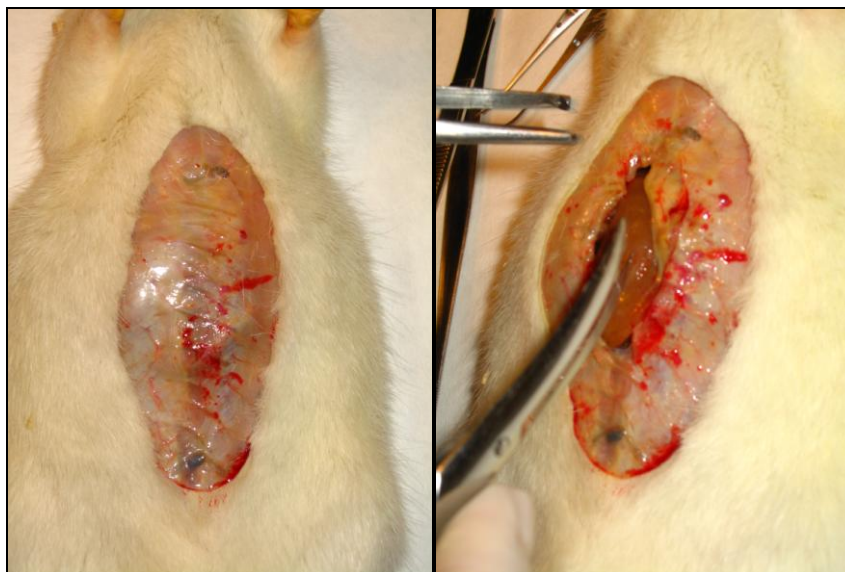


Figura 36: Imágenes de ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica (CMQ), en las que se comprueba macroscópicamente la existencia de un importante déficit de la cicatrización de la laparotomía que, incluso en algunos casos se acompaña del desarrollo de eventraciones.

3. EVOLUCION DEL PESO CORPORAL.

Los resultados correspondientes al peso corporal de los animales, tanto al inicio como al final del estudio, así como el incremento del peso corporal durante el periodo postoperatorio, se representan en la tabla 1. El incremento del peso corporal al final del período evolutivo de 8-9 semanas es menor ($p < 0.001$) en el grupo de ratas con colestasis (CMQ) y en las ratas colestásicas tratadas con ketotifen (CMQ+K) respecto al grupo de pseudo-operadas (PSO). La administración de ketotifen a los animales PSO cursa con menor ($p < 0.01$) aumento de peso al final del período p.o., sin embargo en las ratas con colestasis éste efecto no se ha producido. (tabla 1) (figura 37).

Tabla 1. Peso corporal inicial (PCI;g), peso corporal final (PCF;g), e incremento de peso corporal (Δ peso; g) en ratas pseudo-operadas (PSO), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K), con colestasis microquirúrgica (CMQ) y con colestasis tratadas con ketotifén(CMQ+K).

Grupo	PCI(g)	PCF(g)	Δ PC(g)
PSO (n=15)	238,12 \pm 9,34	394,1 \pm 26,94	153,66 \pm 20,06
CMQ (n=16)	289,5 \pm 38,65 ^{***}	344,30 \pm 21,58 ^{***}	51,82 \pm 31,26 ^{***}
PSO+K (n=13)	269,87 \pm 21,96 ^{**•}	388,1 \pm 21,39 ^{•••}	113,48 \pm 34,64 ^{**•••}
CMQ+K (n=17)	252,38 \pm 15,89 ^{•••}	291,38 \pm 33,66 ^{***•••$\Delta\Delta\Delta$}	39,81 \pm 24,65 ^{***$\Delta\Delta\Delta$}

Media \pm DE: ^{**}p<0.01; ^{***}p<0.001: valor ES respecto a PSO; ^{•••}p<0.001; valor ES respecto de CMQ; $\Delta\Delta\Delta$ p<0.001: valor ES respecto de PSO+K.

Δ Peso Corporal

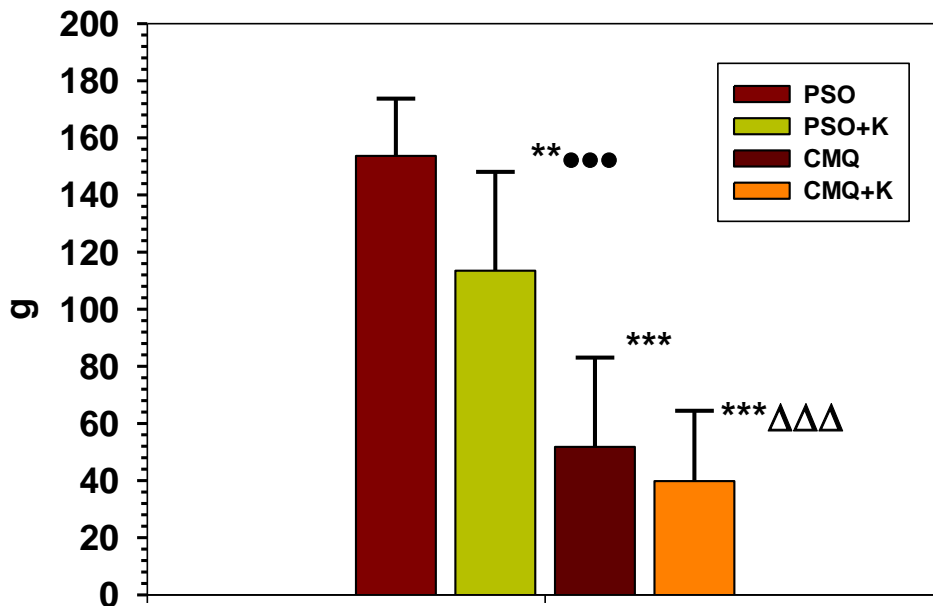


Figura 37: El incremento del peso corporal (Δ Peso; g) en ratas pseudo-operadas (PSO), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K), con colestasis microquirúrgica (CMQ) y con colestasis tratadas con ketotifén(CMQ+K). Media \pm DE: ^{**}p<0.01; ^{***}p<0.001: valor ES respecto a PSO; ^{•••}p<0.001; valor ES respecto de CMQ; $\Delta\Delta\Delta$ p<0.001: valor ES respecto de PSO+K.

4. EVOLUCIÓN PESO HEPÁTICO

Todos los animales con colestasis presentaban hepatomegalia, si bien el aumento del peso hepático (PH) es mayor ($p<0.001$) en las ratas no tratadas (CMQ) que en aquellas a las que se administró ketotifen ($p<0.01$) (CMQ+K). De hecho, la diferencia del PH entre éstos dos grupos de ratas fue estadísticamente significativa ($p<0.001$) (tabla 2; figura 38). Por el contrario, la administración de ketotifen a los animales PSO no ejerció ningún efecto sobre el PH (tabla 2; figura 38). Cuando analizamos la relación PH/PC los resultados son similares, aunque la administración de ketotifen no reduce el incremento del PH ($p<0.001$) en las ratas colestásicas. (tabla 2; figura 38).

Tabla 2: Peso hepático (PH) e índice PH/Peso corporal final (PH/PCx100) de las ratas pseudo-operadas, (PSO) con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K).

Grupo	PH(g)	(PH/PC)x100
PSO(n=15)	13,82±2,27	3,50±0,52
CMQ(n=16)	26,015±5,22***	7,57±1,86***
PSO+K(n=13)	12,13±0,87●●●	3,08±0,22●●●
CMQ+K(n=17)	17,90±3,88**●●●ΔΔΔ	6,10±0,85***●●●ΔΔΔ

Media ± DE; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$: valor ES respecto a PSO; ●●● $p<0.001$; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p<0.001$; valor ES respecto de PSO+K.

Peso Relativo Hepático (PH/PC)

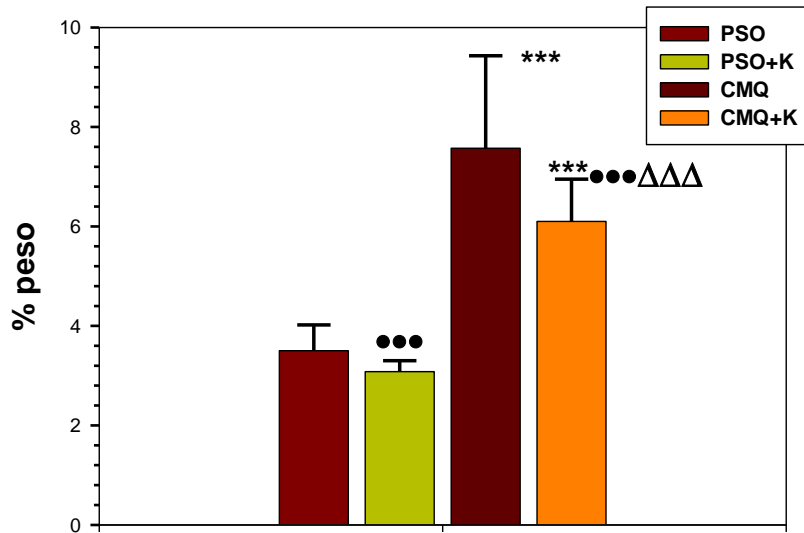


Figura 38: Peso hepático (PH) e índice PH/Peso corporal final (PH/PCx100) de las ratas pseudo-operadas, (PSO) con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K). Media ± DE; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; ••• $p < 0.001$; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p < 0.001$; valor ES respecto de PSO+K.

Sin embargo en lo que se refiere a la contribución al peso hepático total por cada lóbulo hepático, en las ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ), bien tratadas o no tratadas con ketotifen, se produce un incremento de peso en todos los lóbulos respecto a las ratas pseudo-operadas (PSO), que es más significativo en los lóbulos lateral derecho (LLD; $p < 0.001$) y caudado (LC; $p < 0.001$), que en los lóbulos lateral izquierdo (LLI; $p < 0.05$) y medio (LM) (tabla 3; figuras 39,40,41 y 42). La administración de ketotifen induce un aumento significativo del peso lobular hepático en las ratas PSO (LLD: $p < 0.001$; LC: $p < 0.05$; LM: $p < 0.01$ y LLI: $p < 0.05$). Por el contrario, en las ratas colestásicas la administración del fármaco no produce cambios significativos en el peso lobular hepático (tabla 3; figuras 39,40,41 y 42).

Tabla 3: Relación de los pesos lobulares hepáticos respecto del peso hepático total (LM: lóbulo medio; LLI: lóbulo lateral izquierdo; LLD: lóbulo lateral derecho; LC: lóbulo caudado y PH: peso hepático) en las ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K).

Grupo	LM/PH x100	LLI/PH x100	LC/PH x100	LLD/PH x100
PSO (n=15)	22,15±4,15	22,96±4,37	6,73±1,74	17,75±3,66
CMQ (n=16)	25,75±5,57	30,81±6,88*	12,10±4,21***	28,71±5,45***
PSO+K (n=13)	30,76±3,66**•	33,04±2,10*	9,74±1,29*	26,36±2,86***
CMQ+K (n=17)	29,68±5,42*	32,59±7,96*	10,93±3,15**	26,77±3,68***

Media ± DE; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001: valor ES respecto a PSO; •p<0.05: valor ES respecto de CMQ.

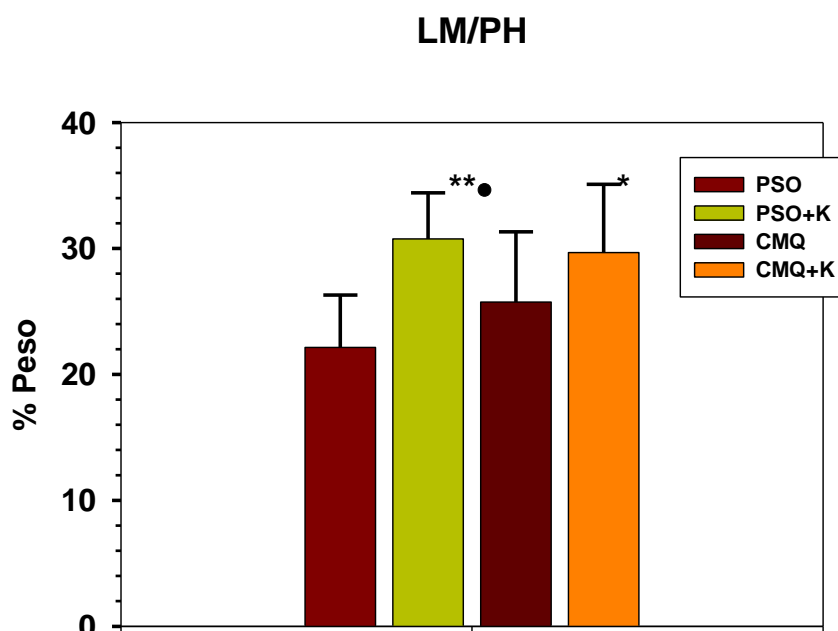


Figura 39: Relación del peso del lóbulo medio respecto del peso hepático total (LM/PH) en las ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K). Media ± DE; *p<0.05; **p<0.01: valor ES respecto a PSO; •p<0.05: valor ES respecto de CMQ.

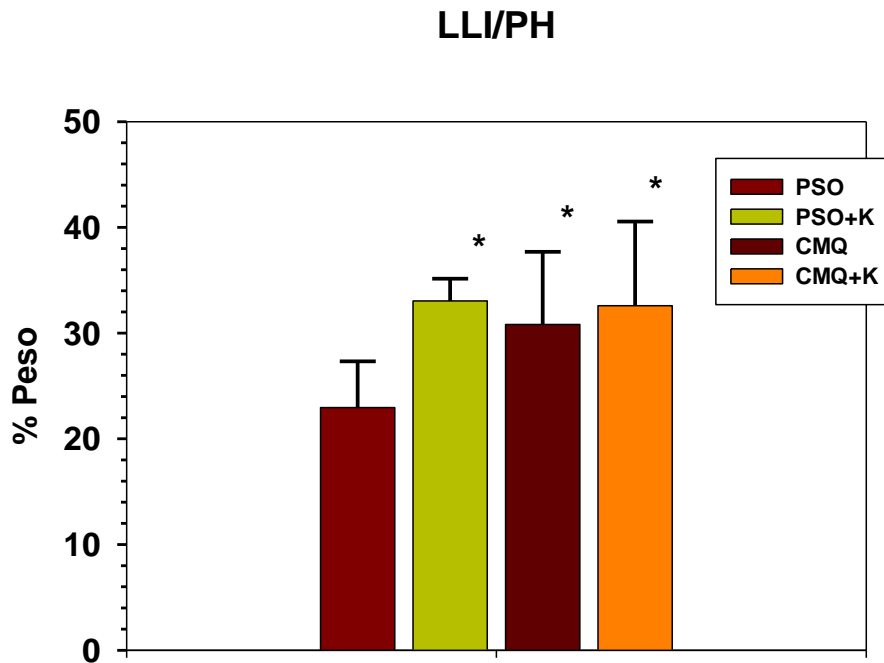


Figura 40: Relación del peso del lóbulo laterla izquierdo respecto del peso hepático total (LLI/PH) en las ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K). Media ± DE; * $p < 0.05$: valor ES respecto a PSO.

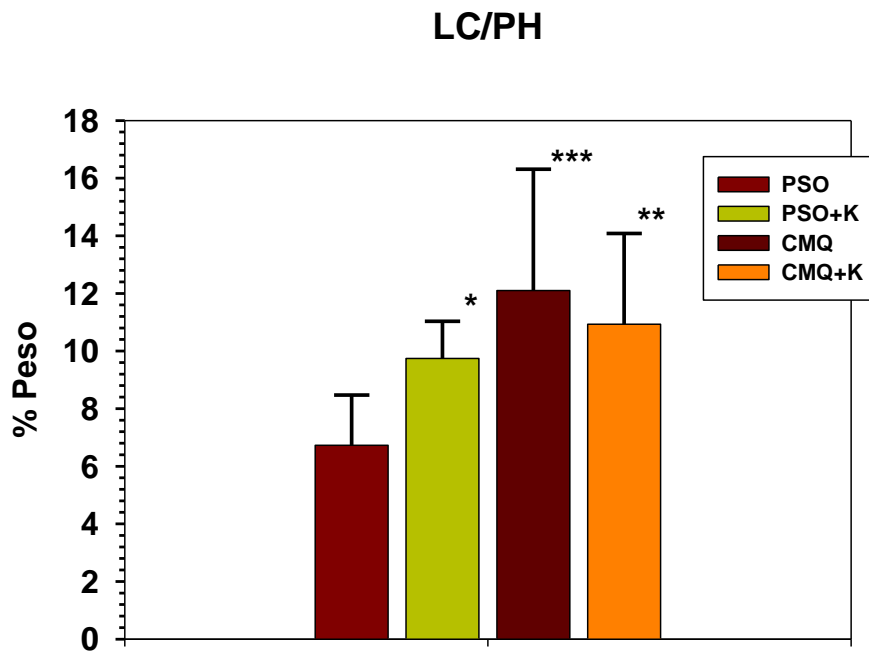


Figura 41 : Relación del peso del lóbulo caudado respecto del peso hepático total (LC/PH) en las ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K). Media ± DE; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO.

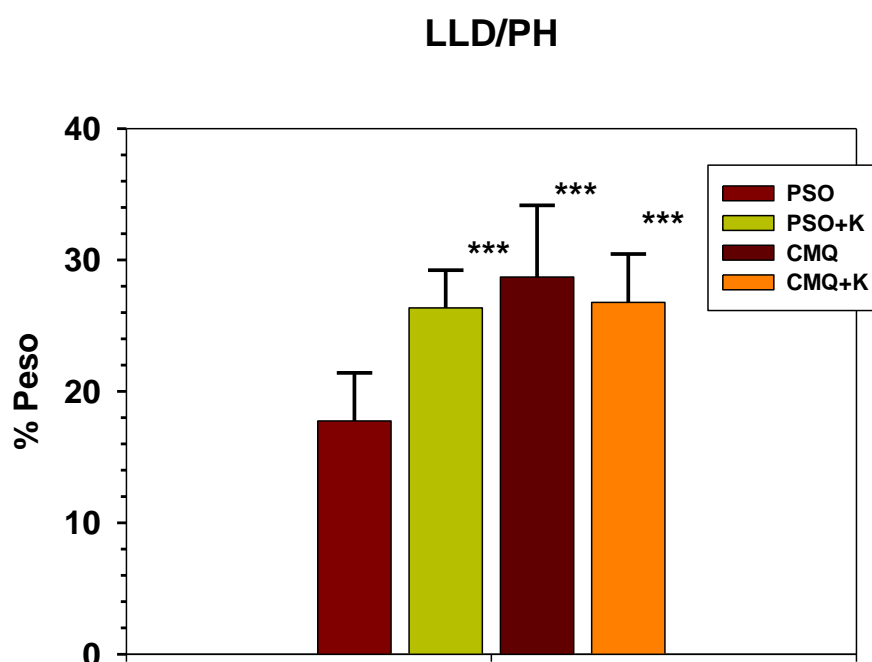


Figura 42: Relación del peso del lóbulo lateral derecho respecto del peso hepático total (LLD/PH) en las ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén P (SO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K). Media \pm DE; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO.

5. EVOLUCIÓN DEL PESO ESPLÉNICO.

Todos los animales con colestasis, tanto los tratados como los no tratados con ketotifen, mostraron esplenomegalia, siendo el aumento del peso esplénico (PE) significativo ($p < 0.001$) respecto de las ratas pseudo-operadas (tabla 4; figuras 43 y 44). La administración de ketotifen reduce ($p < 0.001$) la esplenomegalia en las ratas con colestasis, en tanto que no cambia el PE en las ratas pseudo-operadas (tabla 4; figura 43). Sin embargo, cuando el peso esplénico se considera respecto del peso corporal, las diferencias en el peso entre las colestasis tratadas y las no tratadas no son significativas (tabla 4; figura 44).

Tabla 4: Peso esplénico (PE) y relación entre el PE y el peso corporal total (PC) en las ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K).

Grupo	PE(g)	(PE/PC)x100
PSO(n=15)	0,78±0,09	0,19±0,02
CMQ(n=16)	2,03±0,41***	0,58±0,11***
PSO+K(n=13)	0,72±0,09●●●	0,18±0,02●●●
CMQ+K(n=17)	1,57±0,39***●●●ΔΔΔ	0,55±0,12***ΔΔΔ

Media ± DE; ***p<0.001: valor ES respecto a PSO; ●●●p<0.001; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔp<0.001; valor ES respecto de PSO+K;

Peso Esplénico

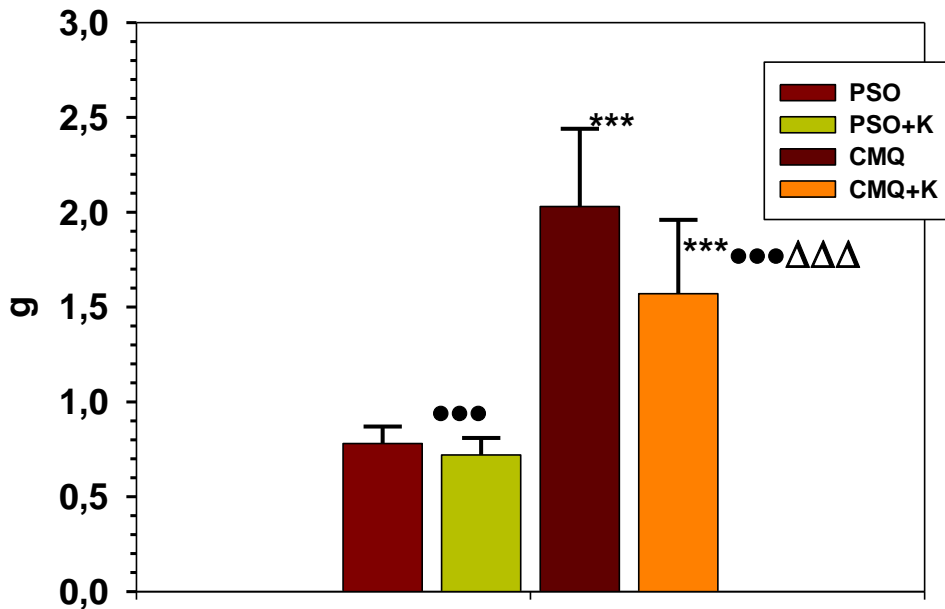


Figura 43 : PE en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K). Media ± DE; ***p<0.001: valor ES respecto a PSO; ●●●p<0.001; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔp<0.001; valor ES respecto de PSO+K;

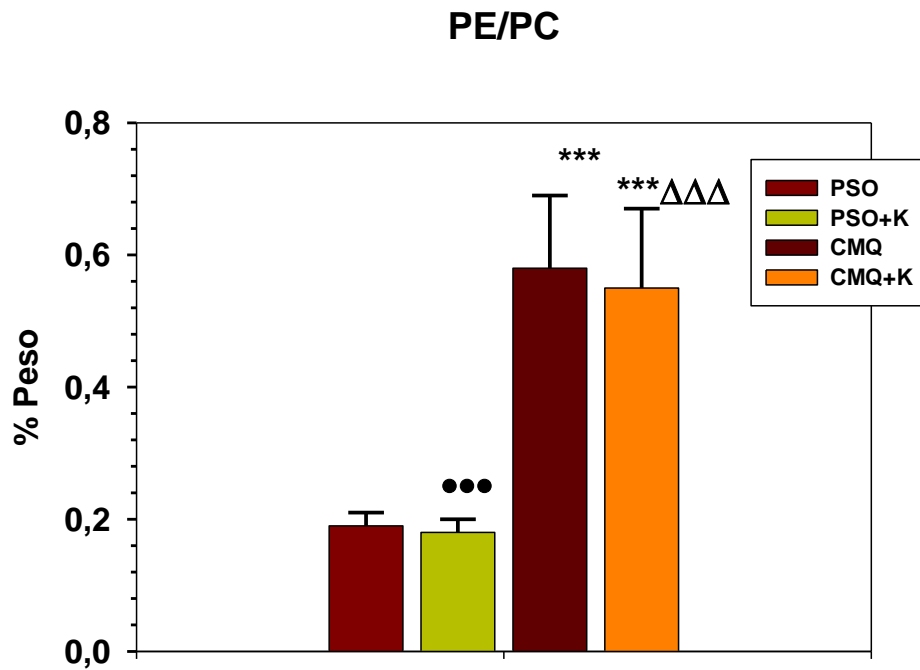


Figura 44 : Relación entre el PE y el peso corporal total (PC) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K). Media \pm DE; *** p <0.001; valor ES respecto a PSO; ●●● p <0.001; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ p <0.001; valor ES respecto de PSO+K.

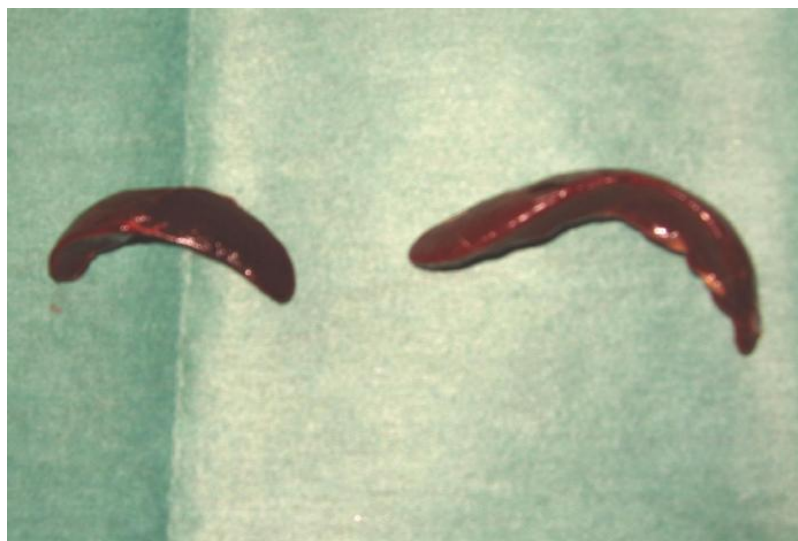


Figura 45: Fotografía comparativa del tamaño de un bazo de una rata con colestasis microquirúrgica (derecha) y de otra pseudo-operada (izquierda).

6. EVOLUCION DEL PESO TESTICULAR

En las ratas con colestasis, tratadas y no tratadas con ketotifen, se observaba atrofia testicular, siéndo el peso testicular inferior en éstos animales ($p<0.001$) respecto de los animales pseudo-operados (tabla 5; figuras 46 y 48). La administración del fármaco no varía el peso testicular en las ratas pseudo-operadas, en tanto que en las ratas con colestasis se produce un descenso ($p<0.01$) de dicho peso (tabla 5; figura 46). Cuando el peso testicular se considera respecto del peso corporal, la atrofia testicular es significativa ($p<0,01$) en las ratas con colestasis tratadas con ketotifén respecto a las pseudo-operadas (tabla 5; figura 47)

Tabla 5: Peso testicular (PT) y relación del peso testicular respecto al peso corporal total ((PT/PC)x100%) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K)

Grupo	PT(g)	(PT/PC)x100 %
PSO(n=15)	3,64±0,28	0,91±0,06
CMQ(n=16)	2,90±0,55 ^{***}	0,84±0,17
PSO+K(n=13)	3,56±0,16 ^{●●}	0,92±0,06
CMQ+K(n=17)	2,23±0,85 ^{***●●ΔΔΔ}	0,74±0,24 ^{**ΔΔ}

Media ± DE; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$: valor ES respecto a PSO; ●● $p<0.0$: valor ES respecto de CMQ; ΔΔ $p<0.01$; ΔΔΔ $p<0.001$: valor ES respecto de PSO+K.

Peso Testicular

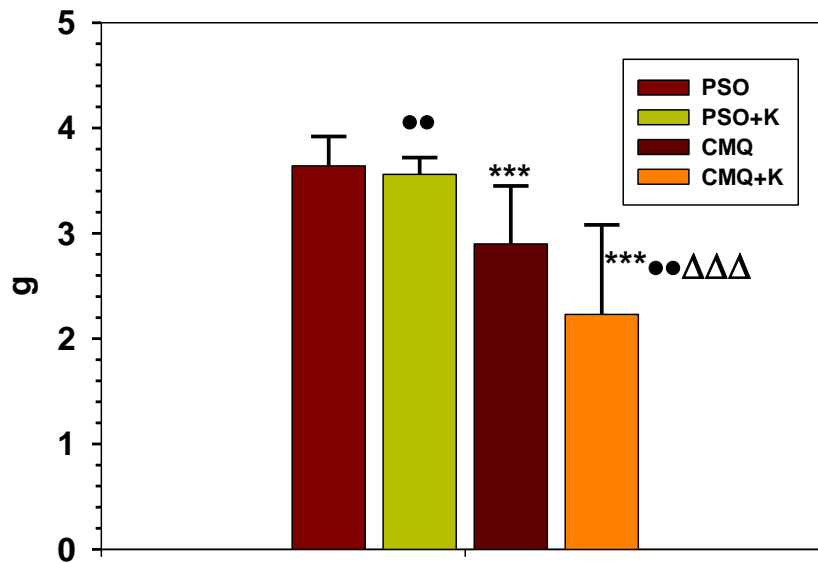


Figura 46: Peso testicular respecto en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K). Media \pm DE; *** p <0.001: valor ES respecto a PSO; •• p <0,01:valor ES respecto a CMQ; ΔΔ p <0.01: valor ES respecto de PSO+K.

PT/PC

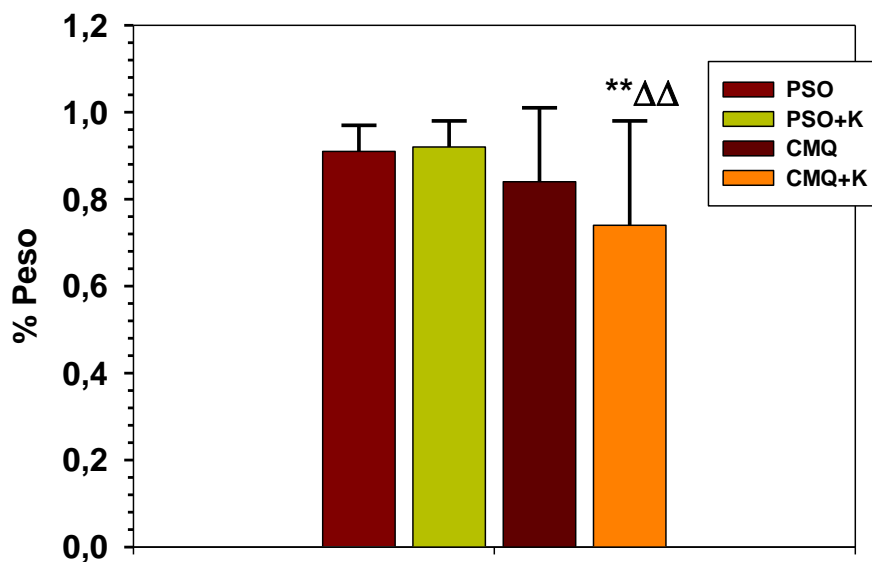


Figura 47: Relación del peso testicular respecto al peso corporal total (PT/PC)x100% en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K). Media \pm DE; ** p <0.0: valor ES respecto a PSO; ΔΔ p <0.01: valor ES respecto de PSO+K.



Figura 48: Fotografía comparativa de los testículos de una rata pseudo-operada (izquierda) y a la derecha de una rata con colestasis extrahepática microquirúrgica (CMQ) a las 8 semanas de la intervención.

7. CIRCULACION COLATERAL VENOSA PORTOSISTÉMICA

El desarrollo de circulación colateral portosistémica se produce en la mayor parte de las áreas anatómicas exploradas (paraesofágica, esplenorrenal y pararectal), así como en la mayoría de los animales con CMQ (tablas 6,7 y 8; figuras 49,50 y 51))

La mayor parte de los animales a los que se induce colestasis microquirúrgica (CMQ) desarrollan circulación colateral porto-sistémica de tipo *periesofágica* (PE)(78,56%)(figura 52). La administración de ketotifen a las ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ+K) produce un discreto aumento del desarrollo de éste tipo de circulación colateral (94.10%), si bien esta diferencia no es estadísticamente significativa. Además, en las ratas con colestasis tratadas con ketotifen (CMQ+K) los grados de desarrollo de vasos colaterales periesofágicos (grados ++ y +++) son más severos y también aumentan respecto de los animales colestásicos sin tratamiento (tabla 6; figura 49)

Tabla 6: Desarrollo de circulación colateral venosa portosistémica de tipo periesofágica (PE) en diferente grado en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en ratas con colestasis tratadas con ketotifén desde 24 h. antes de la intervención (CMQ+K) y durante todo el período post-operatorio de 8-9 semanas

GRUPO	NO	+	++	+++
CMQ (n=14)	3 (21,42%)	4 (28,57%)	2 (14,28%)	5 (35,71%)
CMQ+K (n=17)	1 (5,88%)	5 (29,41%)	3 (17,64%)	8 (47,05%)

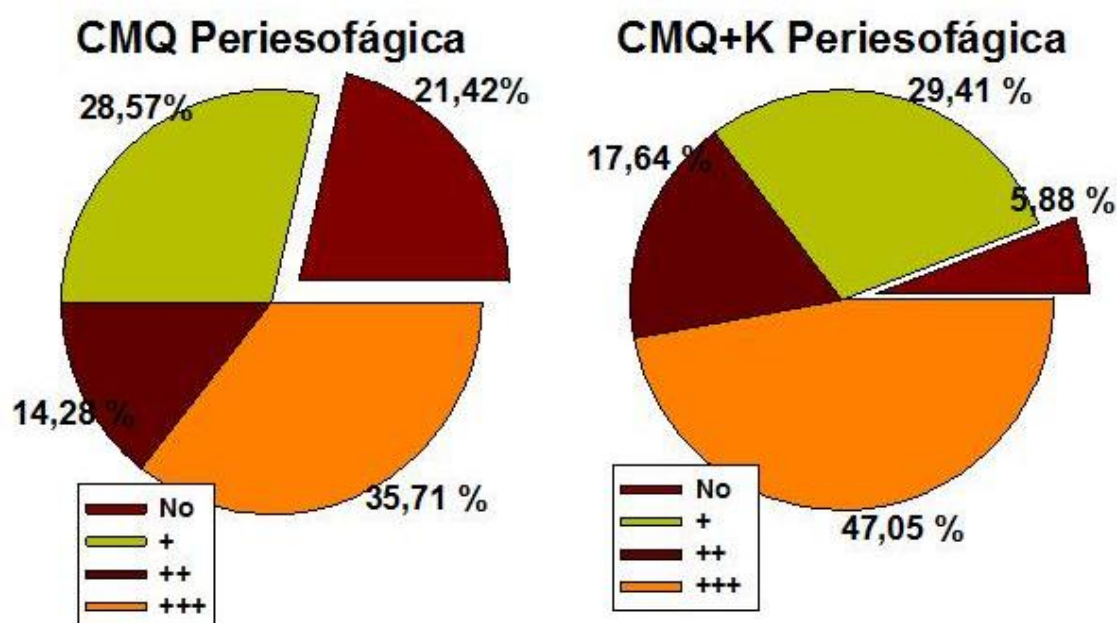


Figura 49: Circulación colateral porto-sistémica periesofágica en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K)

Este efecto pro-angiogénico de ketotifén cuando se administra a ratas con colestasis parece confirmarse también respecto de la circulación colateral porto-sistémica de tipo *esplenorrenal* (ER), ya que aunque todas las ratas con CMQ presentaron éste tipo de vasos colaterales, su desarrollo fue mayor cuando se administró el fármaco (tabla7; figuras 50 y 52)

IV-RESULTADOS

Tabla 7: Desarrollo de circulación colateral venosa portosistémica de tipo esplenorrenal (ER) en diferente grado en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K)

GRUPO	NO	+	++	+++
CMQ (n=11)	0	1 (9,09%)	2 (18,18%)	8 (72,72%)
CMQ+K (n=18)	0	0	8 (44,44%)	10 (55,55%)

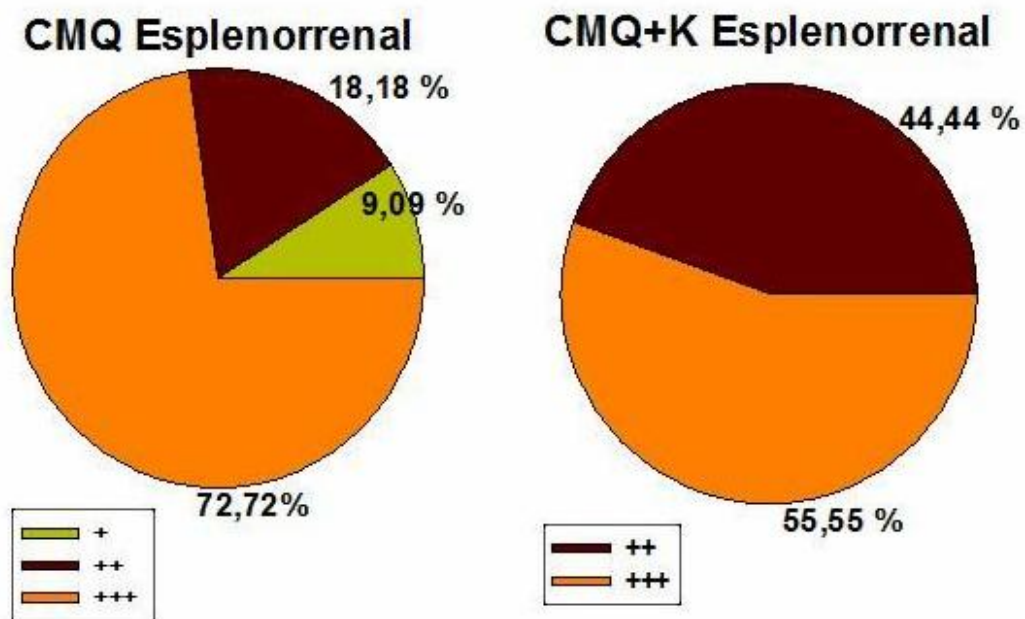


Figura 50: Circulación colateral postossistémica esplenorrenal en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K)

Igualmente, la administración de ketotifen induce un mayor desarrollo de circulación colateral de tipo *pararrectal* cuando se administra a ratas con colestasis microquirúrgica, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas (tabla 8; figura 51)

Tabla 8: Desarrollo de circulación colateral venosa portosistémica de tipo perirrectal (PR) en diferente grado ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K)

GRUPO	NO	+	++	+++
CMQ (n=10)	2 (20%)	2 (20%)	5 (50%)	1 (10%)
CMQ+K (n=17)	0	3 (17,64%)	7 (41,17%)	7 (41,17%)

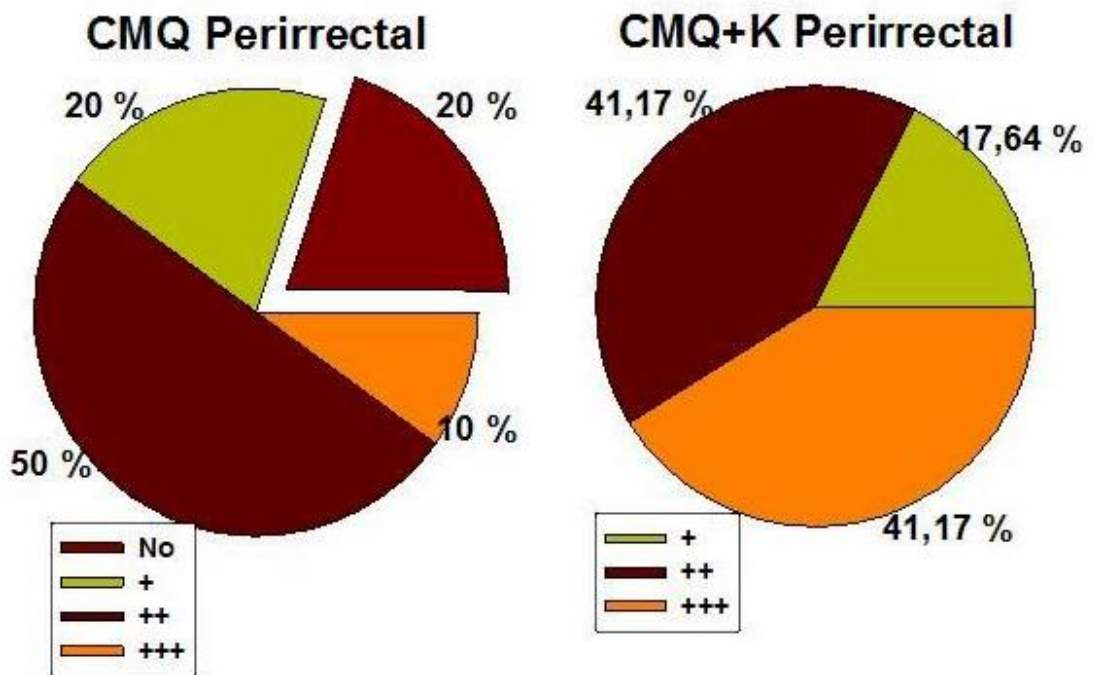


Figura 51: Circulación colateral porto-sistémica de tipo perirrectal en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K)

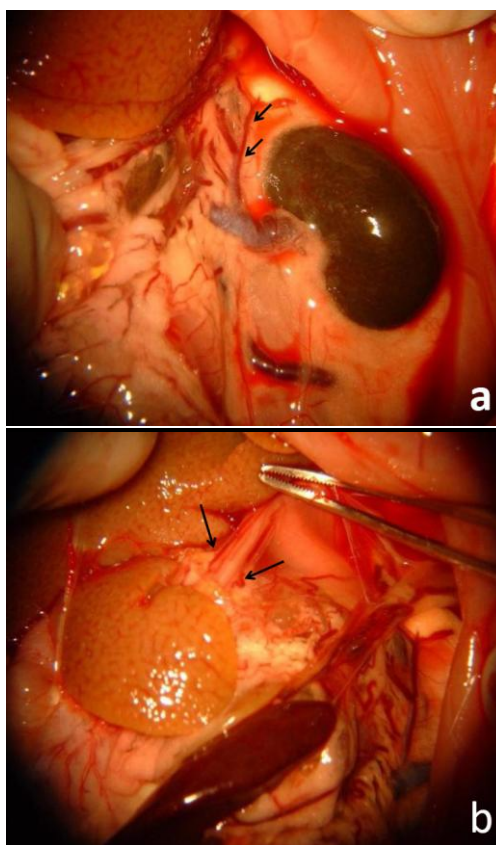


Figura 52: Imagen fotográfica en la que se observa la existencia de circulación colateral venosa **esplenorrenal** (a) y **paraesofágica** (b) en una rata con colestasis microquirúrgica extrahepática a las 8 semanas del postoperatorio

8. VASCULOPATIA VENOSA MESENTERICA

Prácticamente todos los animales con colestasis presentaron vasculopatía venosa mesentérica, si bien en los que fueron tratados con ketotifen el desarrollo de éste tipo de vasculopatía fue mayor, en particular el grado 2, caracterizado por un aspecto de gran dilatación y tortuosidad de los vasos mesentéricos (tabla 9; figuras 53 y 54)

Tabla 9: Desarrollo de vasculopatía venosa mesentérica (VVM) en diferentes grados (0,1 y 2) en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K)

GRUPO	G-0	G-1	G-2
CMQ (n=16)	1 (6,25%)	6 (37,5%)	9 (56,25%)
CMQ+K (n=17)	0	4 (23,52%)	13 (76,47%)

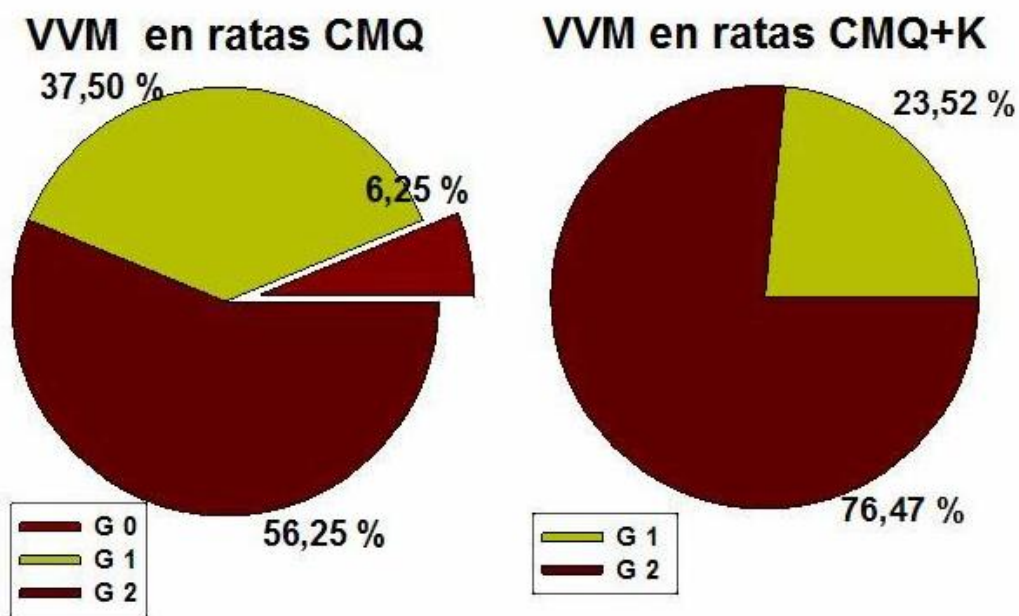


Figura 53: Grados de vasculopatía venosa mesentérica en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén (CMQ+K)

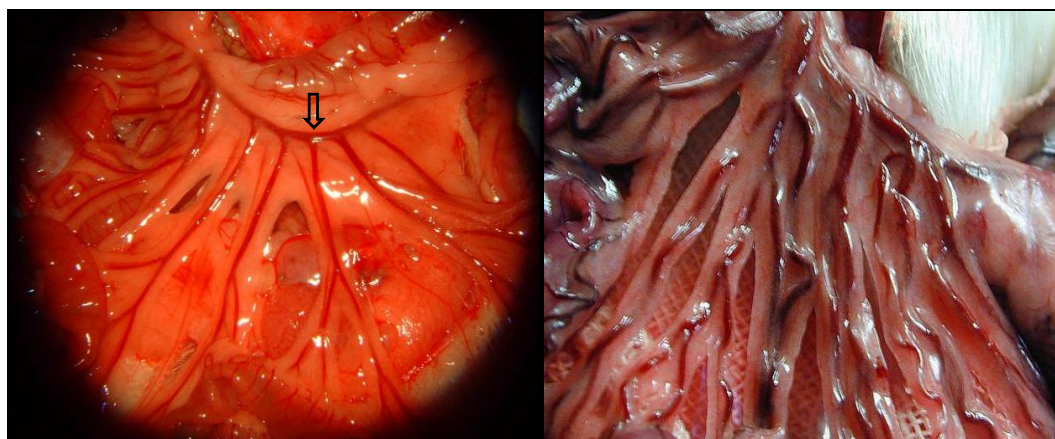


Figura 54: Vasculopatía venosa mesentérica: A la izquierda rata pseudo-operada en la que se observan la vena mesentérica superior (flecha) y sus ramas. A la derecha rata con CMQ en la que se aprecia vasculopatía de grado I, con dilatación y tortuosidad tras el clampaje de la vena mesentérica superior.

9. PRESIÓN PORTAL

Las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica, tanto las tratadas con ketotifen como las que no recibieron éste fármaco, presentan mayores valores de presión portal respecto a las ratas pseudo-operadas ($p < 0,001$) (tabla 10; figura 55). Curiosamente la administración de ketotifen a las ratas PSO induce un incremento ($p < 0,01$) de la presión portal, en tanto en las ratas colestásicas parece producir un descenso (tabla 10; figura 55).

Tabla 10: Presión portal (PP; Hg) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K)

Grupo	Presión Portal (mmHg)
PSO (n=14)	8,25±2,33
CMQ (n=17)	13,43±2,33 ^{***}
PSO+K (n=15)	10,29±2,12 ^{**•}
CMQ+K (n=15)	11,28±5,80 ^{***}

Media ± DE; ^{**}p<0.01; ^{***}p<0.001: valor ES respecto a PSO; [•]p<0.05: valor ES respecto de CMQ.

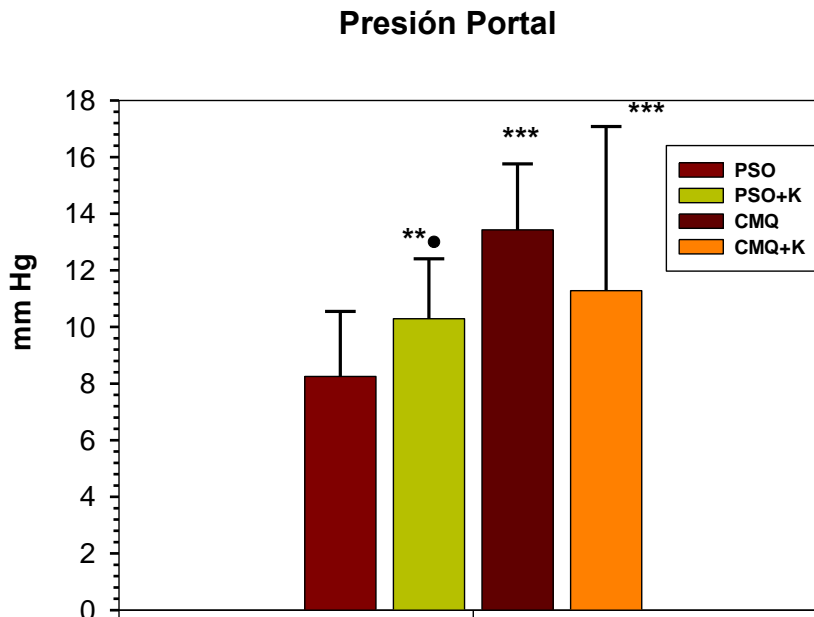


Figura 55 : Presión portal (PP; Hg) en ratas pseudo-operadas (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K). Media ± DE; ^{**}p<0.01; ^{***}p<0.001: valor ES respecto a PSO; [•]p<0.05: valor ES respecto de CMQ.

10. ASCITIS:

10. a. Presencia de ascitis.

La mayor parte de los animales con colestasis microquirúrgica presentaban ascitis al final del período post-operatorio de 8-9 semanas, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las ratas con colestasis sin tratar respecto a las que sí fueron tratadas con ketotifén. (tabla 11; figura 56).

Tabla 11: Porcentaje de animales con colestasis microquirúrgica (CMQ) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K) que presentaban ascitis.

Grupo	Si	No
CMQ (n=15)	12 (80%)	3 (20%)
CMQ+K (n=18)	14 (77,77%)	4 (22,22%)

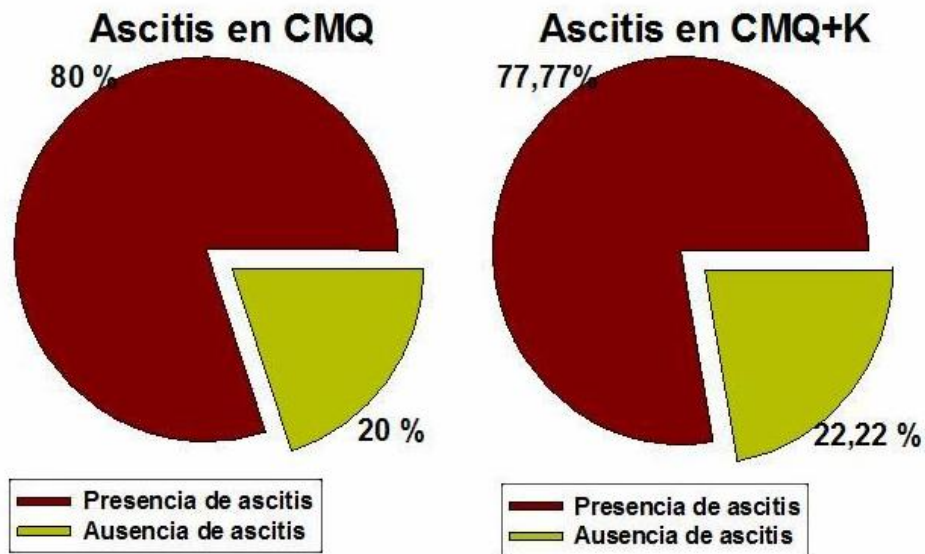


Figura 56: Presencia de Ascitis en ratas con colestasis microquirúrgica(CMQ) y colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén(CMQ+K)

10.b. Volumen de líquido ascítico

Respecto del volumen de líquido ascítico, aunque la administración de ketotifen parece reducirlo cuando es administrado a ratas con colestasis, tras la comparación estadística mediante la T de Student para la igualdad de medias la diferencia no es estadísticamente significativa (tabla 12 ; figura 57)

Tabla 12: Volumen de ascitis en las ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en las ratas con colestasis tratadas con ketotifén desde 24 horas. antes de la intervención y durante todo el periodo postoperatorio. (CMQ+K)

Grupo	Ascitis (ml)
CMQ(n=9)	6,88±5,35
CMQ+K(n=14)	3,71±2,70

Media ± DE;

Volumen de Ascitis

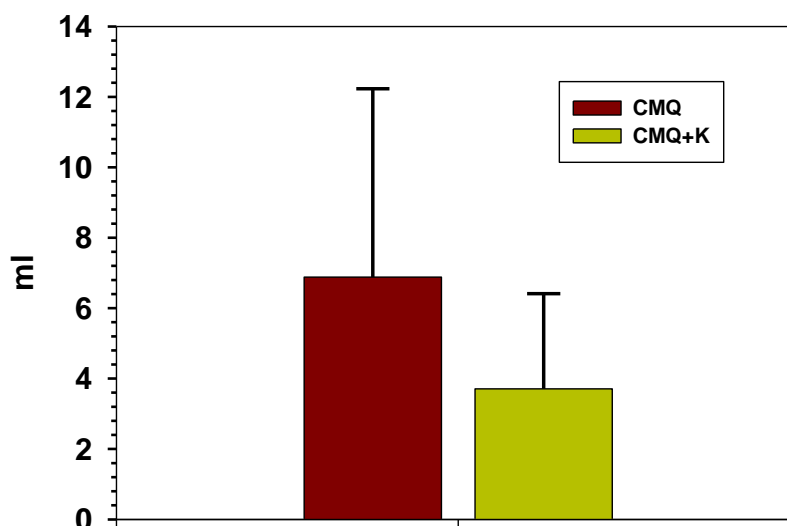


Figura 57: Volumen de ascitis en las ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en las ratas con colestasis tratadas con ketotifén desde 24 horas. antes de la intervención y durante todo el periodo p.o. (CMQ+K). Media ± DE.

10. c. Concentraciones de proteína relacionada con el gen de la Calcitonina (CGRP) y de Interleuquina 13 (IL-13) en el liquido ascítico.

Las ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K) presentan niveles de IL-13 disminuidos ($p < 0,01$) respecto a las no tratadas (CMQ)(tabla 13; figura 58). Las ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K) presentan niveles de CGRP disminuidos ($p < 0,001$) respecto a las no tratadas (CMQ)(tabla 13; figura 59).

Tabla 13: Concentraciones de CGRP y de IL-13 en el líquido ascítico en las ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en las ratas con colestasis tratadas con ketotifén desde 24 horas. antes de la intervención y durante todo el periodo post-operatorio. (CMQ+K.) Media ± DE.

Grupo	IL-13(pg/mg prot)	CGRP(pg/mg prot)
CMQ(n=9)	8,74±0,12	43,97±3,81
CMQ+K(n=8)	3,81±0,22**	13,67±1,22***

Media ± DE; CMQ, **p<0,01 y CMQ+K, *** p<0,001.

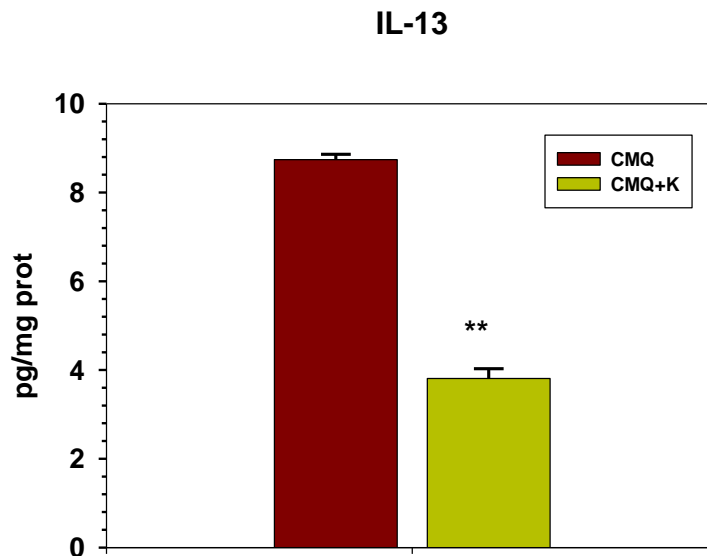


Figura 58: Concentraciones de IL-13 en el líquido ascítico en las ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en las ratas con colestasis tratadas con ketotifén desde 24horas. antes de la intervención y durante todo el periodo p.o. (CMQ+K); Media ± DE.

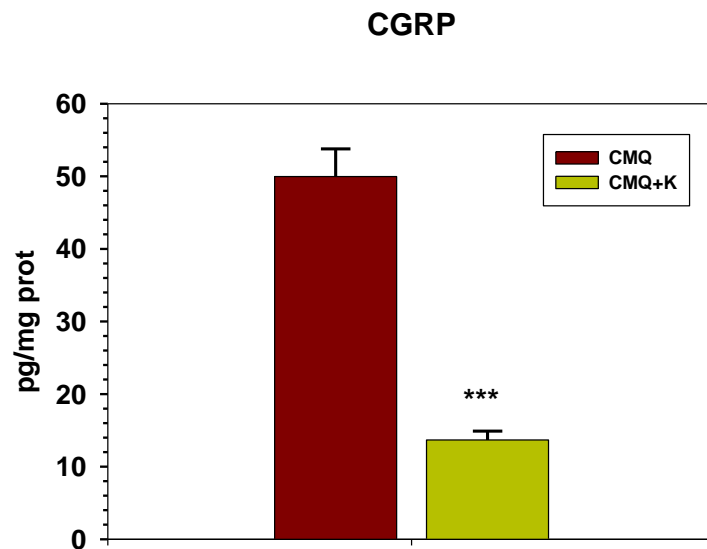


Figura 59: Concentraciones de CGRP en el líquido ascítico en las ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en las ratas con colestasis tratadas con ketotifén desde 24horas. antes de la intervención y durante todo el periodo p.o. (CMQ+K); Media ± DE.

11. BIOQUIMICA SANGUINEA:

11a. BT, BD, ALP y acidos biliares:

Las concentraciones séricas de parámetros marcadores de lesión biliar muestran una evolución similar. Así, los niveles de bilirrubina total, bilirrubina directa, ALP y acidos biliares aumentan ($p < 0.001$), en todos los animales colestásicos respecto de los pseudo-operados, independientemente de la administración de ketotifen (tabla 14; figuras 61,62,63 y 64). Por otro lado éste aumento es inferior ($p < 0.001$), cuando se administraba ketotifen, salvo para la ALP (tabla 14; figuras 61,62,63 y 64).

Tabla 14: Concentraciones séricas de bilirrubina total (BT;mg/dl), bilirrubina directa (BD;mg/dl), ALP(U/L) y acidos biliares (Ac.Bil; $\mu\text{mol/L}$) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén

SERIE	PSO (n=15)	CMQ (n=16)	PSO+K (n=13)	CMQ+K (n=17)
BT (mg/dl)	0,086 \pm 0,04	8,17 \pm 1,76 ^{***}	0,86 \pm 2,60 ^{•••}	7,81 \pm 2,94 ^{***$\Delta\Delta\Delta$}
BD (mg/dl)	0,014 \pm 0,007	4,92 \pm 1 ^{***}	0,44 \pm 1,52 ^{•••}	4,38 \pm 1,68 ^{***$\Delta\Delta\Delta$}
ALP (U/L)	112,34 \pm 34,12	284,88 \pm 69,30 ^{***}	139,62 \pm 128,93 ^{•••}	336,35 \pm 109,90 ^{***$\Delta\Delta\Delta$}
Ac.Bil. ($\mu\text{mol/L}$)	6,78 \pm 2,92	42,84 \pm 17,61 ^{***}	7,91 \pm 5,24 ^{•••}	31,93 \pm 12,28 ^{***$\bullet\Delta\Delta\Delta$}

Media \pm DE; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; • $p < 0.05$; •• $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ; $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$: valor ES respecto de PSO+K.

Bilirrubina Total

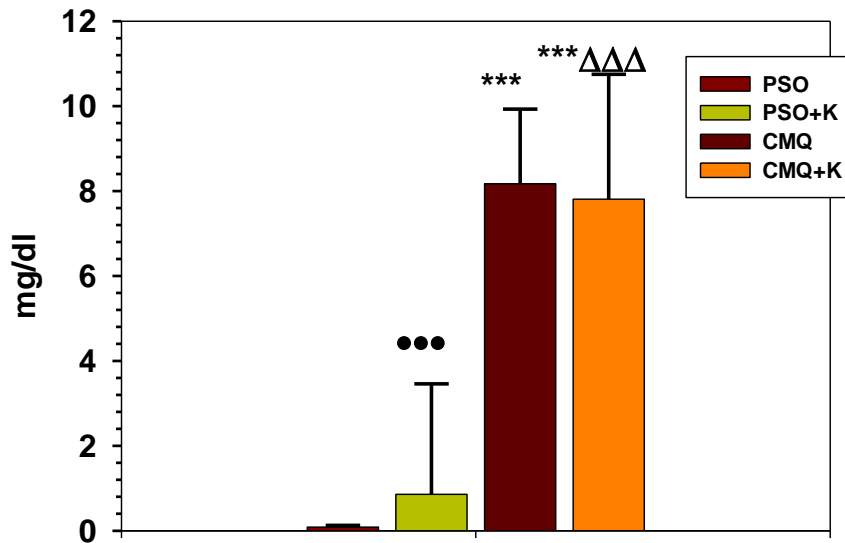


Figura 61: Concentración sérica de bilirrubina total (BT;mg/dl), en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. Media ± DE; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; ••• $p < 0.001$; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO+K.

Bilirrubina Directa

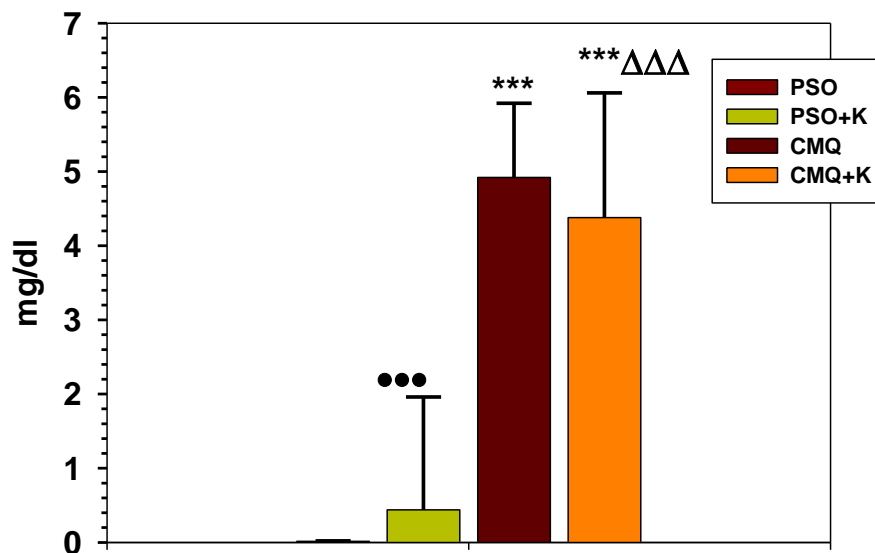


Figura 62 : Concentración sérica de bilirrubina directa (BD;mg/dl) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. Media ± DE; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; ••• $p < 0.001$; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO+K.

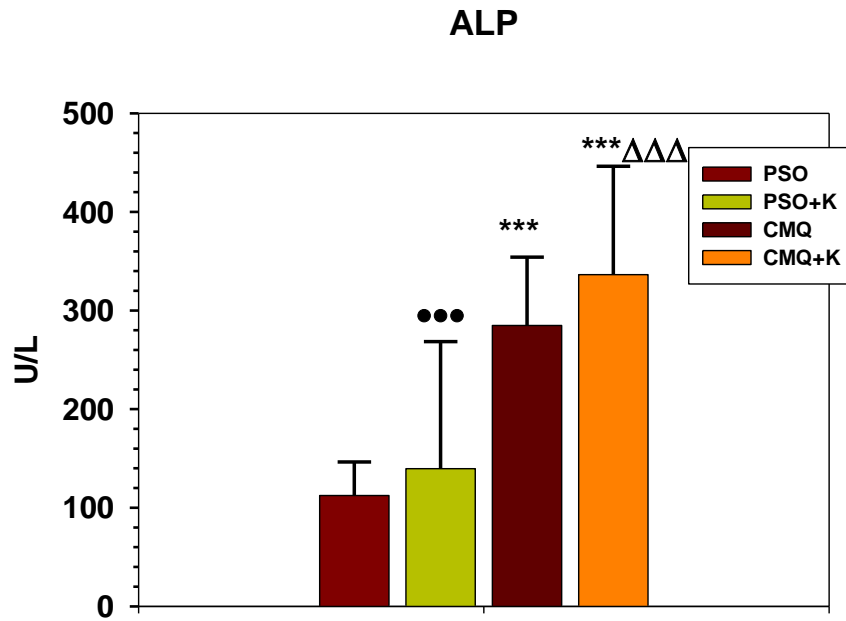


Figura 63 : Concentración sérica de fosfatasa alcalina (ALP) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén Media \pm DE; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; ••• $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO+K.

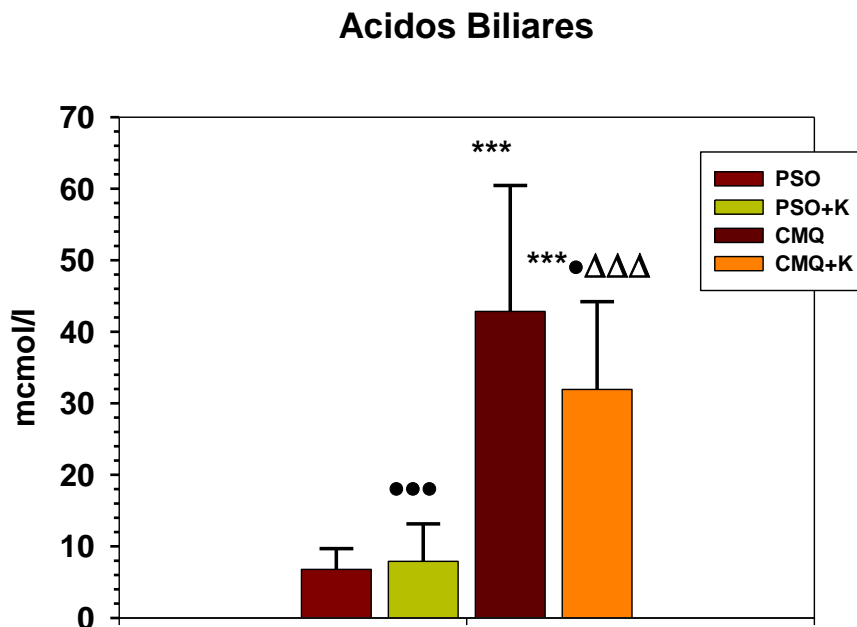


Figura 64 : Concentración sérica de ácidos biliares ($\mu\text{mol/L}$) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén Media \pm DE; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; • $p < 0.05$; ••• $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO+K.

11b. AST, ALT, cociente AST/ALT, GGT, LDH

Respecto de los parámetros considerados de lesión hepatocitaria, las concentraciones séricas de aspartato aminotransferasa (AST) aumentan de forma significativa ($p < 0.001$) en todas las ratas con colestasis, no existiendo diferencias relacionadas con la administración de ketotifen (tabla 15; figura 65). Por el contrario, los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) son menores ($p < 0.01$) en las ratas con colestasis respecto de las ratas pseudo-operadas (tabla 15; figura 66). El índice AST/ALT muestra unas variaciones similares a las de AST con incremento en las ratas con colestasis respecto a las pseudo-operadas siendo este mayor en las tratadas con ketotifén ($p < 0,001$)(tabla 15; figura 67). La concentración sérica del enzima gamma-glutamyltranspeptidasa (GGT) aumenta en las ratas colestásicas tratadas con ketotifén respecto de las pseudo-operadas tratadas (tabla 15; figura 68). Y, por último, los niveles séricos de lactato deshidrogenasa (LDH) son menores en las ratas colestasicas (tabla 15; figura 69).

Tabla 15: Concentraciones séricas de aspartato aminotransferasa (AST;U/L), alanina aminotransferasa (ALT;U/L), cociente AST/ALT, gamma glutamyltransferasa (GGT;U/L) y lactato deshidrogenasa (LDH;U/L) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén.

SERIE	PSO (n=15)	CMQ (n=16)	PSO+K (n=13)	CMQ+K (n=17)
AST (U/L)	146,66±77,31	245,06±78,53 ^{***}	130,23±84,01 ^{●●●}	249±82,84 ^{***ΔΔΔ}
ALT (U/L)	53,5±29,76	27,32±11,36 ^{**}	37,85±31,03	27,94±13,61 ^{**}
AST/ALT	2,92±1,61	10,07±3,87 ^{***}	3,77±1,47 ^{●●●}	12,98±6,91 ^{***ΔΔΔ}
GGT (U/L)	—	—	4,00±10,51	37,88±19,32
LDH (U/L)	1013±497,81	967,76±388,69	1181,07±1318,81	541,28±265,52

Media ± DE; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO+K.

Aspartato Aminotransferasa (AST)

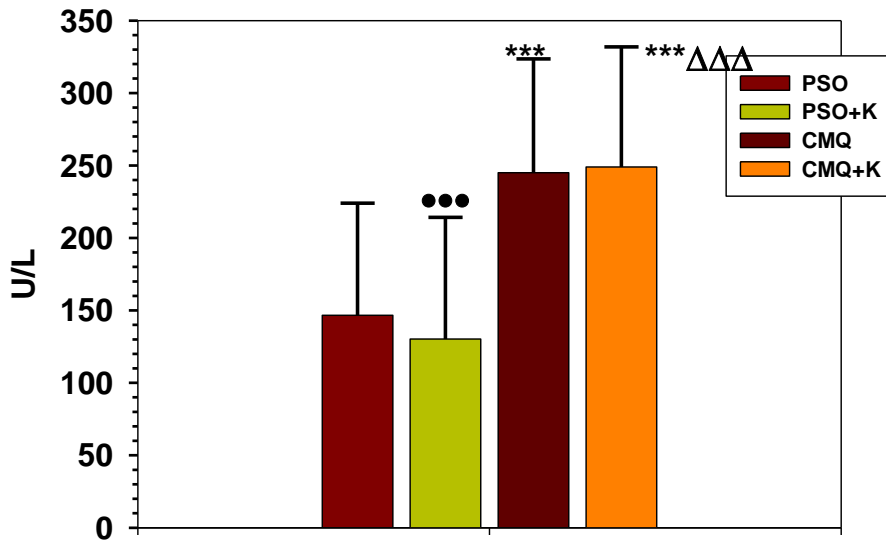


Figura 65 : Concentración sérica de aspartato aminotransferasa (AST) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén Media ± DE; ***p<0.001: valor ES respecto a PSO; •••p<0.001; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔp<0.001; valor ES respecto de PSO+K.

Alanina Aminotransferasa (ALT)

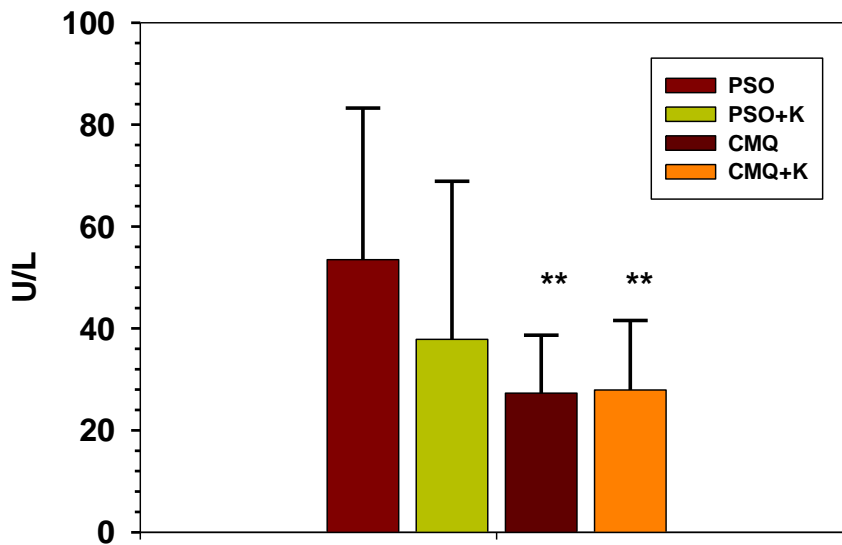


Figura 66 : Concentración sérica de alanina aminotransferasa (ALT) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén Media ± DE; **p<0.01: valor ES respecto a PSO.

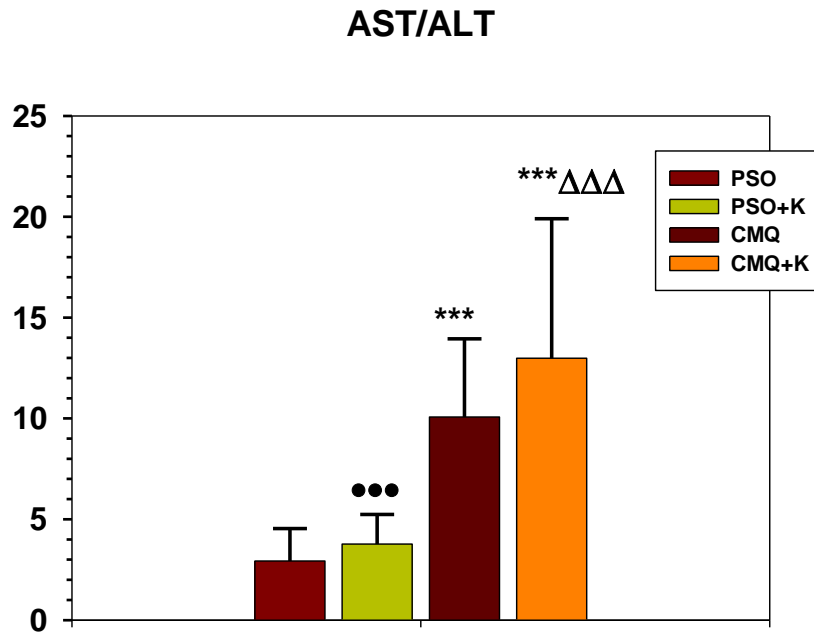


Figura 67: Índice AST/ALT en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén Media ± DE; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; ••• $p < 0.001$; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p < 0.001$; valor ES respecto de PSO+K.

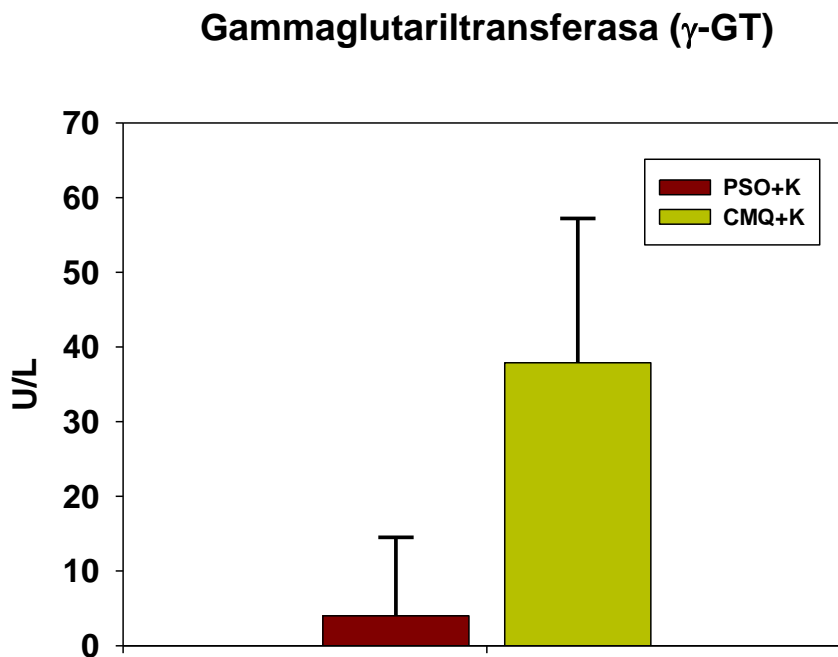


Figura 68 : Concentración sérica de **Gamma-glutamyltransferasa (γ-GT)** en ratas pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén Media ± DE

Lactato Deshidrogenasa (LDH)

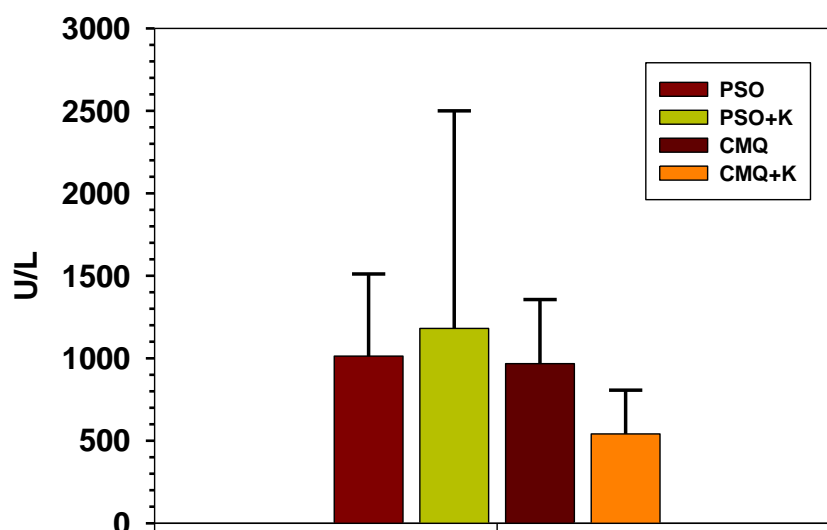


Figura 69 : Concentración sérica de lactato-dehidrogenasa (LDH) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén Media \pm DE.

11c. Proteínas totales, albumina, urea, creatinina y TGF- β 1.

Las concentraciones séricas de proteínas totales descienden ($p < 0.001$) en las ratas colestásicas respecto de los animales pseudo-operados. Sin embargo, cuando se administraba ketotifén la hipoproteinemía era inferior ($p < 0.05$) (tabla 16; figura 70). Las concentraciones séricas de albúmina descienden ($p < 0.001$) en las ratas con colestasis, no apreciándose en éste caso el efecto beneficioso del ketotifén en las ratas colestasicas, sin embargo se observa en las ratas pseudo-operadas un descenso de los niveles de albúmina respecto a las pseudo-operadas a las que se administra el fármaco ($p < 0,05$) (tabla 16; figura 71).

Por otro lado, los niveles séricos de urea presentan descenso en las ratas colestasicas tratadas respecto a las pseudo-operadas (tabla 16; figuras 72) y los de creatinina son similares en las ratas con colestasis y en las ratas pseudo-operadas no teniendo efecto la administración de ketotifén. (tabla 16; figuras 73)

Por ultimo los niveles de TGF- β 1 en ratas colestásicas se encuentran disminuidos respecto a las pseudo-operadas no teniendo efecto la administración de ketotifén (tabla 16; figura 74)

Tabla 16: Concentraciones séricas de proteínas totales(g/dl), albúmina (g/dl), urea(mg/dl) y creatinina (mg/dl), en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén

SERIE	Prot.Tot. (g/dl)	Albumina (g/dl)	Urea (mg/dl)	Cr. (mg/dl)	TGF-β ₁ (ng/dl)
PSO (n=15)	5,97±0,38	3,02±0,14	–	0,55±0,03	45,83±42,63
CMQ (n=16)	4,28±0,96 ^{***}	1,62±0,41 ^{***}	–	0,57±0,06	34,46±14
PSO+K (n=13)	5,83±0,45 ^{●●●}	2,71±0,43 ^{●●●}	45,98±5,68	0,55±0,05	44,23±66,25
CMQ+K (n=17)	5,04±0,88 ^{***●ΔΔ}	1,60±0,49 ^{***ΔΔΔ}	36,12±7,70	0,54±0,09	33,85±16,53

Media ± DE; *p<0.05; ***p<0.001: valor ES respecto a PSO; ●p<0.05; ●●●p<0.001; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔp<0.001; valor ES respecto de PSO+K

Proteínas Totales

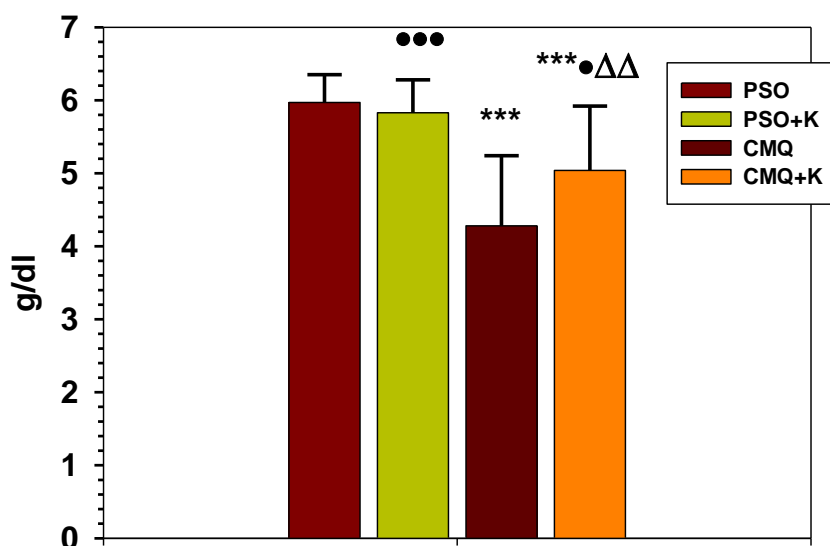


Figura 70 : Concentración sérica de proteínas totales (g/dL) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén Media ± DE; ***p<0.001: valor ES respecto a PSO; ●p<0.05; ●●●p<0.001: valor ES respecto de CMQ; ΔΔp<0.01: valor ES respecto de PSO+K.

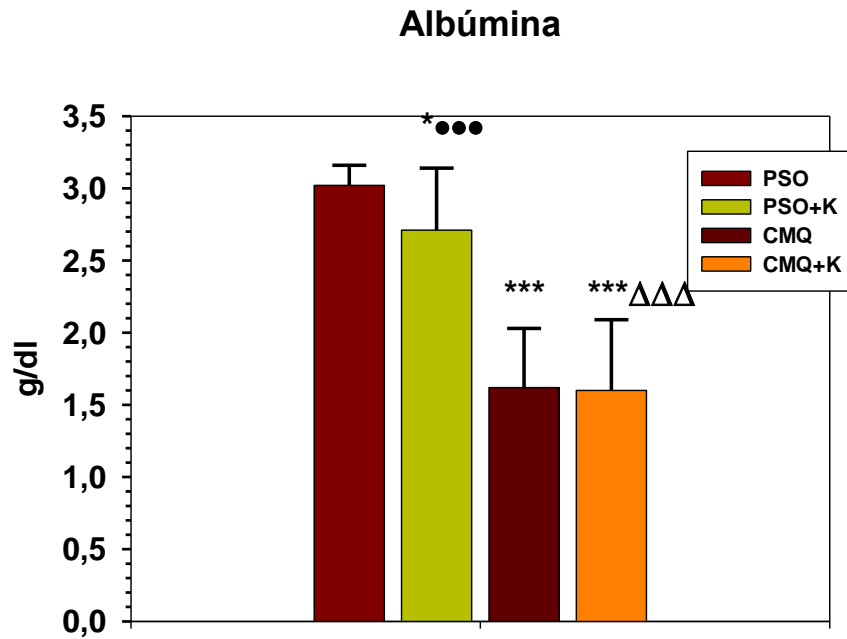


Figura 71 : Concentración sérica de albúmina (g/dL) en ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén Media \pm DE; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO+K.

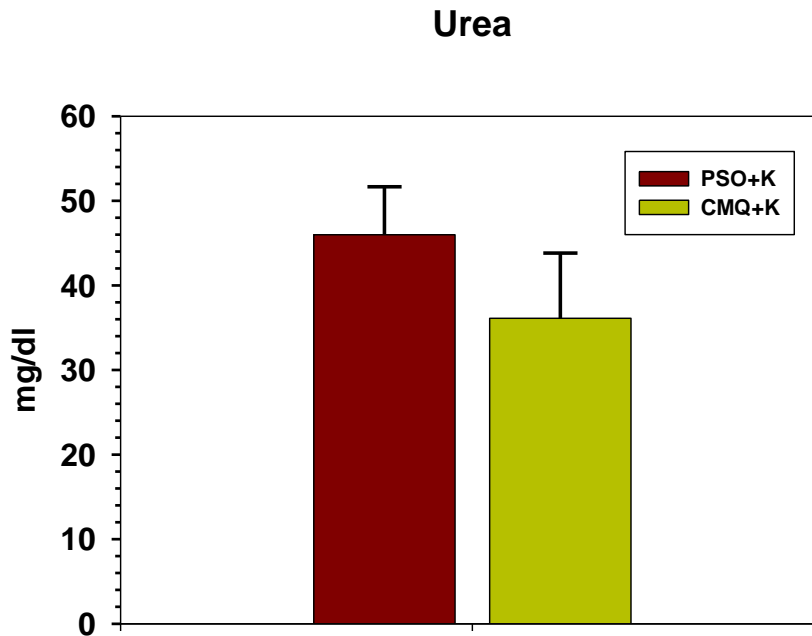


Figura 72 : Concentración sérica de urea m(g/dL) en ratas pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén Media \pm DE.

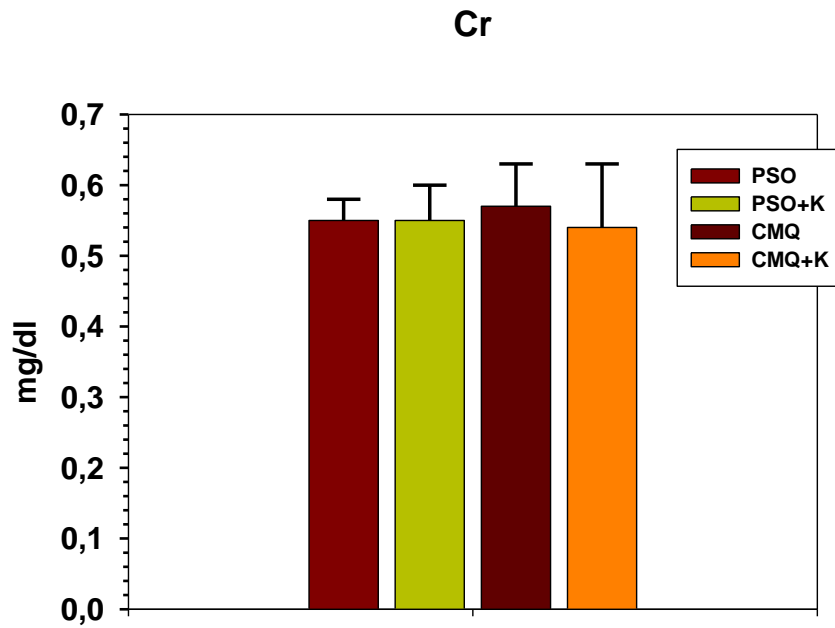


Figura 73: Concentración sérica de creatinina (g/dl) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén Media \pm DE.

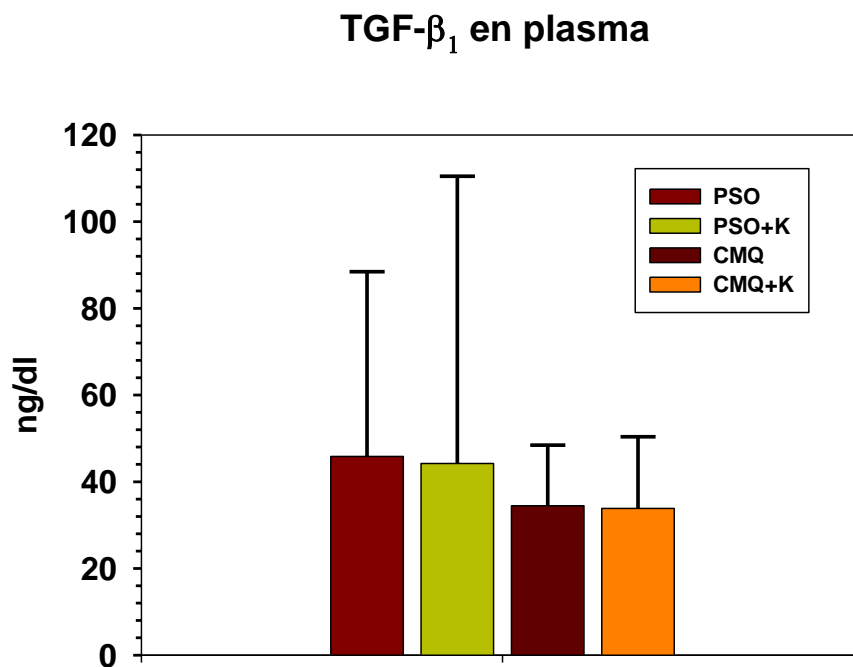


Figura 74: TGF- β_1 en plasma de ratas pseudo-operadas (PSO) y con colestasis microquirúrgica (CMQ) con y sin tratamiento profiláctico con ketotifén.

12. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LÍPIDOS Y LIPOPROTEINAS

Los niveles de ácidos grasos libres (NEFA's) disminuyen ($p < 0,001$) en las ratas colestásicas respecto a las pseudoperadas. Así mismo se produce también un descenso ($p < 0,001$) de los niveles de NEFA's tras la administración de ketotifén. (tabla 17; figura 75).

La concentración sérica de colesterol aumenta en las ratas con colestasis, tanto en las que se administró ketotifen, como en las que no fueron tratadas con dicho fármaco ($p < 0,001$) aunque no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y no tratados (tabla 17; figura 76). Los niveles de triglicéridos presentan un discreto aumento en las ratas colestásicas tratadas con ketotifén respecto a las pseudo-operadas y a las colestasicas no tratadas ($p < 0,05$) (tabla 17; figura 77).

Respecto de los niveles séricos de lipoproteínas, las lipoproteínas de alta densidad (*High-density lipoproteins; HDL-c*) disminuyeron ($p < 0,05$) en las ratas con colestasis respecto de las pseudo-operadas, en tanto que la administración de ketotifen aumentó significativamente ($p < 0,001$) éstas lipoproteínas (tabla 17; figura 78). Las lipoproteínas de baja densidad (*Light-density lipoproteins; LDL-c*) aumentaron ($p < 0,001$) en todas las ratas con colestasis no habiendo diferencias tras la administración de ketotifén (tabla 17; figura 79). Por último, las concentraciones séricas de lipoproteínas de muy baja densidad (*Very Light-density lipoproteins; VLDL-c*) presentaron un aumento en las ratas colestasicas respecto a las pseudo-operadas ($p < 0,001$) aunque aumentaron más en las ratas colestásicas tratadas con ketotifen ($p < 0,001$) que en las que no se administró ketotifen ($p < 0,01$) (tabla 17; figura 80).

IV-RESULTADOS

Tabla 17: Concentraciones séricas de NEFA's (mmol/l), colesterol (mg/dl), triglicéridos (mg/dl), HDL-C (mmol/dl), LDL-c (mmol/dl) y VLDL (mmol/l) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén

SERIE	PSO (n=15)	CMQ (n=16)	PSO+K (n=13)	CMQ+K (n=17)
NEFA'S (mmol/l)	1,39±0,88	0,61±0,20 ^{***}	0,64±0,22 ^{***}	0,49±0,17 ^{***}
Colesterol (mg/dl)	63,30±10,19	143,31±65,47 ^{***}	70,3±32,13 ^{●●●}	158,3±75,39 ^{***ΔΔΔ}
TGC (mg/dl)	161,33±53,53	157,687±53,72	120,07±43,53	165,58±75,94 ^{*●Δ}
HDL-C (mmol/l)	0,78±0,11	0,65±0,16 [*]	0,81±0,11 [●]	0,92±0,23 ^{●●●}
LDL-C (mmol/l)	0,27±0,05	2,69±1,43 ^{***}	0,52±0,85 ^{●●●}	2,87±1,38 ^{***ΔΔΔ}
VLDL (mmol/l)	0,57±0,22	0,35±0,21	0,48±0,27	0,42±0,56 ^{***●●ΔΔΔ}

Media ± DE; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; ● $p < 0.05$; ●● $p < 0.01$; ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO+K.

NEFA'S en plasma

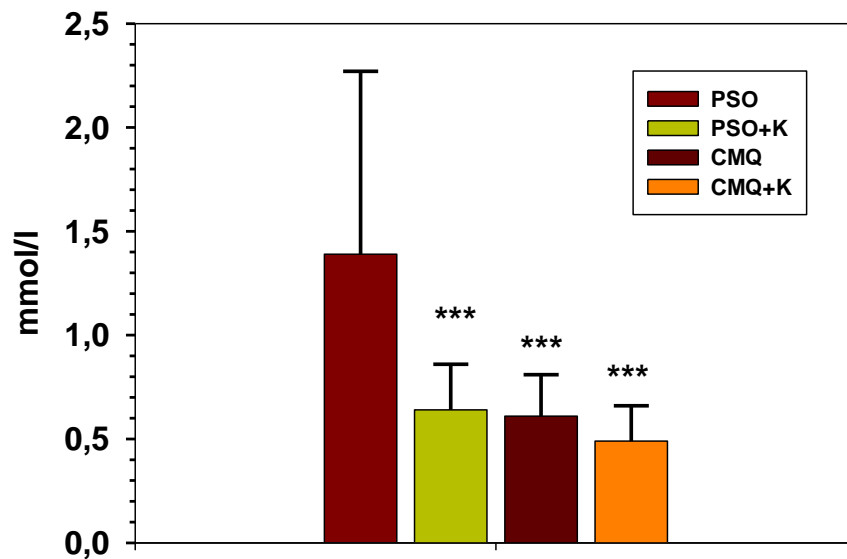


Figura 75: Concentraciones séricas de NEFA's en plasma en ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén : Media ± DE; ***p<0.001: valor ES respecto a PSO.

Colesterol

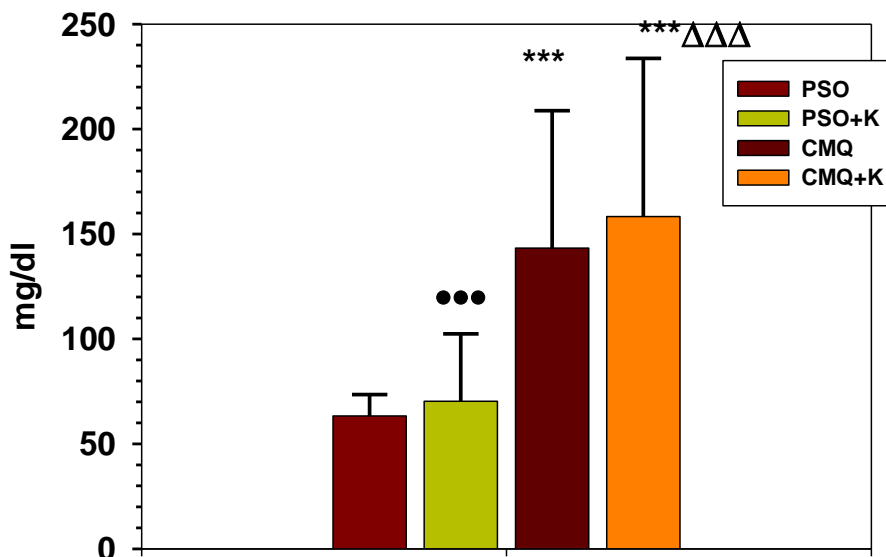


Figura 76 : Concentraciones séricas de colesterol (mg/dl) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. Media ± DE; ***p<0.001: valor ES respecto a PSO; ●●●p<0.001: valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔp<0.001: valor ES respecto de PSO+K.

Triglicéridos (TGC)

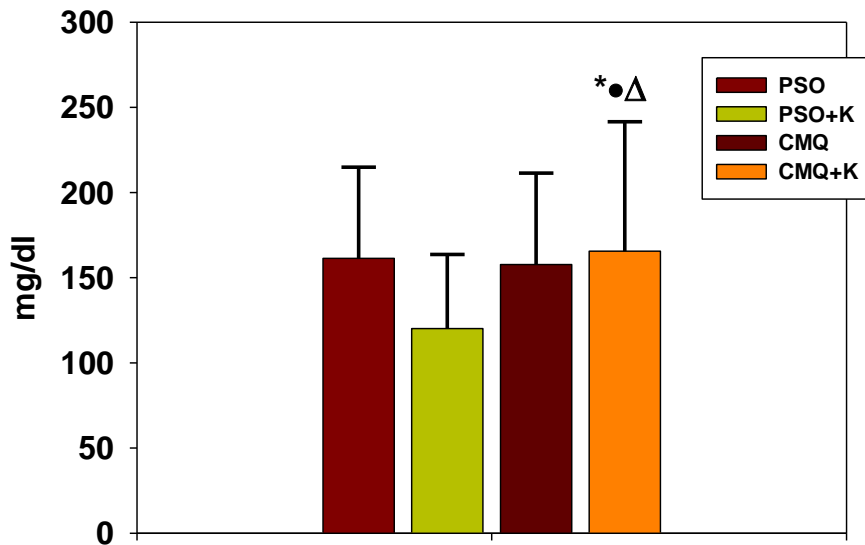


Figura 77 : Concentraciones séricas de triglicéridos (mg/dl) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. Media \pm DE; * $p < 0.05$: valor ES respecto a PSO; • $p < 0.05$: valor ES respecto de CMQ; Δ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO+K.

HDL-c

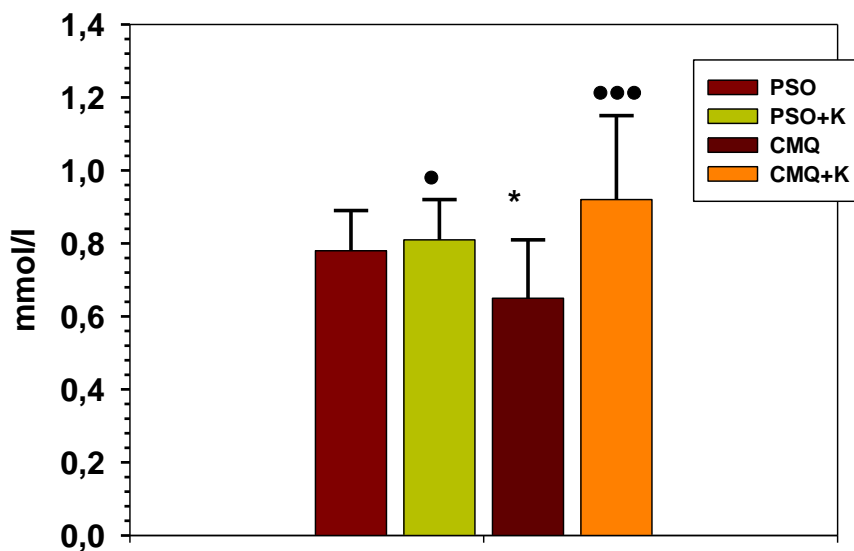


Figura78 : Concentraciones séricas de HDL (mmol/l) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. Media \pm DE; * $p < 0.05$: valor ES respecto a PSO; • $p < 0.05$; ••• $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ.

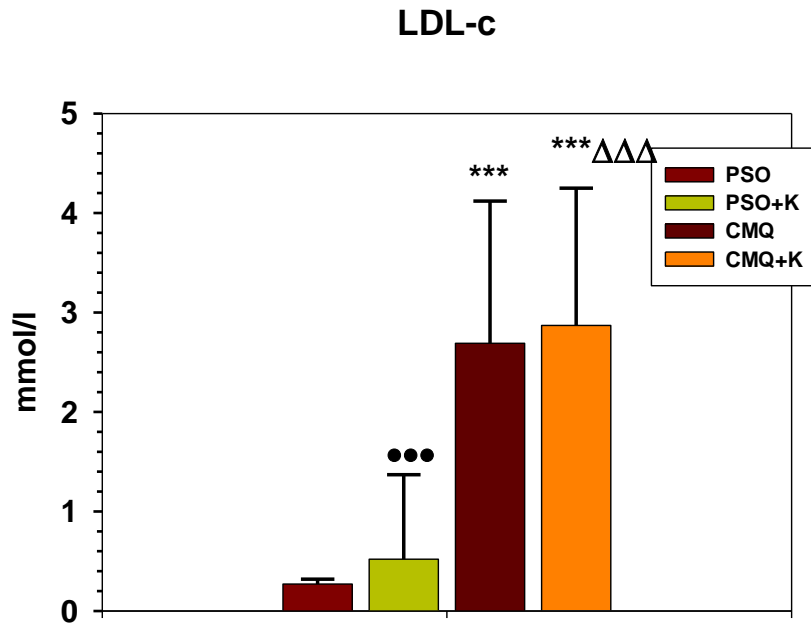


Figura79 :Concentraciones séricas de LDL-c (mmol/l) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. Media \pm DE; ***p<0.001: valor ES respecto a PSO; •••p<0.001: valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔp<0.05; valor ES respecto de PSO+K.

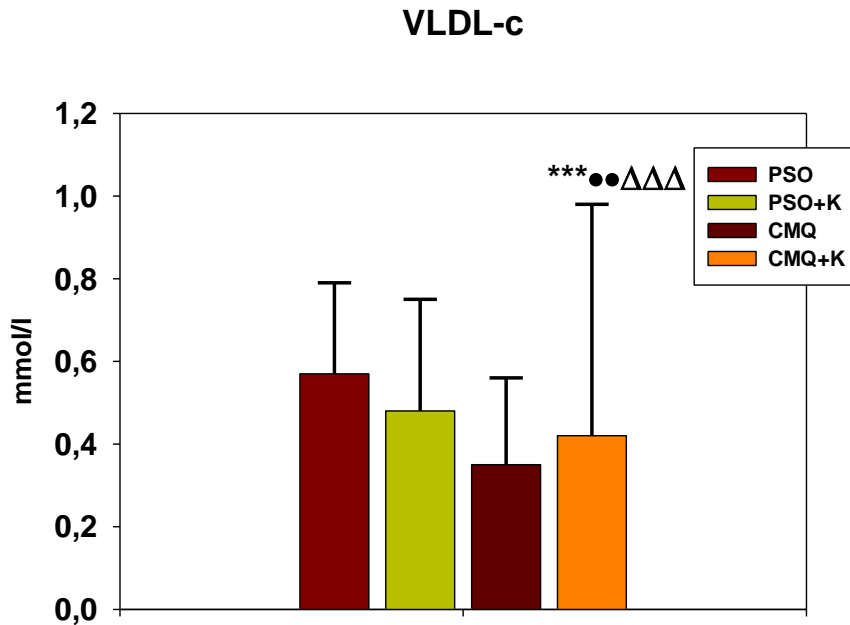


Figura 80 : Concentraciones séricas de VLDL (mmol/l) en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. Media \pm DE; ***p<0.001: valor ES respecto a PSO; ••p<0.01: valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔp<0.001: valor ES respecto de PSO+K.

13. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Todas las biopsias hepáticas que corresponden a ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica presentan similares alteraciones que se pueden resumir en una importante alteración de su arquitectura. El parénquima hepático normal ha sido sustituido en gran parte por una intensa *proliferación ductular*. Se observan algunos hepatocitos atrapados entre los ductos biliares neoformados y muchos de ellos presentan cambios regenerativos. Además, se aprecia un moderado *componente inflamatorio* de tipo mixto de distribución difusa en el cual se identifican numerosos leucocitos polimorfonucleares y un discreto aumento de células cebadas.

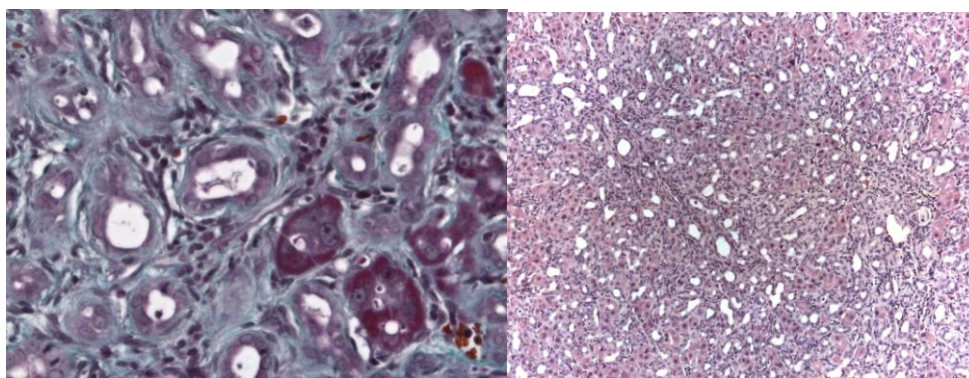


Figura 81: Hígado de ratas con colestasis micro-quirúrgica de 8 semanas de evolución donde se aprecia proliferación ductular con disminución franca de los hepatocitos (H&E, derecha y Tricrómico de Masson, izquierda)

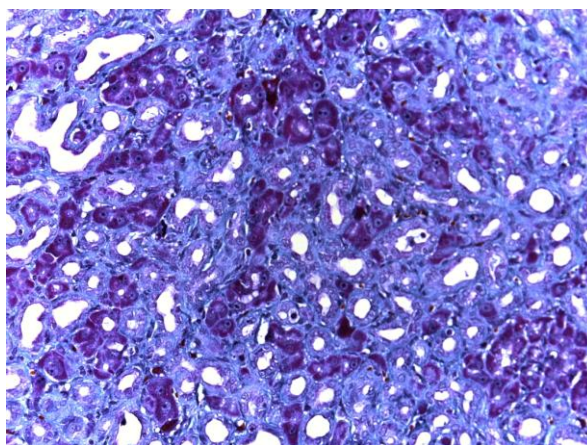


Figura 82: Hígado de una ratas con colestasis micro-quirúrgica a las 8 semanas de evolución postoperatoria, en la que se observan escasos hepatocitos eosinófilos, es decir en fase de necrosis, intensa proliferación de los ductos biliares y fibrosis. (Tricromico de Masson,)

Con las tinciones de Hematoxilina Eosina y Tricromico de Masson se pone de manifiesto que, después de 8 semanas de evolución, se produce una *necrosis hepática* submasiva con sustitución del parénquima por *proliferación ductular* y *fibrosis* (figura 81). Con la tinción Rojo Sirio, el colágeno y por tanto la fibrosis, cuantificada mediante análisis de imagen, se demuestra que aumenta ($p<0.001$) en las ratas con colestasis. La administración de ketotifen no produce ningún efecto reductor de al fibrosis hepática en éstos animales. (tabla 18; figuras 83 y 84).

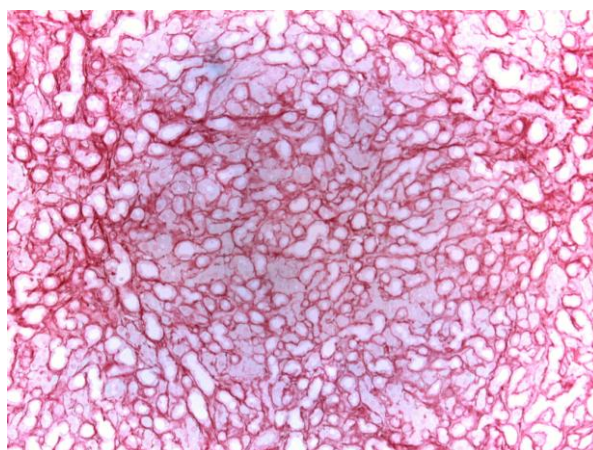


Figura 83: Tinción con Rojo Sirio en hígado de rata con colestasis a las 8-9 semanas de la intervención que demuestra una amplia afectación parenquimatosa por fibrosis.

Tabla 18: Áreas afectadas por fibrosis determinadas por espectrofotometría tras tinción con Rojo Sirio en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K).

Grupo	Area Fibrosis (%)
PSO(n=4)	0,99±1,03
CMQ(n=14)	24,81±4,92 ^{***}
PSO+K(n=3)	0,97±0,68 ^{●●●}
CMQ+K(n=15)	24,02±4,88 ^{***ΔΔΔ}

Media ± DE; *** $p<0.001$: valor ES respecto a PSO; ●●● $p<0.001$; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p<0.001$; valor ES respecto de PSO+K.

Rojo Sirio-Areas

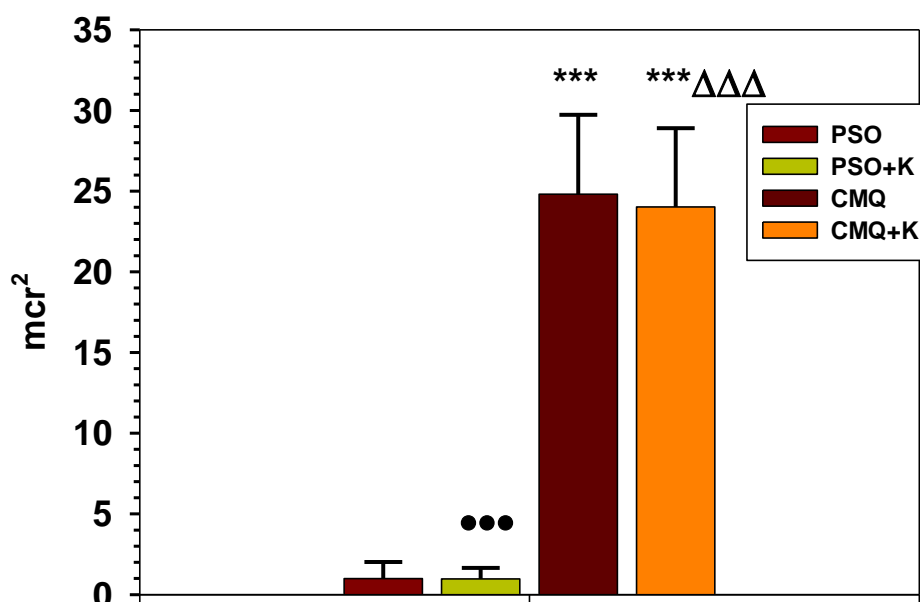


Figura 84: Áreas afectadas por fibrosis determinadas por espectrofotometría tras tinción con Rojo Sirio en ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; ••• $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ; $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$: valor ES respecto de PSO+K.

Si bien no se ha comprobado la existencia de una disminución estadísticamente significativa en el área de fibrosis hepática entre las ratas con colestasis que no fueron tratadas con Ketotifen y las que sí recibieron éste tratamiento con ketotifén diluido en el agua de bebida (tabla 18; figura 84), curiosamente las ratas pseudoperadas han ingerido un volumen de agua con ketotifén diluido mayor ($p < 0,001$) que las ratas con colestasis (tabla 19, figura 85). Cuando analizamos la correlación entre el volumen diario ingerido de fármaco y la fibrosis hepática demostrada mediante la tinción con Rojo Sirio se aprecia que los animales con mas fibrosis hepática habían ingerido un menor volumen de agua con ketotifen y, aunque no hay una correlación negativa estadísticamente significativa, si es obvia una tendencia en este grupo de animales de la existencia de una relación dosis-dependiente respecto de ésta variable ya que cuanto mayor es la dosis del fármaco menor es la fibrosis hepática en estas ratas. (figura 87)

Tabla 19: Ingesta diaria de agua con Ketotifén (ml/24h) diluido a una concentración de 0.15mg/ml en ratas pseudo-operadas (PSO+K) y en ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica (CMQ+K) durante el periodo post-operatorio de 8-9 semanas.

SERIE	Ingesta de Ketotifén (ml/24h)
PSO+K (n=15)	41,20±6,24
CMQ+K (n=18)	27,63±4,74***

Media±DE; *** p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto del grupo PSO+K

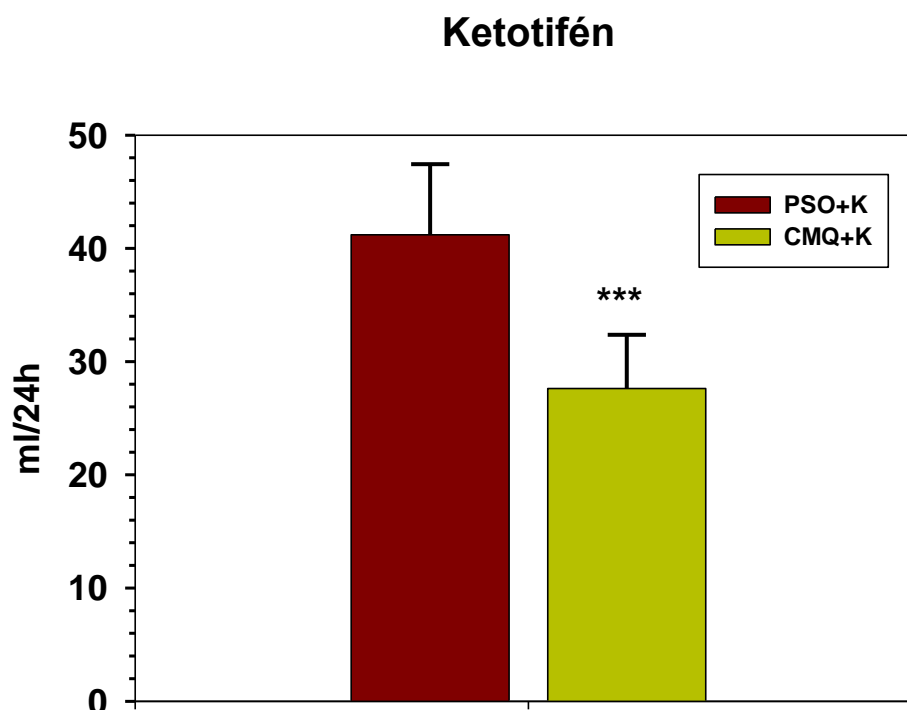


Figura 85: Ingesta diaria de agua con ketotifén (ml/24h) diluido a una concentración de 0.15 mg/ml en ratas pseudo-operadas (PSO+K) y en ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica (CMQ+K) durante el periodo post-operatorio de 8-9 semanas. Media±DE; *** p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto del grupo PSO+K

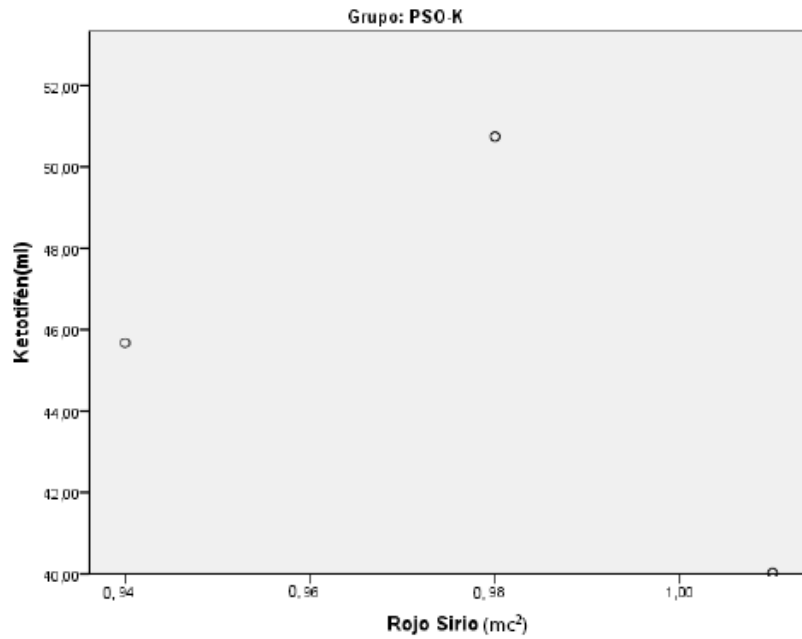


Figura 86: Correlaciones entre la ingesta de ketotifén (ml) y el area afectada por fibrosis medida mediante tinción con Rojo Sirio (mc²) en ratas pseudo-operadas tratadas con ketotifén. El estudio de correlaciones entre el consumo de ketotifén y el grado de fibrosis en ratas pseudo-operadas que han sido tratadas con ketotifén (PSO+K)

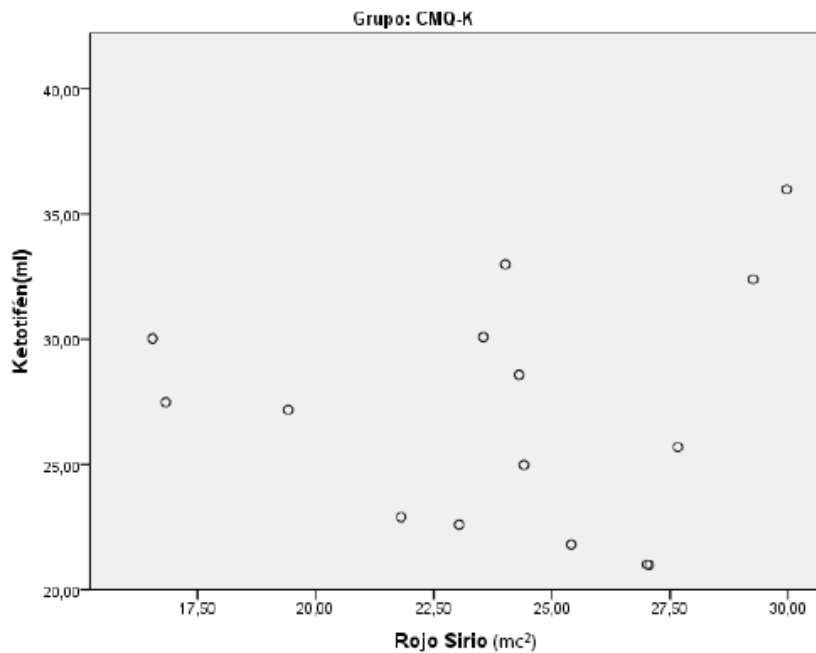


Figura 87: Correlaciones entre la ingesta de ketotifén (ml) y el area afectada por fibrosis medida mediante tinción con Rojo Sirio (mc²) en ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. El estudio de correlaciones entre el consumo de ketotifén y el grado de fibrosis en ratas con colestasis microquirúrgica que han sido tratadas con ketotifén (CMQ+K)

14. CONCENTRACIONES TISULARES DE MEDIADORES INFLAMATORIOS

14. A. MEDIADORES ANTIOXIDANTES

Como mediadores tisulares antioxidantes se han valorado las concentraciones de catalasa, glutathion-transferasa y glutathion-peroxidasa en el ileon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado.

- **Catalasa:**

Respecto de los niveles de catalasa, disminuyen en todos los órganos estudiados en las ratas colestásicas (tabla 20; figuras 88,89 y 90). La administración de ketotifen aumenta su concentración en las ratas pseudo-operadas, en tanto que no estimula su producción en las ratas con colestasis (tabla 20; figuras 88,89 y 90).

Tabla 20 : Concentraciones de catalasa en el ileon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K).

Catalasa en tejidos (µmol/mg)			
Grupo	Intestino	Ganglios	Higado
PSO (n=6)	1,05±0,40	2,24±0,50	3,18±0,076
CMQ (n=6)	1,97±0,44	1,04±0,11	2,84±0,28 ^Δ
PSO+K (n=6)	2,23±0,53	3,73±0,05	3,60±0,30 [●]
CMQ+K (n=6)	1,34±0,26	0,97	2,56±0,20 ^Δ

Media ± DE; ●p<0.05: valor ES respecto de CMQ; Δp<0.05: valor ES respecto de PSO+K.

Catalasa en Ileon

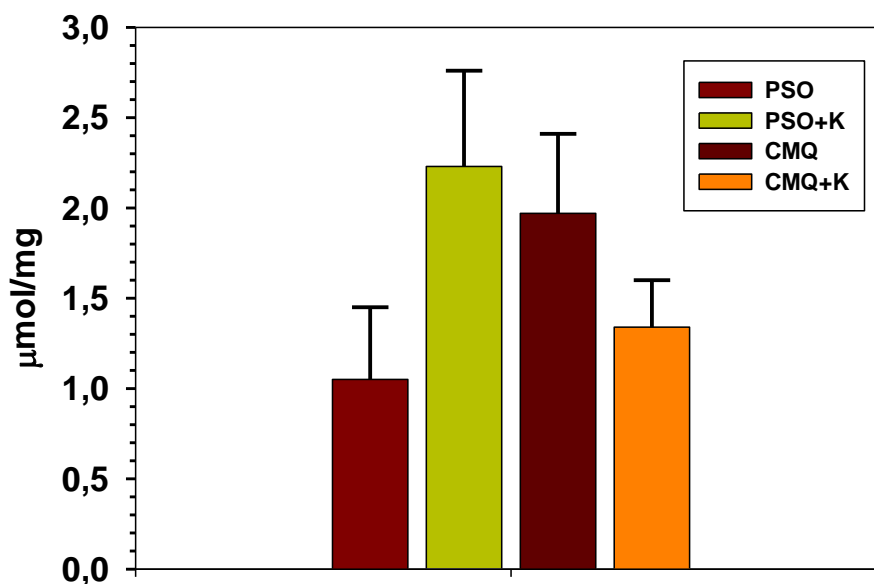


Figura 88: Concentraciones de catalasa en el íleon terminal de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media ± DE.

Catalasa en GLM

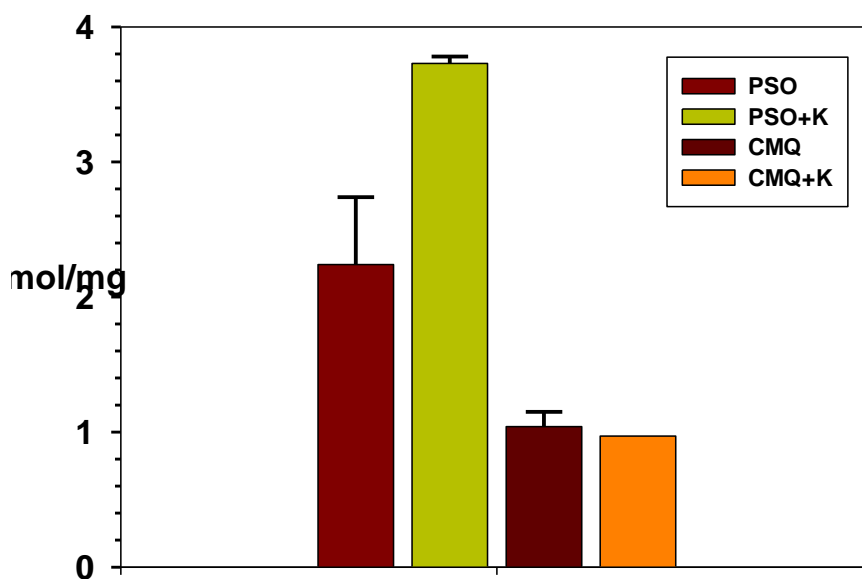


Figura 89: Concentraciones de catalasa en los ganglios linfáticos mesentéricos de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media ± DE.

Catalasa en Hígado

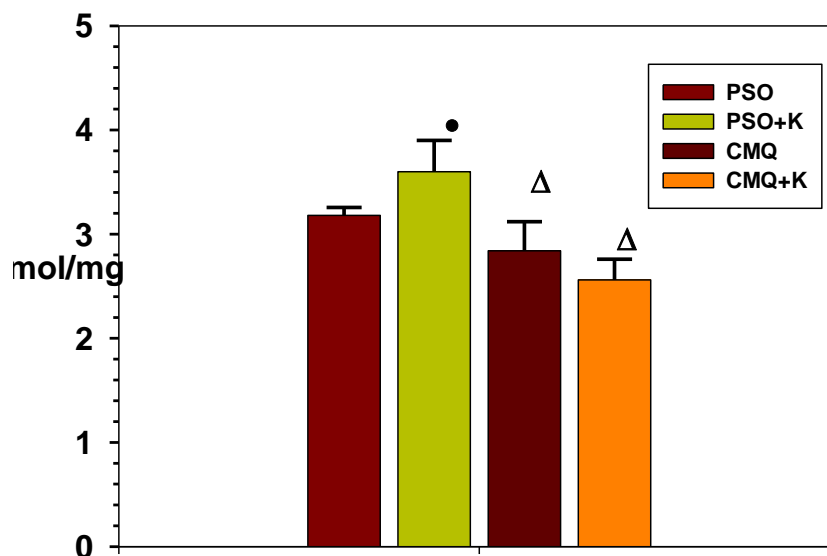


Figura 90 : Concentraciones de catalasa en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE; • p <0.05: valor ES respecto de CMQ; Δ p <0.05: valor ES respecto de PSO+K.

- **Glutation Transferasa:**

Las concentraciones de glutatión-transferasa en las ratas con colestasis descienden en el ileon, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado (tabla 21; figuras 91,92 y 93). Cuando se administró ketotifén no cambiaron los valores de éste enzima en el ileon terminal en las ratas pseudo-operadas, mientras que en las ratas con colestasis aumentaron sus valores (tabla 21; figuras 91). Por el contrario, los niveles de glutatión-transferasa en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado aumentaron cuando las ratas pseudo-operadas recibieron tratamiento con ketotifén, pero no cambiaron en las ratas colestásicas (tabla 21; figuras 92 y 93)

Tabla 21 : Concentraciones de glutation-transferasa en el ileon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K).

Glutation transferasa (µmol/mg)			
Grupo	Intestino	Ganglios	Higado
PSO (n=6)	3326,70±1025,33	718,35±135,08	4882,69±474,24
CMQ (n=6)	1923,4±479,48	321,49±16,54	1681,9±144,69 ^{***}
PSO+K (n=6)	2823,05±323,67	1137,17±4,59	5459,24±349,26 ^{●●●}
CMQ+K (n=6)	2306,16±213,07	318,09	1622,26±80,87 ^{***ΔΔΔ}

Media ± DE; ***p<0.001: valor ES respecto a PSO; ●●●p<0.001: valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔp<0.001: valor ES respecto de PSO+K.

Glutation Transferasa en Ileon

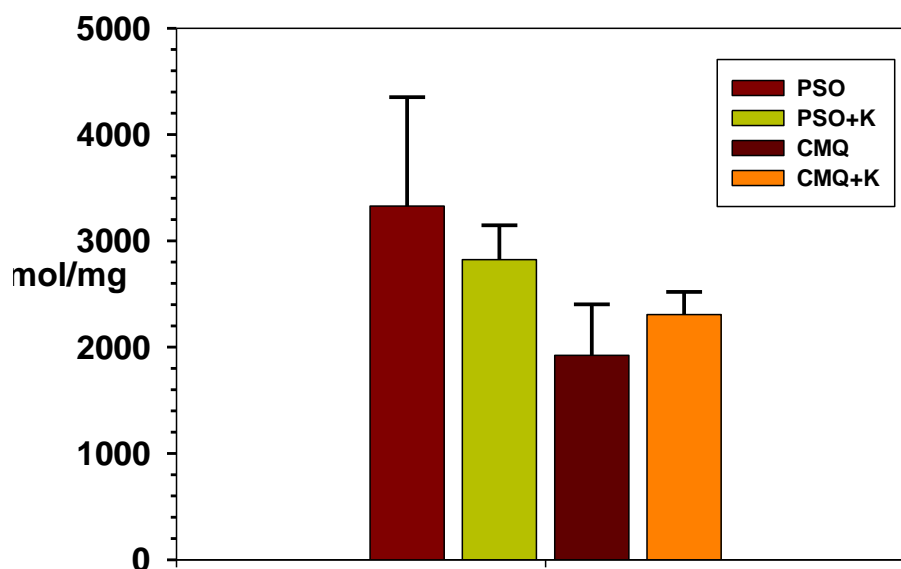


Figura 91 : Concentraciones de glutacion-transferasa en el ileon terminal de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media ± DE.

Glutation Transferasa en GLM

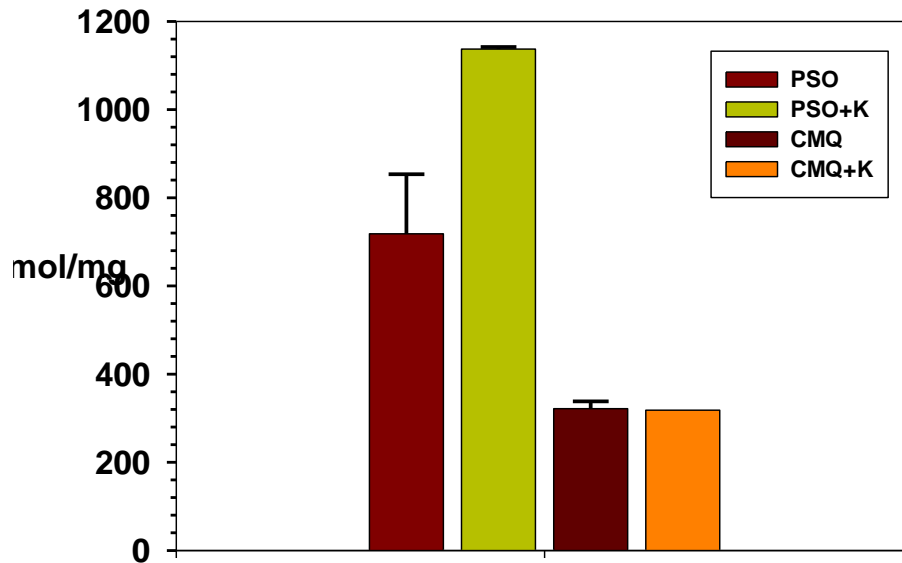


Figura 92 : Concentraciones de glutacion-transferasa en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media ± DE.

Glutation Transferasa en Hígado

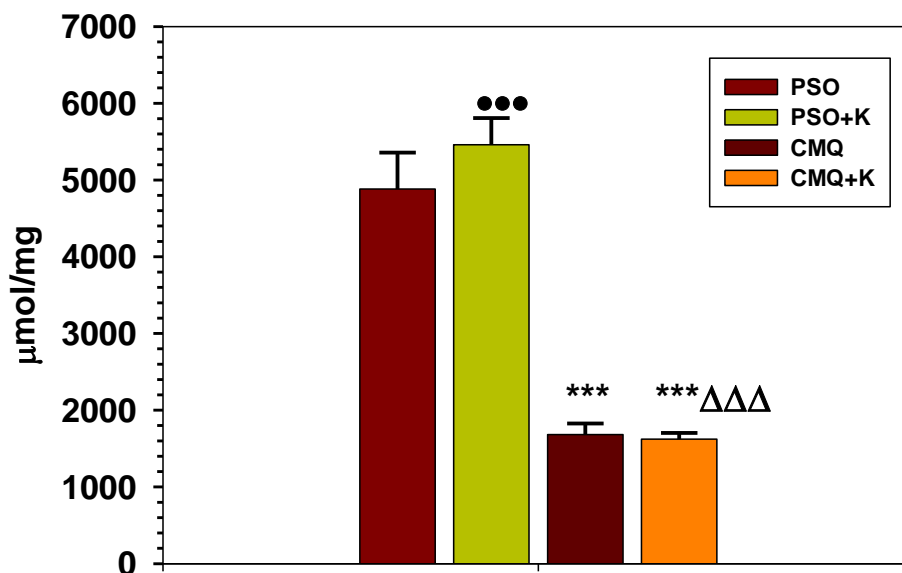


Tabla 93 : Concentraciones de glutacion-transferasa en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media ± DE; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; ••• $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO+K.

• **Glutation Peroxidasa:**

Se produce una disminución de los niveles de glutacion peroxidasa en ratas con colestasis microquirúrgica respecto a las pseudo-operadas tanto en ileon ($p < 0,05$) como en Hígado ($p < 0,001$) (tabla 22; figuras 94 y 96). También se produce un aumento ($p < 0,001$) de los niveles de glutacion peroxidasa en el Hígado de ratas pseudo-operadas tras la administración de ketotifén (tabla 22; figura 96).

Tabla 22 : Concentraciones de glutacion-peroxidasa en el ileon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K).

Glutation Peroxidasa ($\mu\text{mol/mg}$)			
Grupo	Intestino	Ganglios	Hígado
PSO (n=6)	1008,57 \pm 136,63	876,13 \pm 40,45	5450,40 \pm 346,41
CMQ (n=6)	799,72 \pm 128,67	962,71 \pm 5,50	2750,67 \pm 126,49***
PSO+K (n=6)	1062,91 \pm 100,15	972,92 \pm 55,87	7309,65 \pm 308,37***●●●
CMQ+K (n=6)	597,66 \pm 63,27* Δ	1085	2759,15 \pm 309,96*** $\Delta\Delta\Delta$

Media \pm DE; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ; $\Delta p < 0.05$; $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$: valor ES respecto de PSO+K.

Glutation Peroxidasa en Ileon

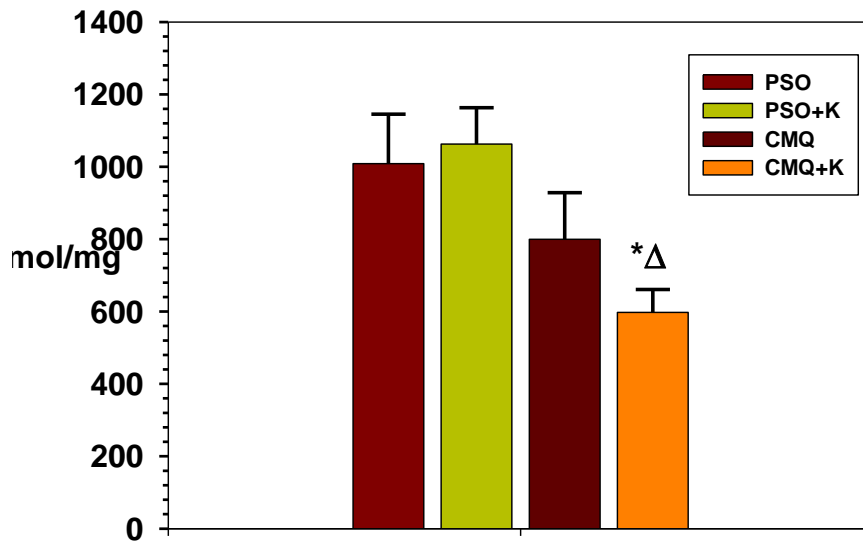


Figura 94 : Concentraciones de glutacion-peroxidasa en el íleon de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE; * $p < 0.05$: valor ES respecto a PSO; $\Delta p < 0.05$: valor ES respecto de PSO+K.

Glutation Peroxidasa en GLM

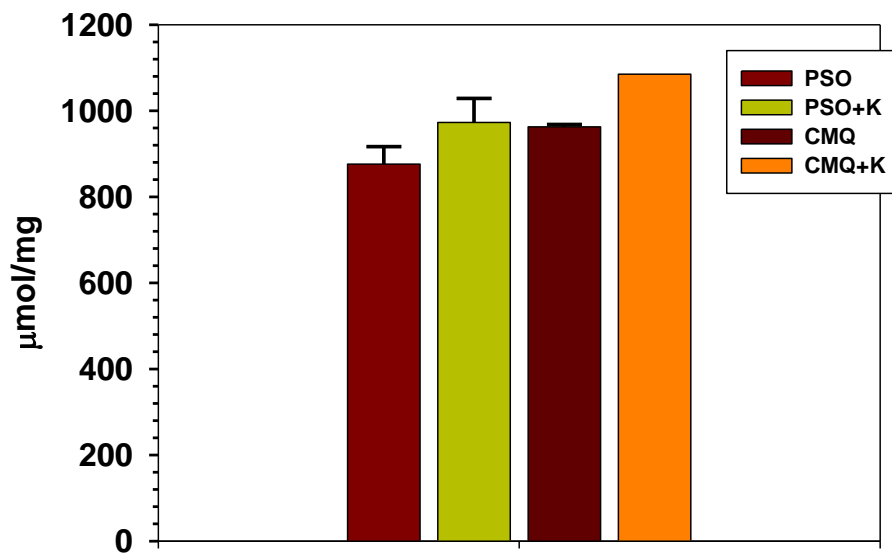


Figura 95: Concentraciones de glutacion-peroxidasa en los ganglios linfáticos mesentéricos de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE.

Glutation Peroxidasa en Hígado

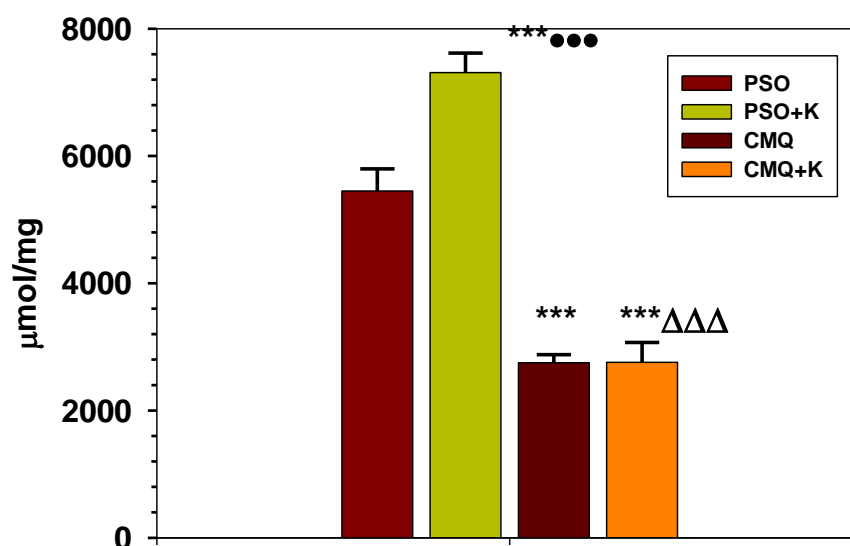


Figura 96 : Concentraciones de glutacion-peroxidasa en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE; *** p <0.001: valor ES respecto a PSO; ●●● p <0.001: valor ES respecto de CMQ; $\Delta\Delta\Delta p$ <0.001: valor ES respecto de PSO+K.

14..B. CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS.

Se han estudiado las concentraciones de las citoquinas pro-inflamatorias factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleuquina-1beta (IL-1 β) en el ileon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado.

- **TNF- α :**

Los niveles tisulares de TNF- α aumentaron en el ileon en las ratas con colestasis respecto de las pseudo-operadas (tabla 23; figura 97). El tratamiento con ketotifén disminuyó los niveles de ésta citoquina en el ileon y en el hígado, tanto en las ratas pseudo-operadas como en las colestásicas (p <0.05) (tabla 23; figuras 97 y 99).

Tabla 23 : Concentraciones de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el íleon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K).

Grupo	TNF- α (pg/100mg)		
	Intestino	Ganglios	Higado
PSO (n=6)	130,24 \pm 37,76	129,83 \pm 22,48	505,56 \pm 65,19
CMQ (n=6)	192,27 \pm 161,47	141,34 \pm 59,21	352 \pm 255,13
PSO+K (n=6)	40,14 \pm 35,60 [•]	–	268,82 \pm 77,06
CMQ+K (n=6)	36,57 \pm 10,78 [•]	–	125,99 \pm 76,08 ^{**}

Media \pm DE; ^{**}p<0.01: valor ES respecto a PSO; [•]p<0.05: valor ES respecto de CMQ

TNF α en Ileon

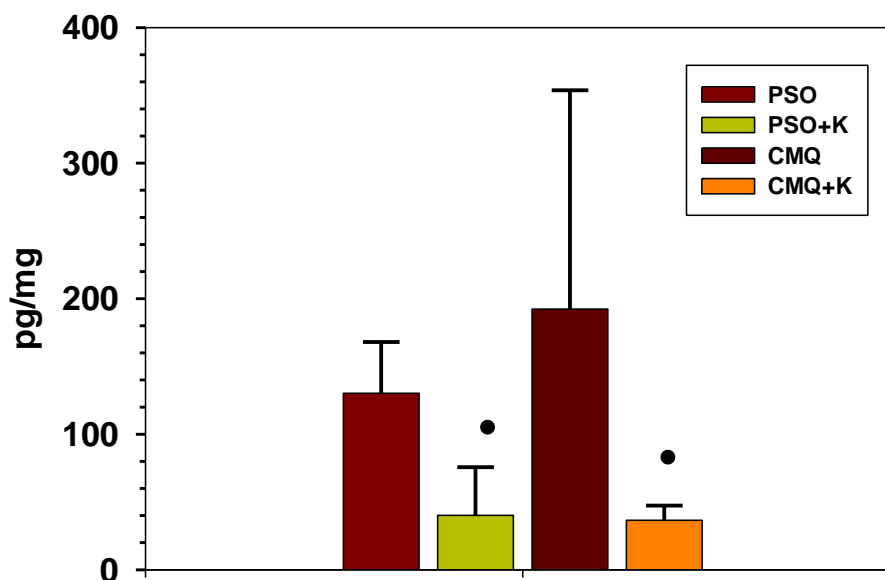


Figura 97 : Concentraciones de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el íleon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE; [•]p<0.05: valor ES respecto de CMQ

TNF α en GLM

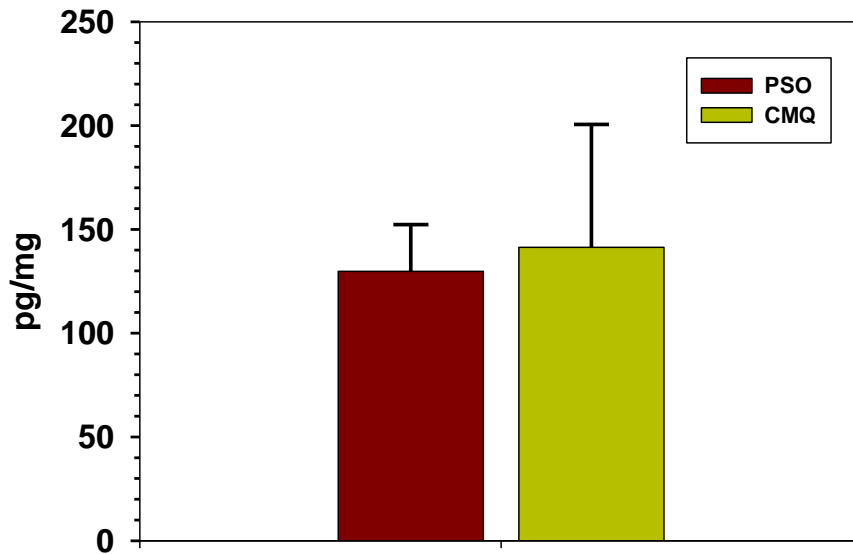


Figura 98: Concentraciones de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en los ganglios linfáticos mesentéricos en ratas pseudo-operadas, (PSO) y con colestasis microquirúrgica (CMQ). Media \pm DE.

TNF α en Hígado

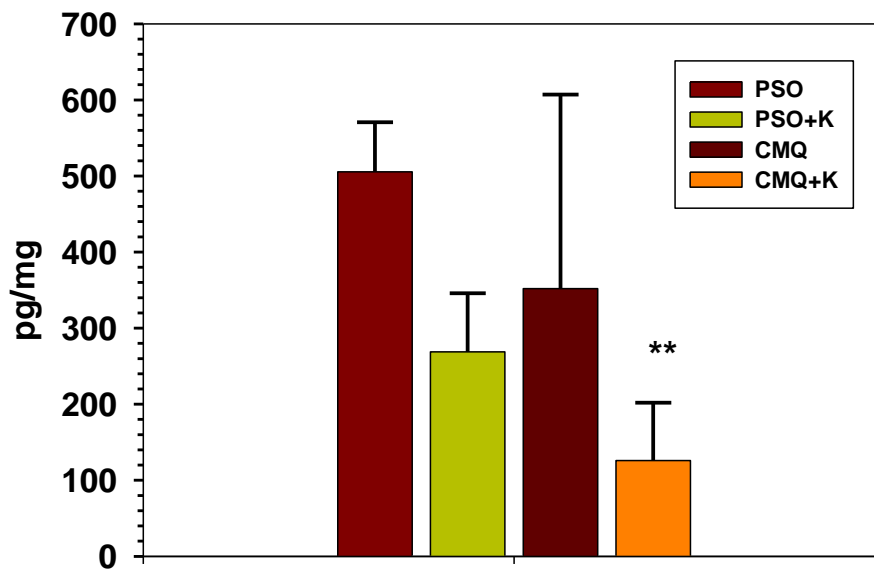


Tabla99 : Concentraciones de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE; ** $p < 0.01$: valor ES respecto a PSO.

• **IL-1 β :**

Las concentraciones de IL-1 β disminuyeron ($p < 0.05$) en el ileon terminal de las ratas con colestasis respecto de las ratas pseudo-operadas. En los ganglios linfáticos mesentéricos las concentraciones de IL-1 β fue similar en ambos grupos de animales y, por el contrario los niveles de ésta citoquina pro-inflamatoria aumentaron ($p < 0.05$) en el hígado de las ratas con colestasis (tabla 24; figuras 101 y 102). La administración de ketotifen redujo ($p < 0.05$) la concentración de IL-1 β en el ileon de las ratas pseudo-operadas (tabla 24; figura 100), en tanto que en el hígado el efecto inhibitor del fármaco fue evidente tanto en los animales pseudo-operados como en los colestásicos (tabla 24; figura 102)

Tabla 24: Concentraciones de Interleuquina-1 β (IL-1 β) en el íleon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K).

IL-1β (pg/100 mg)			
Grupo	Intestino	Ganglios	Higado
PSO (n=5)	266,02 \pm 42,53	431,85 \pm 110,88	173,20 \pm 30,16
CMQ (n=6)	150,87 \pm 44,57*	436,10 \pm 63,39	249,71 \pm 96,64
PSO+K (n=6)	154,82 \pm 86,66*	—	103,73 \pm 71,07 \bullet
CMQ+K (n=5)	170 \pm 20,53*	—	204,58 \pm 104,51

Media \pm DE; * $p < 0.05$: valor ES respecto a PSO; $\bullet p < 0.05$: valor ES respecto de CMQ.

IL-1 β Ileon terminal

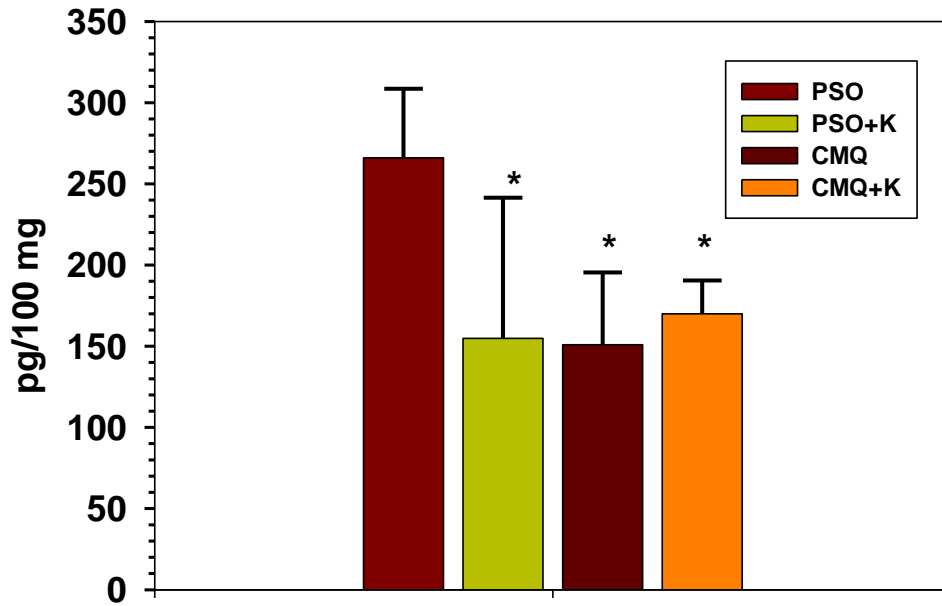


Figura 100: Concentraciones de interleuquina-1 β (IL-1 β) en el ileon terminal de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE; * p <0.05; valor ES respecto a PSO.

IL-1 β en GLM

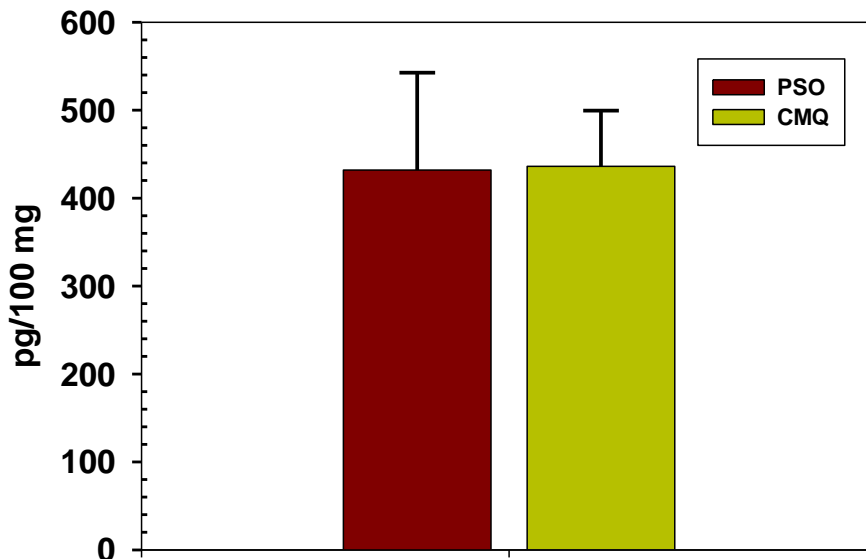


Figura 101: Concentraciones de interleuquina-1 β (IL-1 β) en los ganglios linfáticos mesentéricos en ratas pseudo-operadas, (PSO) y con colestasis microquirúrgica (CMQ). Media \pm DE.

IL-1 β en Hígado

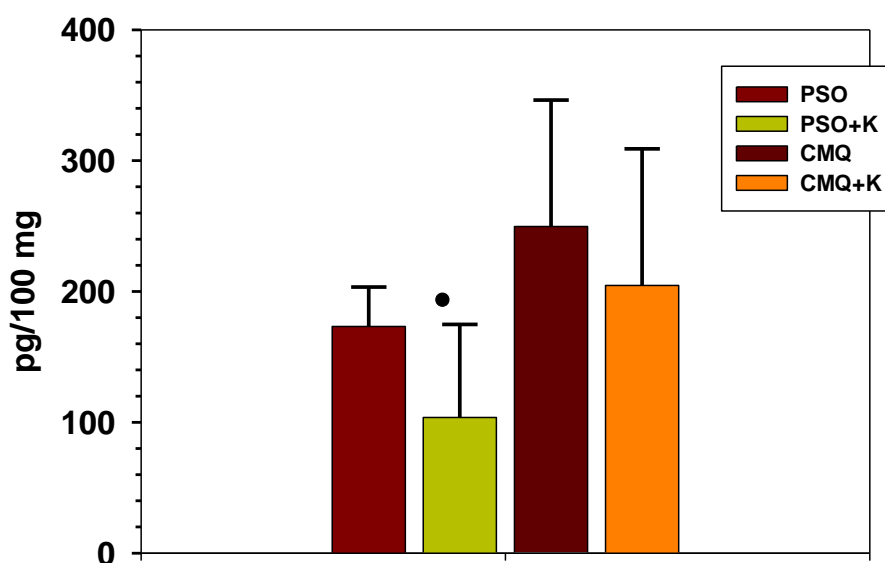


Figura 102: Concentraciones de interleuquina-1 β (IL-1 β) en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE; • p <0.0: valor ES respecto de CMQ.

14. C. CITOQUINAS ANTI-INFLAMATORIAS

Las interleuquinas (IL) anti-inflamatorias 4 (IL-4), 11 (IL-11) y 13 (IL-13) fueron estudiadas en el territorio esplácnico de ratas pseudo-operadas y con colestasis.

- **IL-4:**

En las ratas colestásicas la IL-4 aumentó (p <0.05) en el ileon y en el hígado respecto de los animales pseudo-operados (tabla 25; figuras 103 y 105). La administración de ketotifen aumentó mas los niveles de ésta citoquina en el hígado de las ratas con colestasis (tabla 25; figura 105).

Tabla 25: Concentraciones de interleuquina-4 (IL-4) en el íleon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K).

IL-4 (pg/100mg)			
Grupo	Intestino	Ganglios	Higado
PSO (n=6)	15,87±7,36	40,77±0,86	33,28±7,56
CMQ (n=5)	28,05±13,02*	40,55±12,39	47,58±15,03
PSO+K (n=5)	13,82±6,29 [●]		18,15±8,20
CMQ+K (n=6)	28,60±9,65* ^Δ		60,81±51,42 ^Δ

Media ± DE; *p<0.05: valor ES respecto a PSO; [●]p<0.05: valor ES respecto de CMQ; ^Δp<0.05: valor ES respecto de PSO+K.

IL-4 Ileon

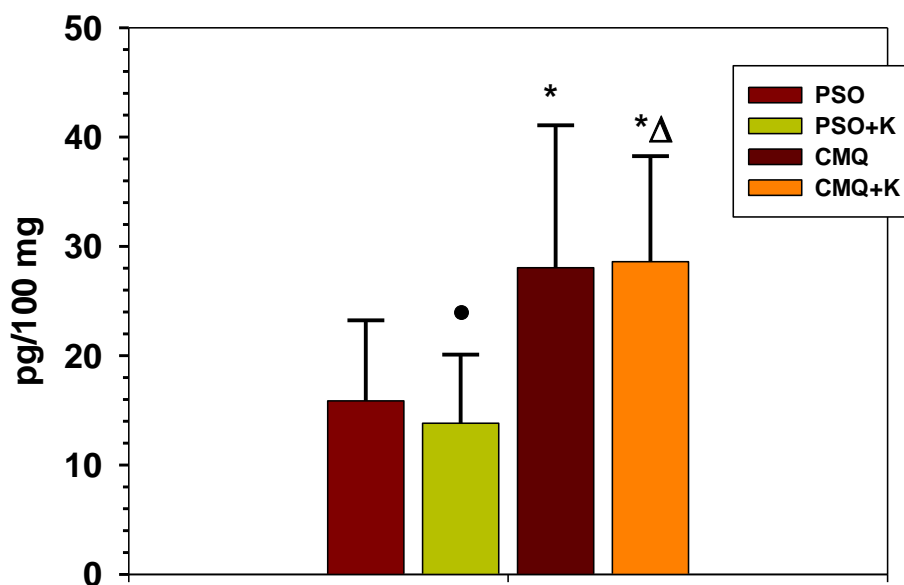


Figura 103: Concentraciones de interleuquina-4 (IL-4) en el íleon terminal de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media ± DE; *p<0.05: valor ES respecto a PSO; [●]p<0.05: valor ES respecto de CMQ; ^Δp<0.05: valor ES respecto de PSO+K.

IL-4 GLM

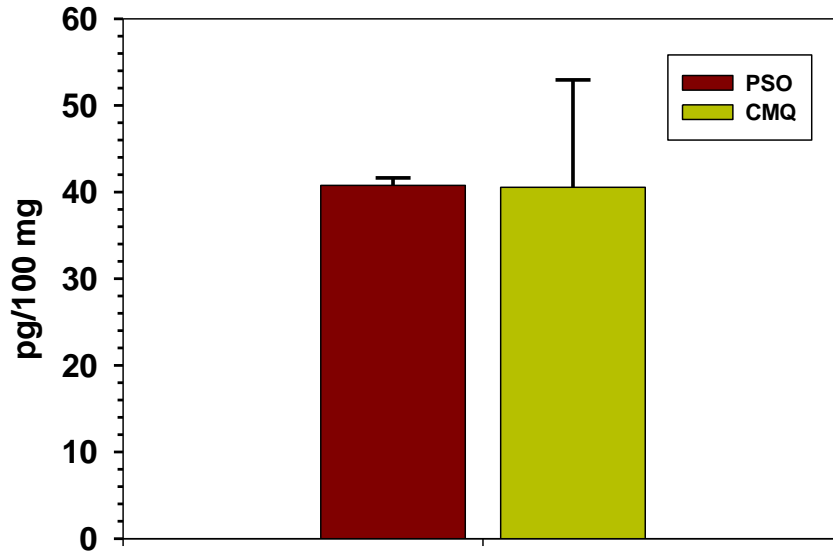


Figura 104: Concentraciones de interleuquina-4 (IL-4) en los ganglios linfáticos mesentéricos en ratas pseudo-operadas, (PSO) y con colestasis microquirúrgica (CMQ). Media \pm DE.

IL-4 Hígado

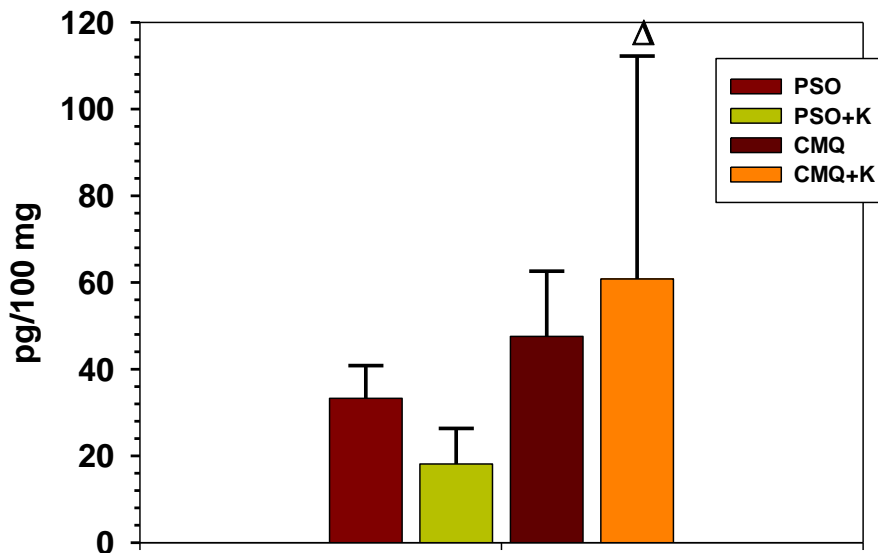


Figura 105: Concentraciones de interleuquina-4 (IL-4) el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE; $\Delta p < 0.05$: valor ES respecto de PSO+K.

• **IL-10:**

En las ratas colestásicas IL-10 aumentó en el ileon y en el hígado respecto de los animales pseudo-operados (tabla 26 ; figuras 106 y 108). La administración de ketotifen a las ratas con colestasis aumentó ($p<0,05$) los niveles de ésta citoquina en el ileon, pero los disminuyó en el hígado. (tabla 26 ; figura 106 y 108).

Tabla 26 : Concentraciones de interleuquina-10 (IL-10) en el ileon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K).

IL-10 (pg/100mg)			
Grupo	Intestino	Ganglios	Hígado
PSO (n=6)	63,93±30,85	246,39±47,92	142,36±16,91
CMQ (n=6)	122,50±50,35	215,81±79,31	218,34±174,65
PSO+K (n=6)	78,73±22,80		165,81±38,65
CMQ+K (n=6)	153,07±72,82 ^{*Δ}		144,54±64,35

Media ± DE; * $p<0.0$: valor ES respecto a PSO; Δ $p<0.05$: valor ES respecto de PSO+K.

IL-10 en ileon

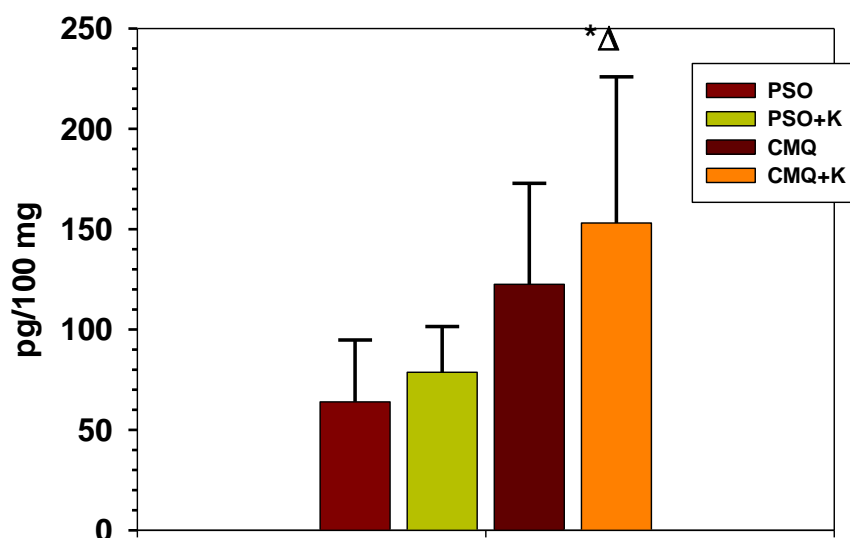


Figura 106 : Concentraciones de interleuquina-10 (IL-10) en el ileon terminal de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media ± DE; * $p<0.0$: valor ES respecto a PSO; Δ $p<0.05$: valor ES respecto de PSO+K.

IL-10 en GLM

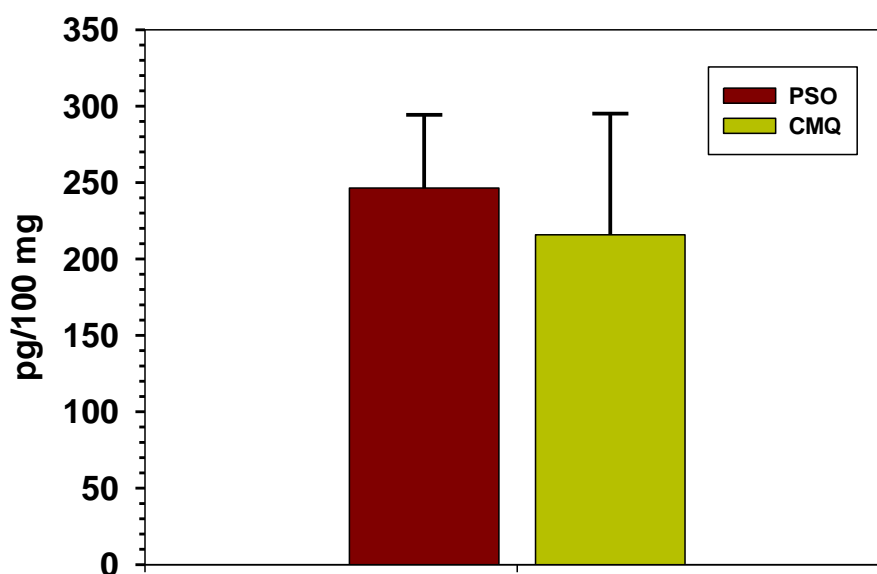


Figura 107 : Concentraciones de interleuquina-4 (IL-4) en los ganglios linfáticos mesentéricos en ratas pseudo-operadas, (PSO) y con colestasis microquirúrgica (CMQ) . Media \pm DE.

IL-10 Hígado

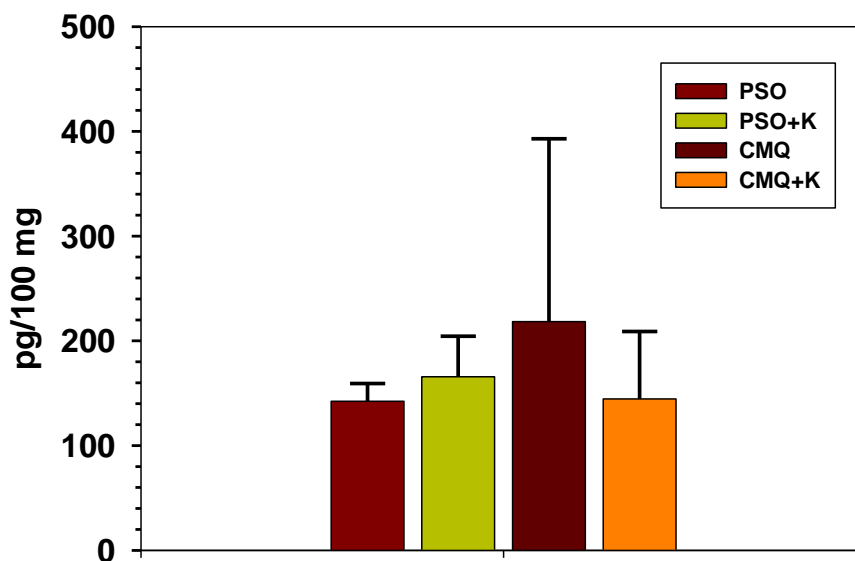


Figura 108 : Concentraciones de interleuquina-10 (IL-10) en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE.

• **IL-13:**

En las ratas colestásicas IL-13 aumentó en el ileon y disminuyó en los ganglios linfáticos mesentéricos respecto de los animales pseudo-operados (tabla 27; figuras 109 y 110). La administración de ketotifen a las ratas con colestasis aumentó los niveles de ésta citoquina en el ileon. Por el contrario, ketotifen disminuyó los niveles de IL-13 en el ileon y en el hígado de las ratas colestasicas (tabla 27; figura 109 y 111).

Tabla 27: Concentraciones de interleuquina-13 (IL-13) en el íleon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K).

IL-13 (pg/100 mg)			
Grupo	Intestino	Ganglios	Hígado
PSO (n=6)	12,16±2,88	44,62±22,61	20,79±4,96
CMQ (n=6)	18,71±8,88	24,78±10,19	24,20±11,25
PSO+K (n=6)	8,02±1,53 ^{••}	–	27,14±7,45
CMQ+K (n=6)	15,09±6,53	–	21,97±7,91

Media ± DE; ••p<0.01: valor ES respecto de CMQ.

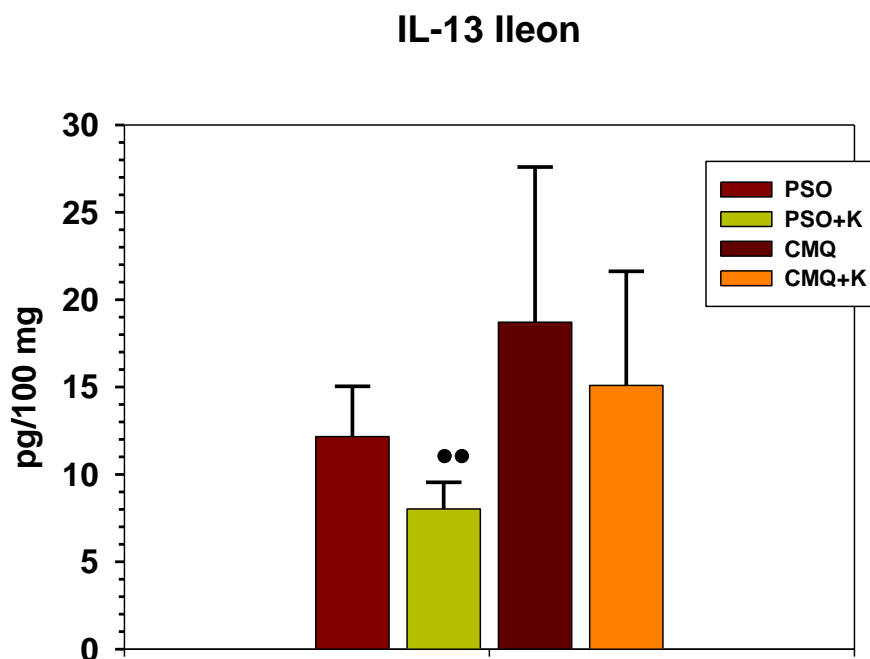


Figura 109: Concentraciones de interleuquina-13 (IL-13) en el íleon terminal de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE; $\bullet\bullet$ $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ.

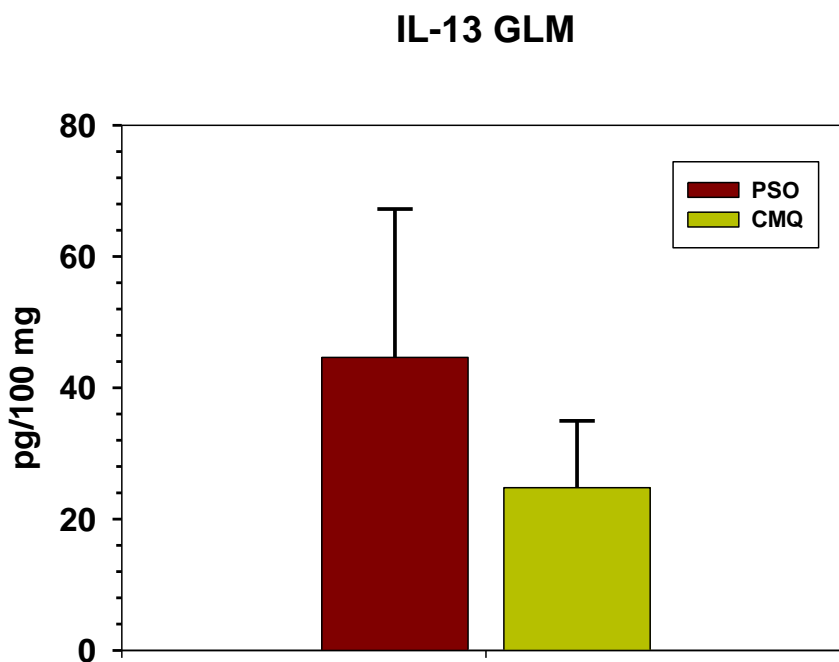


Figura 110: Concentraciones de interleuquina-13 (IL-13) en los ganglios linfáticos mesentéricos en ratas pseudo-operadas, (PSO) y con colestasis microquirúrgica (CMQ). Media \pm DE.

IL-13 Hígado

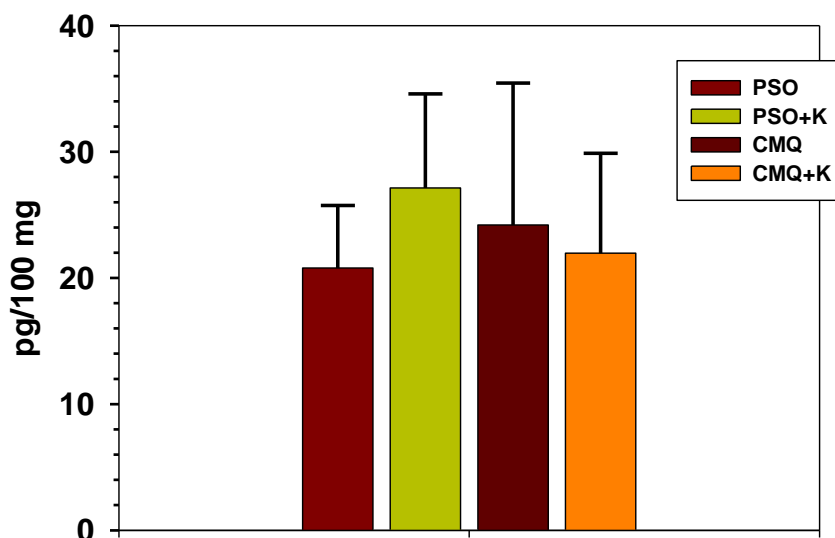


Figura III: Concentraciones de interleuquina-13 (IL-13) en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media ± DE.

• IL-17A:

En las ratas colestásicas la IL-17A aumentó en el ileon y en el hígado de las ratas colestasicas, en tanto que disminuyó en los ganglios linfáticos mesentéricos respecto de los animales pseudo-operados (tabla 28; figuras 112,113 y 114). La administración de ketotifen disminuyó ($p < 0.05$) los niveles de ésta citoquina en el ileon de las ratas pseudo-operadas (tabla 28; figura 112 y 114) y en el hígado de las ratas colestasicas, en tanto que aumentó en el hígado de las pseudo-operadas.

Tabla 28 : Concentraciones de interleuquina-17A (IL-17A) en el íleon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K).

Grupo	IL-17A (pg/100 mg)		
	Intestino	Ganglios	Hígado
PSO (n=6)	15,29±4,73	65,72±30,31	33,10±8,77
CMQ (n=6)	27,83±16,83	37,91±13,47	40,67±21,68
PSO+K (n=6)	12,73±5,77*	—	58,03±12,01
CMQ+K (n=6)	29,52±16,77	—	37,11±20,73

Media ± DE; * $p < 0.05$:: valor ES respecto a PSO

IL-17A Ileon

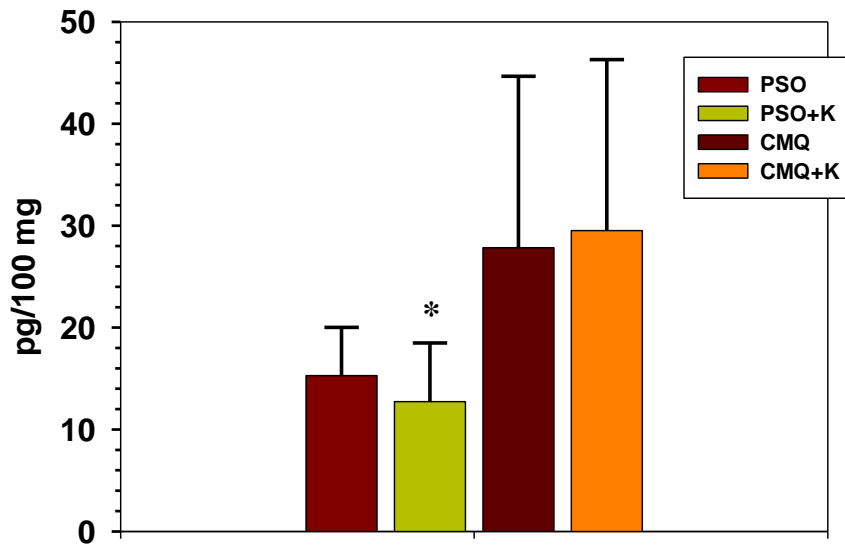


Figura 112: Concentraciones de interleuquina-17A (IL-17A) en el íleon terminal de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K); Media \pm DE; * $p < 0.05$: valor ES respecto a PSO.

IL-17A GLM

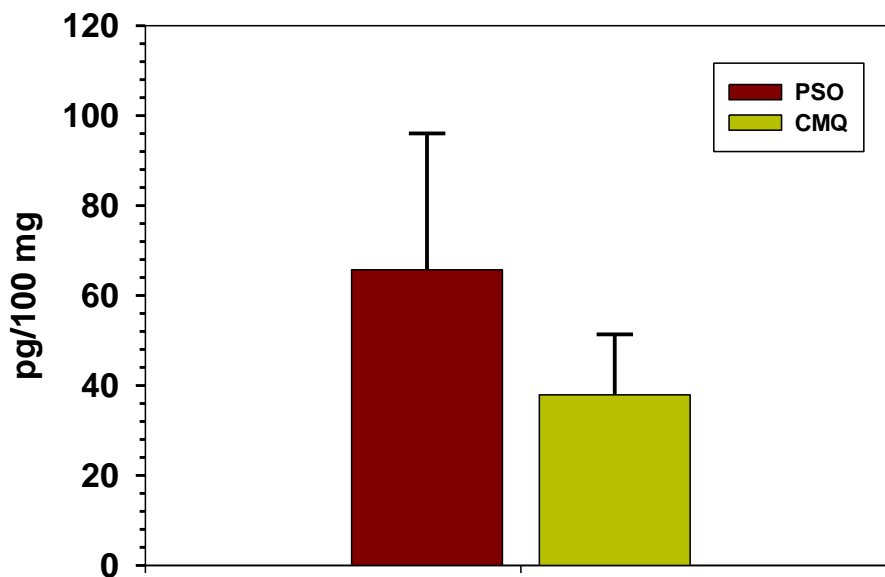


Figura 113: Concentraciones de interleuquina-17 (IL-7A) en los ganglios linfáticos mesentéricos en ratas pseudo-operadas, (PSO) y con colestasis microquirúrgica (CMQ). Media \pm DE.

IL-17A en Hígado

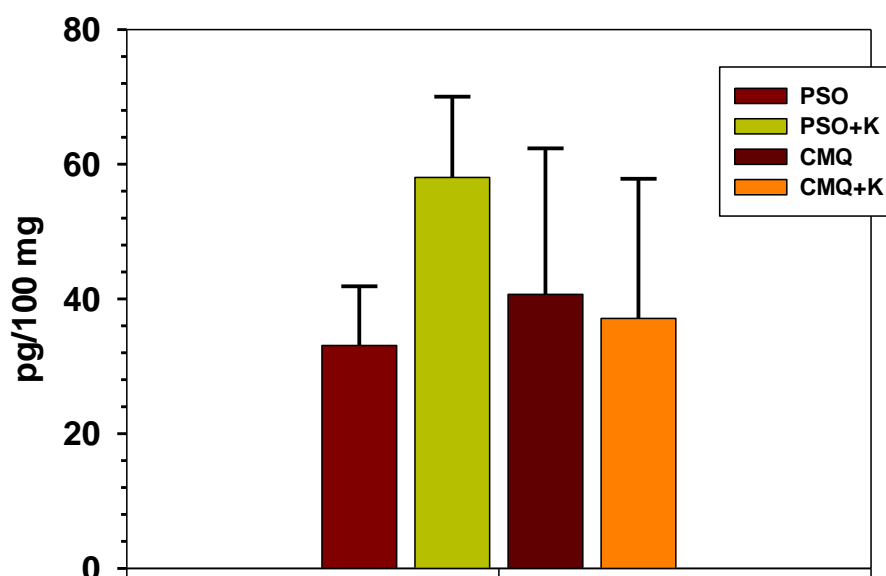


Figura 114: Concentraciones de interleuquina-17A (IL-17A) en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE.

- **MCP-1:**

Las concentraciones de proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1) aumentaron ($p < 0.001$) en el íleon y en el hígado en las ratas colestásicas respecto de los animales pseudo-operados (tabla 29; figuras 115 y 117). En los ganglios linfáticos mesentéricos estas concentraciones disminuyen en las ratas colestásicas (tabla 29; figura 116). La administración de ketotifén disminuyó los niveles de ésta citoquina en el hígado de las ratas con colestasis (tabla 29; figura 117).

Tabla 29: Concentraciones de proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1) en el íleon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K).

Grupo	MCP-1 (pg/100 mg)		
	Intestino	Ganglios	Hígado
PSO (n=6)	7,30±2,59	29,65	4,75±1,01
CMQ (n=6)	17,22±6,24	16,23±4,18	31,83±16,78 ^{***}
PSO+K (n=6)	6,56±2,80	–	5,70±0,95 ^{●●●}
CMQ+K (n=6)	26,93±19,39 ^{*ΔΔ}	–	26,93±8,56 ^{**ΔΔ}

Media ± DE; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001: valor ES respecto a PSO; ●●●p<0.001: valor ES respecto de CMQ; ΔΔp<0.01: valor ES respecto de PSO+K

MCP 1 en ileon

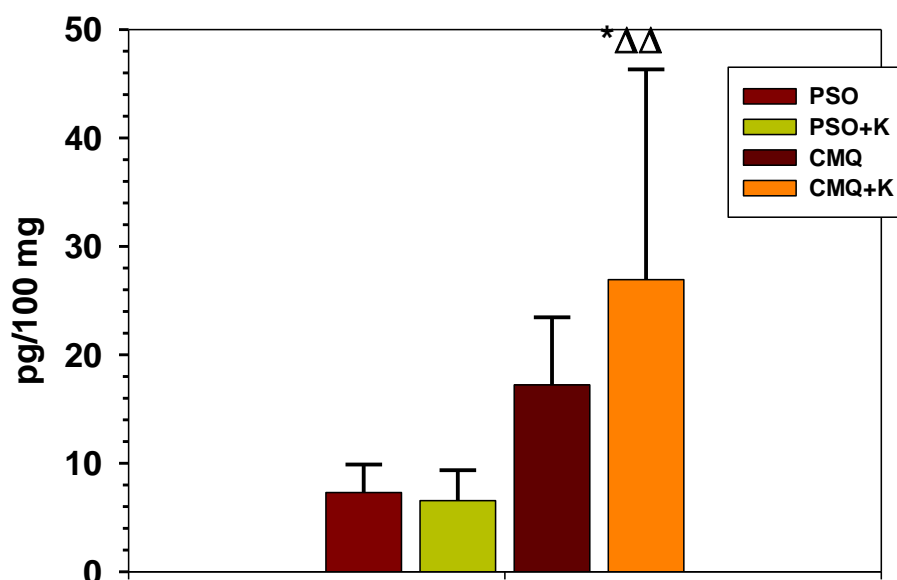


Tabla 115 : Concentraciones de proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1) en el íleon terminal de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media ± DE; *p<0.05: valor ES respecto a PSO; ΔΔp<0.01: valor ES respecto de PSO+K..

MCP 1 en GLM

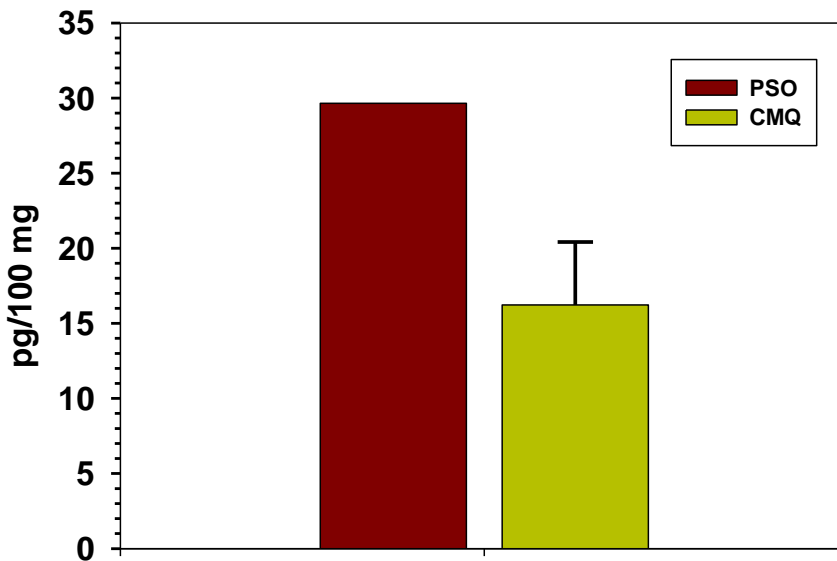


Figura 116: Concentraciones de MCP-1 en los ganglios linfáticos mesentéricos en ratas pseudo-operadas, (PSO) y con colestasis microquirúrgica (CMQ). Media \pm DE.

MCP 1 en Hígado

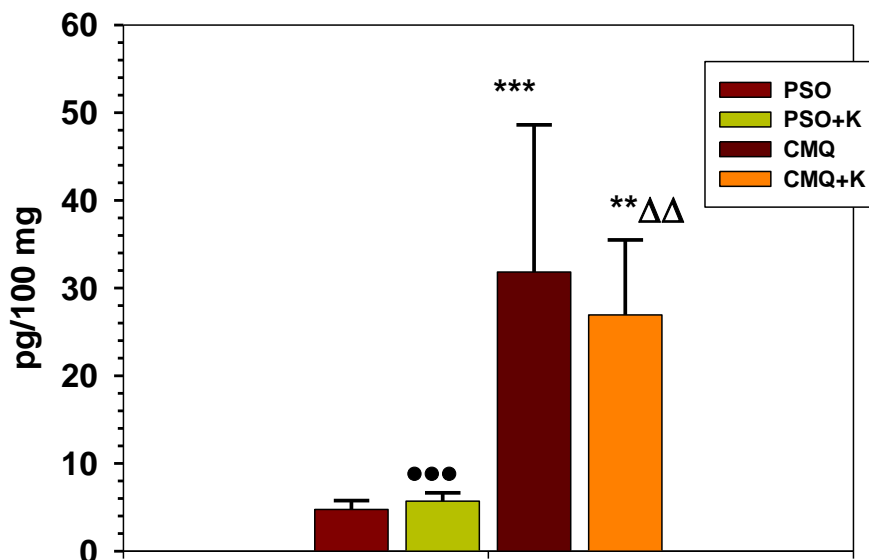


Figura 117: Concentraciones de proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1) en el hígado, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; ●●● $p < 0.001$; valor ES respecto de CMQ; $\Delta\Delta p < 0.01$: valor ES respecto de PSO+K

14. D. FACTORES DE CRECIMIENTO.

El factor de crecimiento transformador beta1 (*Transforming Growth Factor; TGF-β1*) y el factor de crecimiento de endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF*) han sido los factores de crecimiento fueron estudiados en el área esplácnica.

-TGF-β1:

Las concentraciones de TGF-β1 aumentaron ($p < 0.01$) en el ileon y en el hígado ($p < 0.01$) en las ratas colestásicas respecto de los animales pseudo-operados (tabla 30; figuras 118 y 120). La administración de ketotifen aumentó discretamente los niveles de ésta citoquina en el hígado de las ratas pseudo-operadas, en tanto que dicho aumento fue muy significativo ($p < 0.001$) en las ratas con colestasis (tabla 30; figura 120).

Tabla 30: Concentraciones de factor de crecimiento transformador beta-1 (TGF-β1) en el ileon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K).

Grupo	TGF-β ₁ (ng/mg)		
	Intestino	Ganglios	Higado
PSO (n=6)	1,61±0,33	2,45±1,15	0,68±0,27
CMQ (n=6)	2,16±1,25	1,72±0,28	1,12±0,26
PSO+K (n=6)	1,23±0,17	–	2,08±0,44 ^{**•}
CMQ+K (n=6)	2,06±0,42	–	2,74±1,14 ^{***•••}

Media ± DE; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto a PSO; • $p < 0.05$; ••• $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ

TGF β_1 en Ileon

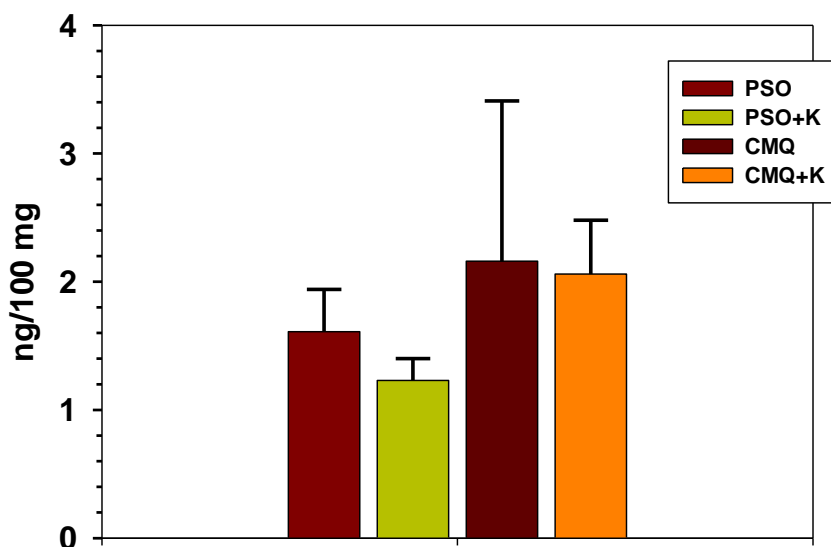


Tabla 118 : Concentraciones de factor de crecimiento transformador beta-1 (TGF- β_1) en el íleon terminal de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE.

TGF β_1 en GLM

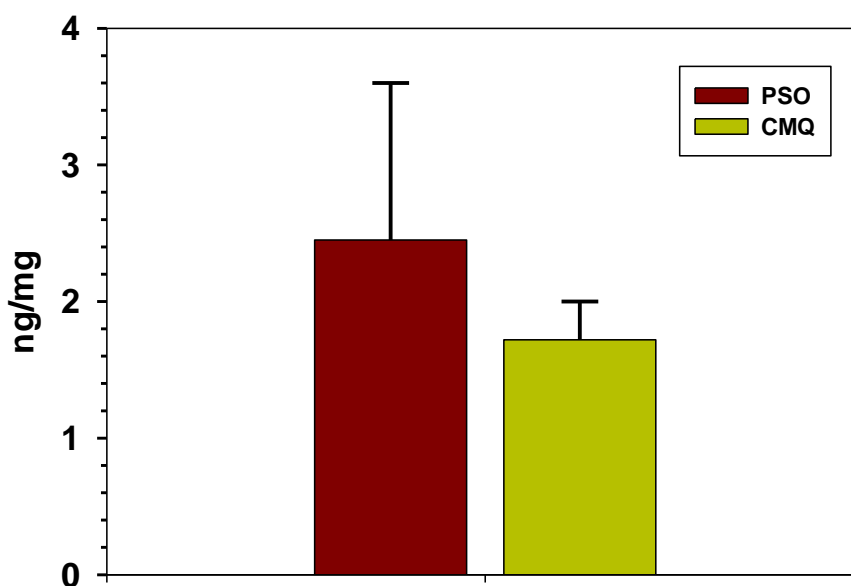


Figura 119: Concentraciones de TGF- β_1 en los ganglios linfáticos mesentéricos en ratas pseudo-operadas, (PSO) y con colestasis microquirúrgica (CMQ). Media \pm DE.

TGFβ₁ en Hígado

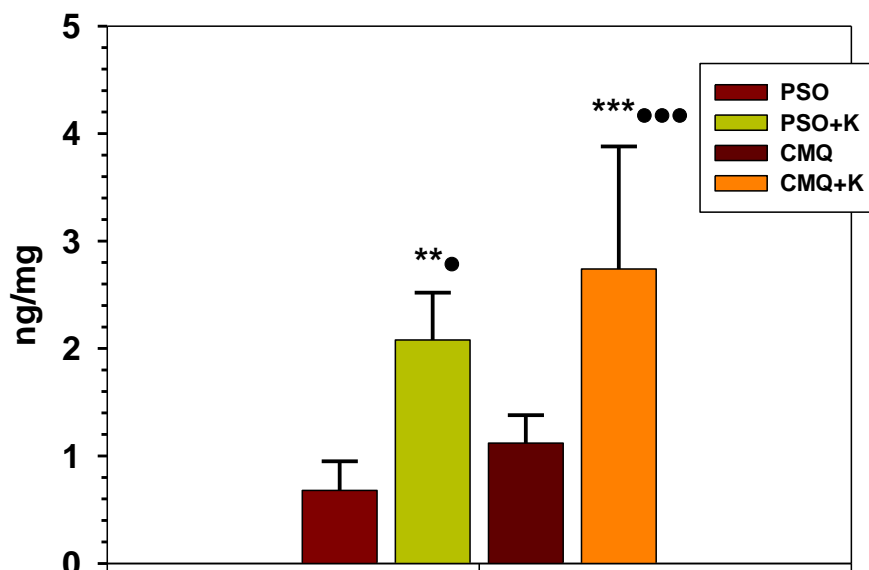


Tabla 120 : Concentraciones de factor de crecimiento transformador beta-1 (TGF-β1) en el íleon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media ± DE; ***p*<0.01; ****p*<0.001: valor ES respecto a PSO; •*p*<0.05; ●●●*p*<0.001; valor ES respecto de CMQ.

-VEGF:

Por el contrario, las concentraciones de VEGF no aumentaron ni en el íleon ni en el hígado de las ratas colestásicas respecto de los animales pseudo-operados, en tanto que disminuyeron en los ganglios linfáticos mesentéricos (tabla 31; figuras 121,122 y 123). La administración de ketotifen aumentó (*p*<0.05) los niveles de ésta citoquina en el hígado de las ratas pseudo-operadas, en tanto que en las ratas con colestasis apenas produjo ninguna variación (tabla 31; figura 123).

Tabla 31: Concentraciones de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en el íleon terminal, en los ganglios linfáticos mesentéricos y en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K).

VEGF(pg/100mg)			
Grupo	Intestino	Ganglios	Hígado
PSO (n=6)	37,17±9,47	106,08±13,15	65,87±10,57
CMQ (n=6)	36,02±11,23	72,70±20,07	67,36±34,40
PSO+K (n=6)	22,29±5,78	—	102,08±33,20 ^{*•}
CMQ+K (n=6)	68,66±47,32 ^Δ	—	52,35±18,13 ^{ΔΔ}

Media ± DE; * $p < 0.051$: valor ES respecto a PSO; • $p < 0.05$: valor ES respecto de CMQ; $\Delta p < 0.05$; $\Delta\Delta p < 0.01$: valor ES respecto de PSO+K.

VEGF Ileon

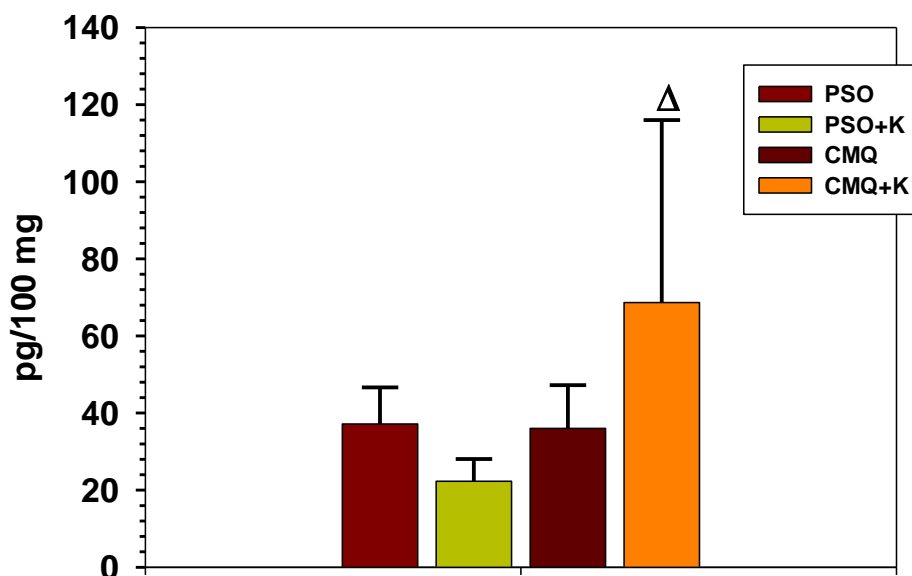


Figura 121: Concentraciones de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en el íleon terminal de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media ± DE; $\Delta p < 0.05$: valor ES respecto de PSO+K.

VEGF en GLM

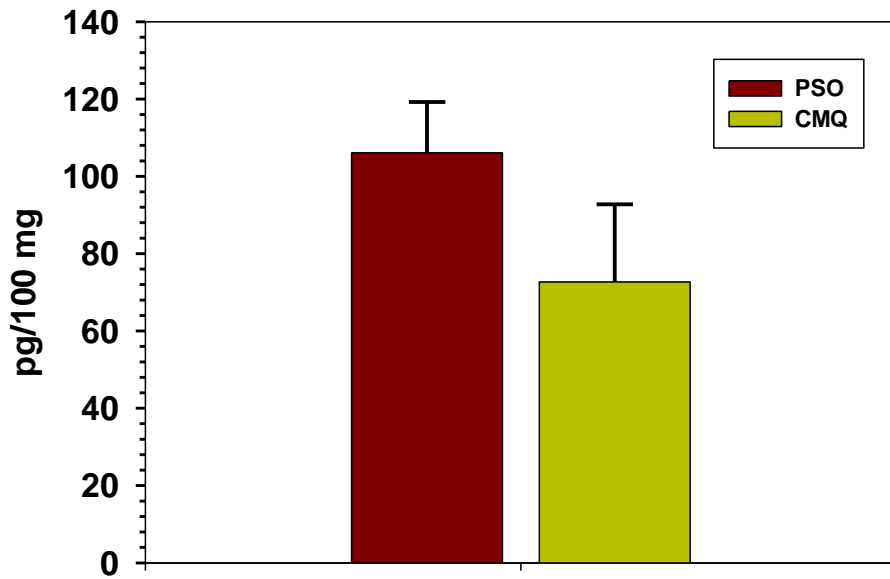


Figura 122: Concentraciones de factor de Crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en los ganglios linfáticos mesentéricos en ratas pseudo-operadas, (PSO) y con colestasis microquirúrgica. Media \pm DE.

VEGF en HÍGADO

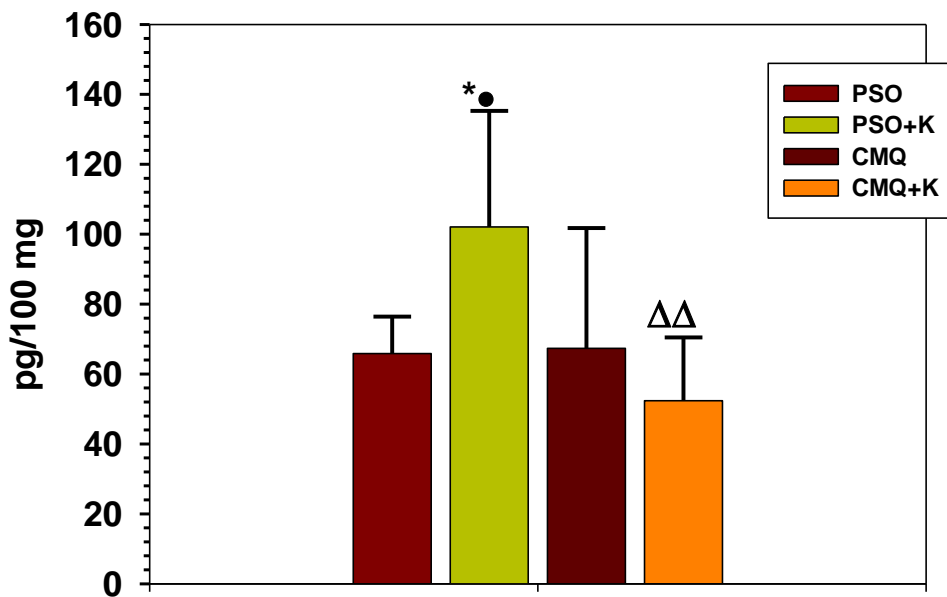


Figura 123: Concentraciones de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en el hígado de ratas pseudo-operadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudo-operadas tratadas con ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén. (CMQ+K). Media \pm DE; * $p < 0.05$: valor ES respecto a PSO; $\bullet p < 0.05$: valor ES respecto de CMQ; $\Delta\Delta p < 0.01$: valor ES respecto de PSO+K

V. DISCUSIÓN

En un modelo experimental microquirúrgico de colestasis extrahepática, el tratamiento con ketotifen, un fármaco estabilizador de membrana de células cebadas, produce efectos beneficiosos como son la disminución de la hepatomegalia, asociada a disminución de la fibrosis hepática, y de la médula esplenomegalia, la reducción del volumen ascítico y de la presión portal, y la disminución de las concentraciones plasmáticas de bilirrubina y ácidos biliares, en tanto que incrementa la concentración de proteínas totales. Por el contrario, se observó que en los animales colestásicos tratados con ketotifen, disminuyen los pesos corporal y testicular, aumenta la incidencia de circulación colateral portosistémica, aunque se reduce su grado, y es más ostensible la vasculopatía venosa mesentérica. El tratamiento con ketotifen, por último, produce variaciones las concentraciones esplánicas, esto es hepáticas, ileales y ganglionares linfáticas mesentéricas, de citoquinas (TNF- α , IL-17A, IL-10, IL-4, IL-1 β e IL-13), quimioquinas (MCP-1) y factores de crecimiento (TGF- β_1 y VEGF) en tanto que no modifica significativamente la reducida capacidad antioxidante (catalasa, glutatión transferasa, glutatión peroxidasa) esplánica que produce la colestasis extrahepática en la rata.

En este trabajo se ha utilizado un modelo experimental de colestasis consistente en la resección con técnica microquirúrgica de la vía biliar extrahepática de la rata (Aller y cols.,1993). Esta microtécnica quirúrgica se consideró de elección para el estudio de la colestasis extrahepática, ya que a diferencia de las técnicas macroquirúrgicas, consistentes en la ligadura y sección del colédoco, evita la producción de un pseudoquiste biliar con las subsiguientes complicaciones infecciosas locales (colangitis), regionales (abscesos hepáticos y peritonitis) y sistémicas (abscesos pulmonares, sepsis, shock séptico) (Aller y cols.,2004; Aller y cols., 2009).

La colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata se realiza disecando en continuidad el colédoco con los correspondientes conductos biliares de los lóbulos caudado, lateral derecho, medio y lateral izquierdo del hígado. Durante la microdissección se debe evitar la lesión de la arteria hepática propia así como de sus ramas lobulares. Por último, los conductos lobulares biliares se ligan a ras del parénquima hepático para evitar la persistencia de vía biliar extrahepática residual (Dieguez B y cols., 2002; Aller y cols.,2009).

El modelo resultante tras la resección microquirúrgica de la vía biliar extrahepática en la rata es de insuficiencia hepática progresiva lo que obliga a la administración de vitamina K para evitar la muerte de los animales por hemorragia durante las primeras semanas del post-operatorio (Aller y cols.,2008). Se consigue así que los animals desarrollen hepatomegalia, asociada a una intense respuesta proliferative ductular biliar con apoptosis de hepatocitos y colangiocitos y fibrosis (Sanchez-Patan y cols.,2008)

La respuesta inflamatoria hepática secundaria a la colestasis extrahepática se ha sugerido que posee similitud con la correspondiente a las heridas, ya que cursa con isquemia, estrés oxidativo y nitrosativo, infiltración leucocitaria, angiogenesis y fibrogenesis (Aller y cols.,2008; Aller y cols.,2010). Entre los factores etiopatogénicos, destacan la hipertensión intraductular y el estasis de sales biliares. En particular las sales biliares son potencialmente tóxicas para las células hepáticas y, a elevadas concentraciones, dañan la integridad mitocondrial, produciendo liberación de citocromo C y activación de la apoptosis. Sin embargo, la apoptosis también puede ser iniciada en el retículo endoplásmico. El acumulo de sales biliares podría causar estrés del retículo endoplásmico y liberación de calcio iónico con la subsiguiente activación de las cascadas apoptóticas, tanto en hepatocitos como en colangiocitos (Maillette de Buy Wenniger L and Beuers U, 2010; Aller y cols., 2010).

En los hígados colestásicos de la rata la proliferación ductual biliar se considera que es un proceso dinámico caracterizado por una continua formación y destrucción de colangiocitos por apoptosis (Glaser, SS y cols., 2010). Ya que los colangiocitos tienen la capacidad de inducir fibrogenesis, se ha sugerido que la fibrosis biliar se podría revertir favoreciendo la fagocitosis de los colangiocitos apoptóticos, por fagocitos profesionales como son los macrófagos (Popov Y. y cols.,2010). Sin embargo, es posible que el proceso de polarización de los macrófagos durante la colestasis implique diversas subpoblaciones. Así en respuesta a TNF- α e Interferon- γ (IFN- γ) los macrófagos se pueden polarizar hacia el clásico fenotipo M1 que se caracteriza por la elevada expresión de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-23 (Wynn TA.,2011). Sin embargo, los macrófagos también pueden polarizarse hacia el fenotipo alternativo M2a cuando sufren la influencia de IL-4 y

IL-13, consideradas citoquinas relacionadas con células Th₂. Asimismo, fenotipo M2b puede ser inducido por IL-1 β , en tanto que el fenotipo macrofágico M2c puede derivar del estímulo por IL-10, TGF- β o por glucocorticoides (Butcher MJ y Galkina EV,2012). En particular en el hígado colestásico, las células cebadas también podrían ser una fuente potencial de IL-1 β , IL-4, IL-13 e IL-10, las cuales podrían polarizar a los macrófagos según un fenotipo M2 que, a su vez, causaría entre otras alteraciones, fibrosis. Al contrario que los macrófagos con fenotipo M1, los macrófagos M2 están implicados en los proceso cicatriciales ya que causan remodelación de la matriz extracelular, esferocitosis y reclutamiento de fibroblastos (Wynn TA.,2011; Butcher MJ y Galkina EV,2012). En este supuesto el incremento de células esplánicas en las ratas con hipertensión portal secundaria a colestasis extrahepática microquirúrgica podría ser uno de los factores causantes de fibrosis hepática (Aller MA, y cols.,2010).

La colestasis extrahepática en la rata podría ser considerada un modelo experimental de fibrosis hepática (Hayashi H. y Sakai T.,2011). Entre los factores que podría favorecer la fibrogenesis en este modelo experimental destacan los opioides endógenos, en particular producidos por los colangiocitos (Glaser SS, y cols.,2010). Entre las funciones que caracterizan el epitelio biliar proliferante en la colestasis extrahepática experimental, destacan las relaciones con la producción de mediadores neuroendocrinos en particular los opioides (Glasser SS y cols. ,2010; Alpini G. y cols.,1988). La activación de los receptores opioides a su vez produce un incremento de la proliferación de células estrelladas hepáticas con incremento de la producción de colágeno (De Minicis S. y cols.,2008).

Las células cebadas residen habitualmente, aunque en escaso número, en los tractos portales hepáticos, sin embargo en las patologías hepáticas crónicas como son la cirrosis biliar primaria y la cirrosis alcohólica, su número aumenta invadiendo no solo los espacios portales, sino también los sinusoides (Farrel DJ y cols.,1995). Incluso en estas enfermedades hepáticas progresivas, el incremento del número de células cebadas se correlaciona con el grado de fibrosis hepática. Por lo tanto, se ha sugerido que las células cebadas y sus mediadores pueden estar implicadas en la fibrogenesis hepática (Farrell DJ. y cols.,1995; Francis H. and Meininger CJ.,2010). Experimentalmente, en un modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica en la

rata también se ha demostrado que las células cebadas se acumulan en los espacios portales y alrededor de los conductos biliares proliferantes (Takeshita A y Shibayama Y.,2005).

Histamina es un mediador almacenado en las células cebadas residentes en los tejidos y desempeña importantes funciones en las distintas fases de la respuesta inflamatoria asociadas al proceso de curación de las heridas y, por tanto, a la fibrosis (Kupietzky A AND Levi-Schaffer F.,1996). Histamina es un estimulante de la migración de fibroblastos y, por lo tanto, puede contribuir a la producción de fibrosis (Kohyama T y cols., 2010). A su vez, la inhibición de las células cebadas por ketofifen, al reducir la concentración de histamina tisular podría inhibir la migración hepática de fibroblastos, así como su estimulación para la producción de colágeno, por lo que sería un mecanismo eficaz para revertir la fibrosis hepática (Garbuzenko E. y cols. ,2002).

Asimismo, las lesiones hepáticas son un factor fundamental en la inducción de transición epitelio-mesenquimal (Choi SS y Diehl AM.,2009). Tres tipos de células hepáticas se ha demostrado que pueden experimentar dicha transición, como son los hepatocitos, los colangiocitos y las células estrelladas hepáticas. En particular los colangiocitos pueden sufrir una completa transición epitelio-mesenquimal induciendo la expresión de genes mesenquimales y adquiriendo un fenotipo migratorio (Deng Y-H y cols.,2011). Asimismo, colangiocitos de ratas con fibrosis biliar co-expresan marcadores epiteliales y mesenquimales, una característica propia de la transición epitelio-mesenquimal (Choi SS y Diehl.,2009; Omenetti A y cols.,2008). Por lo tanto, se ha concluido que la atresia biliar y en general las hepatopatías asociadas a proliferación ductular, cursan con transición epitelio-mesenquimal, no solo producida por hepatocitos, sino también por colangiocitos (Diaz R y cols.,2008; Choi y Diehl, 2009).

En la actualidad, uno de los objetivos fundamentales en investigación hepática, es la reversibilidad de la fibrosis, causante de hipertensión portal. Hasta fechas recientes se considera que la fibrosis del hígado era irreversible y la única posibilidad terapéutica consistía en el control de los factores exógenos y endógenos (Ismail MH y Pinzani M 2011). Sin embargo, el descubrimiento de la actividad de

los distintos subtipos de macrófagos en la producción y resolución de la fibrosis ha modificado las expectativas terapéuticas respecto de esta patología. Así la interacción entre el sistema de quimioquinas y los macrófagos en procesos que causan la resolución de la fibrosis, es objeto de investigación con el objeto de obtener terapias eficaces (Mitchell C y cols., 2009; Desmet VJ y Roskams T, 2004).

Los modelos animales han sido muy útiles en el estudio de la fisiopatología de la fibrosis y cirrosis hepáticas (Tsukamoto H y cols.,1990; Iredale JF,2007). Aunque en la actualidad no existe un modelo experimental que reproduzca exactamente el proceso de fibrosis hepática en el ser humano (Iredale JF,2007), el estudio de modelos de fibrosis hepática en animales y en particular la rata, son fundamentales para el ensayo de nuevas terapias antifibrogénicas (Hoefs JC y cols.,2011). Por esta razón, el modelo de fibrosis por colestasis extrahepática microquirúrgica se ha utilizado en el presente trabajo. Este modelo ha permitido demostrar, el efecto beneficioso de ketotifen en el tratamiento de la fibrosis hepática y, por lo tanto, la implicación en su producción de las células cebadas espláncicas.

Ketotifen (4-(1-metil-4-piperidiliden) 4H-benzo[4,5]ciclohepta[1,2-b] tiofen-10 (9H)-hidrogeno fumarato), es un antagonista de receptor H₁ de histamina con propiedades estabilizadoras de células cebadas (Sakamoto T y cols.,2012). Aunque los mecanismos íntimos de la estabilización de células cebadas por ketotifen se desconocen se ha demostrado que el bloqueo que producen de los canales de calcio es esencial para evitar la degranulación de las células cebadas. Sin calcio intracelular las vesículas secretoras no pueden fusionarse con la membrana celular y, por lo tanto, las células cebadas no pueden degranular sus factores proinflamatorios (Spataro AC and Bossman HB.,1976; White JRT y cols.,1984). A su vez en el hígado colestásico ketotifen, además de reducir la liberación de mediadores inflamatorios podría también inhibir la liberación extracelular de HMGB₁ (High mobility group box 1) por células apoptóticas (Ramos L y cols.,2010). La colestasis extrahepática microquirúrgica es causante de apoptosis hepatocitaria, asociada a la proliferación ductular biliar y al acúmulo de células cebadas alrededor de los conductos biliares proliferantes (Aller MA y cols.,2008). A su vez, macrófagos derivados de la médula ósea, se ha descrito que en las reacciones ductulares biliares a la agresión, son capaces de fagocitar los hepatocitos tanto apoptóticos como necrosados, estimulando

el excesivo acúmulo de miofibroblastos con progresiva producción de matriz extracelular, disregulación de las células endoteliales hepáticas con remodelación vascular que causa fibrosis, hipertensión venosa portal y ascitis (Boulter L y cols.,2012; Diehl AM ,2012). Por esta razón, la disminución de la fibrosis hepática en las ratas colestásicas tratados con ketotifen, podría ser atribuida tanto a la acción estabilizadora de células cebadas (Sakamoto T. y cols., 2012) como a su acción inhibidora de la liberación de HMGB₁ por células apoptóticas. En este sentido mediadores nucleares, incluyendo DNA se consideran altamente proinflamatorios y su liberación extracelular durante la apoptosis, puede ser causante de inflamación hepática (Konstantinidis K y Kitsis RN, 2012).

Otro importante mecanismo antiinflamatorio de ketotifen, se fundamenta en su capacidad para regular la actividad metabólica de los fagocitos. Así, como la mayoría de los antihistamínicos-H₁, ketotifen inhibe el metabolismo de los macrófagos durante la respuesta inflamatoria, que se considera dependiente de mieloperoxidasa. El resultado es la modulación en la liberación de mediadores inflamatorios como óxido nítrico (NO) y radicales libres de oxígeno (Lojek A y cols., 2011). En otros procesos inflamatorios crónicos la estabilización de células cebadas también ha demostrado que influye tanto en el gasto energético como en la apoptosis y en la angiogénesis. Esta polifacética actividad de ketotifen, ha permitido su utilización con éxito en el tratamiento de alteraciones metabólicas crónicas como por ejemplo la obesidad y la diabetes (Wang J y Shi G-P,2011).

La inhibición del funcionalismo fagocitario por ketotifen, sugiere que en los animales colestásicos tratados con este fármaco se reduciría el efecto estimulante de los miofibroblastos por macrófagos, con disminución de la producción de IL-6 y de colágeno, disminución de la transdiferenciación de fibroblastos en miofibroblastos y, por último, reducción de la fibrogénesis hepática, disminución de la resistencia al flujo portal y menor intensidad de hipertensión en el territorio esplácnico (Ma F y cols.,2012). Entre los mediadores de células cebadas y macrófagos implicados en la estimulación de los fibroblastos, destaca TGF- β (Monument y cols.,2012). Ya que TGF- β aumenta en los hígados colestásicos alcanzando significativas concentraciones, su disminución causada por el tratamiento con ketotifen,

constituiría uno de los mecanismos antifibrogénicos de éste fármaco (Monument MJ y cols.,2010).

La acción de ketotifen en la actividad fibrogénica hepática también se sugiere por los resultados obtenidos, que es dosis-dependiente. Por esta razón, los animales con menor ingesta del fármaco no presentan disminución de la fibrosis hepática. En esencia, la acción terapéutica de ketotifen, exige una adecuada estabilización de la membrana celular de las células cebadas, evitando tanto la degranulación vesicular como la intercomunicación con células vecinas, esto es, fibroblastos, células dendríticas y linfocitos T, que en su conjunto participan en la patogenia de la fibrosis hepática (Foley TT y cols.,2011; Carroll-Portillo A y cols.,2012).

Otras consecuencias patológicas de la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata es la producción de circulación colateral portosistémica secundaria a la hipertensión portal, así como la ascitis (Aller MA y cols.,2004). Se ha propuesto que la hipertensión portal induce una respuesta inflamatoria de origen espláncico y con repercusión sistémica que sería de interés caracterizar, principalmente por sus implicaciones terapéuticas (Aller MA y cols.,2007). En la rata, la hipertensión portal se podría considerar que durante su evolución cambian los mecanismos que la producen. Así en fases precoces se atribuye el aumento de la resistencia al flujo portal, pero cuando se desarrolla la circulación colateral portosistémica, el mantenimiento de la hipertensión portal se atribuye al incremento del flujo sanguíneo arterial mesentérico (Sikuler E y cols.,1985; Sikuler y Groszmann,1986; Vorobioff y cols.,1983;Vorobioff y cols.,1984).

En esencia, la hipertensión portal cursa con circulación hiperdinámica espláncica y sistémica de naturaleza multifactorial (Kroeger RJ y Goszmann JR.,1985; Bosch J y cols.,1992; Iwakiri Y y Groszmann RJ ,2006). En las ratas, con hipertension portal prehepática la circulación hiperdinámica se atribuye a dos mecanismos:

- 1) El incremento de mediadores vasodilatadores, como son óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO), TNF- α , glucagón, prostaciclina (PGI₂), endocannabinoides, adrenomedulina y sulfuro de hidrógeno (H₂S) (Iwakiri y Groszmann ,2006).

2) La anómala respuesta a mediadores vasoconstrictores ya endógenos como noradrenalina, endotelina y vasopresina, o bien exógenos como fármacos alfa-agonistas (Bomzon y Blendis ,1987; Blanco-Rivero J, y cols.,2009; Sastre E y cols.,2012).

En el modelo microquirúrgico de colestasis extrahepática en la rata la hipertensión portal se asocia también con gran desarrollo de la circulación colateral portosistémica, principalmente de tipo esplenorenal, así como ascitis a corto plazo. Aunque se ha sugerido que el desarrollo de circulación colateral portosistémica se debe a la apertura de vasos preexistentes, en la actualidad se considera que es un proceso de neoangiogénesis mediado principalmente por el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (Fernandez M y cols.,2005).

En la hipertensión portal el flujo linfático esplácnico también podría influenciar su evolución. En particular, el tracto gastrointestinal sufre edema en la hipertensión portal, favoreciendo así el incremento del flujo linfático e, incluso causando dilatación de los vasos linfáticos (Ikeda R y cols.,2001). Es posible que esta dilatación vascular linfática se produzca tanto por el excesivo drenaje de líquido intersticial, como por éstasis linfático, inducido por la acción de mediadores inflamatorios, liberados por las células cebadas, en el endotelio linfático. Asimismo, estos mediadores podría inhibir la actividad contráctil propulsora de la linfa. En este supuesto, tanto el edema intersticial como la dilatación vascular linfática podrían influenciar la evolución de la hipertensión portal, tanto en el ámbito esplácnico como sistémico (Aller y cols.,2007; Aller MA y cols.,2010).

También las células cebadas han sido implicadas en la producción de traslocación bacteriana intestinal en las ratas con hipertensión portal (Llamas MA y cols., 2010). Se ha demostrado que a los 30 días de evolución, la hipertensión portal prehepática, causa traslocación bacteriana a los ganglios linfáticos mesentéricos (Lamas MA y cols., 2010). Entre los factores intestinales que podrían estar implicados en la producción de traslocación bacteriana destacan la disbacteriosis y el aumento de permeabilidad intestinal (Wiest R y Rath MC ,2003; Garcia-Tsao G y cols., 1993). Se ha sugerido que en la hipertensión portal experimental podría existir un eje inflamatorio hepato-intestinal, con producción hepática de mediadores

proinflamatorios como son TNF- α , IL-1 β y NO, en tanto que en el tracto gastrointestinal se produce un incremento de IL-10, una citoquina con poderosa acción antiinflamatoria, y también mediadora de la respuesta por células Th2 (Aller y cols.,2005; Palma MD y cols.,2005). Por esta razón, se ha sugerido que la respuesta inflamatoria esplácnica asociada a la hipertensión portal podría estar implicada en la producción de traslocación bacteriana intestinal a los ganglios linfáticos mesentéricos (Llamas MA y cols.,2010).

La hipertensión portal causa una respuesta inflamatoria tanto esplácnica como sistémica, con implicación de las células cebadas en su etiopatogenia (Aller MA y cols.,2007; Aller MA y cols.,2007). Entre los procesos inflamatorios en los que se ha demostrado la participación de las células cebadas, destacan las enfermedades autoinmunes, como son la esclerosis múltiple, la dermatitis atópica, la psoriasis y la artritis reumatoide (Theoharides TC y cols.,2012). Sin embargo, otros procesos inflamatorios como son los post-traumáticos e infecciosos también se desarrollan con participación de las células cebadas (Galli SJ y Tsai M ,2008; Moon TC cols.,2010; Galli SJ y cols.,2011). En la hipertension portal las células cebadas por su interacción bidireccional con las neuronas en el tracto gastrointestinal (Van Nassauw L y cols.,2007) pueden ser activadas por múltiples factores neuronales entre los que se incluyen los neurotransmisores (Moon TC y cols.,2010; Bischoff SC ,2009; de Jonge WJ, 2011; Van Diest SA y cols. ,2012; De Winter Y y cols.,2012). Sin embargo, se debe también que estas células aunque inflamatorias en determinadas circunstancias, también poseen acción antiinflamatoria, favorecen la tolerancia, inducen la resolución de la inflamación y participan en el mantenimiento de la homeostasis tisular y orgánica (Galli SJ y Tsain M.,2008; de Vries VC y Noelle RJ. ,2010; Lu LF y cols.,2006). Por lo tanto, en el intestino aunque poseen actividad inflamatoria, también constituyen una defensa antimicrobiana, y están implicadas en el control de la función de la barrera intestinal (Bischoff SC.,2009).

En respuesta a la hipertensión portal las células cebadas intestinales, podrían producir disfunción de la barrera epitelial, con traslocación bacteriana y alteración de la motilidad intestinal que favorece la disbacteriosis (Snoek Sa y cols. ,2012). Con independencia de la estimulación neural de las células cebadas en la hipertensión portal, secundaria a la hiperactividad sistémica simpática (Aller MA y cols., 2007)

también se ha implicado en la activación de su fenotipo proinflamatorio al estímulo que ejercería la hiperactividad del eje renina-angiotensina-aldosterona (Paizis G. y cols.,2002). En este sentido la degranulación de las células cebadas con liberación de proteasas (Caughey GH.,2011), activaría los receptores de proteasas localizados en las células epiteliales intestinales, e incrementaría la permeabilidad de la barrera intestinal (Moriez R y cols.,2007). Por lo tanto, ketotifen, al estabilizar las células cebadas intestinales, reduciría la permeabilidad epitelial y la traslocación bacteriana intestinal y, en consecuencia, inhibiría la respuesta inflamatoria intestinal (Moriez R, y cols.,2007). Asimismo, se ha descrito que la liberación de histamina y triptasa por las células cebadas intestinales, se asocian al correspondiente incremento de estos mediadores inflamatorios en el tejido pulmonar, lo que sugiere que la activación de células cebadas intestinales podría estimular migración de células cebadas a los pulmones, así como su posterior estimulación. A su vez, la administración de ketotifen, inhibe la respuesta inflamatoria pulmonar secundaria a la activación de células cebadas intestinales (Huang P y cols., 2012). Ketotifen, también ha demostrado su eficacia en otros procesos inflamatorios intestinales como son el síndrome de intestino irritable (Klooker TK y cols.,2010) y el ileo postoperatorio (The FO y cols., 2009).

Ya que la respuesta inflamatoria que induce la hipertensión portal en el territorio esplácnico podría estar mediada por células cebadas, el tratamiento con ketotifen reduciría o inhibiría dicha complicación. Este hipotético planteamiento patogénico de la hipertensión portal, lo sugiere la experimentación previa utilizando ratas con ligadura estenosante de la vena porta o bien ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica (Aller MA y cols. ,2007; Aller MA y cols. ,2008). En las ratas con hipertensión portal prehepática, se produce un significativo incremento de células cebadas tanto en el tracto intestinal como en los ganglios linfáticos mesentéricos (Diez-Arias y cols. ,2001; Prieto I y cols. ,2005; Aller MA y cols. ,2007). En el tracto intestinal las células cebadas aumentan en la submucosa de las ratas con hipertensión portal prehepática (Diaz-Arias y cols.,2001; Prieto I y cols. ,2005). Sin embargo, en la rata existen dos subtipos de células cebadas las denominadas mucosas (MMCs) y las conectivas (CTMCs), así denominadas por su preferente localización en contacto con mucosas o con el tejido conectivo, esto es, submucosa y peritoneo respectivamente (Kinet JP. ,2007; Hallgren J y Gurish MF

,2007). Ambos subtipos poseen distintas características funcionales y éstas, a su vez, pueden ser condicionadas por el medio ambiente (Hallgrend y Gurish MF,2007).

En las ratas con hipertensión portal prehepática el incremento de células cebadas en la submucosa quizá pertenezca al subtipo conectivo (CTMCs) y sus mediadores se ha propuesto que podrían estar implicados en la producción de las alteraciones inflamatorias esplácnicas propias de este modelo experimental (Moquillaza L y cols. ,2010). El incremento de la densidad intestinal de células cebadas en la colestasis, extrahepática experimental, podría participar en la regulación de la respuesta inmunológica esplácnica a la hipertensión portal, mediante la síntesis y liberación de múltiples citoquinas (Garcia-Dominguez J y cols. , 2010). Tras su activación, las células cebadas en el tracto gastrointestinal pueden liberar IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-16, IL-18, IL-25, TNF α , factor estimulante de colonias macrófago-granulocito (GM-CSF), péptido quimiotáctico de macrófagos (MCP-1), RANTES (regulated on activation of normal T cells-expressed and secreted protein) y eotaxina (He SH. ,2004; Aller MA y cols. , 2007; Galli SJ. ,1990; Galli SJ y cols. ,2008; Bischoff SC. ,2009).

Sin embargo, durante la evolución de la colestasis experimental se produce una alteración heterogénea de la distribución de citoquinas pro- y anti-inflamatorias esplácnicas. En esencia, aumenta la concentración de TNF- α , IL-1 β e IL-10 en el tracto gastrointestinal y ganglios linfáticos mesentéricos, en tanto se reduce a nivel hepático y no se demuestran concentraciones significativas esplácnicas (Garcia-Dominguez J. y cols. ,2010). Se ha sugerido que la respuesta inflamatoria esplácnica en la colestasis microquirúrgica experimental, por estar mediada por células cebadas y presentar incremento de las concentraciones esplácnicas de IL-4 e IL-10, podría ser considerada una respuesta de tipo Th2 (Garcia-Dominguez J. y cols. , 2010). En este supuesto, la respuesta inflamatoria esplácnica post-colestasis microquirúrgica experimental estaría mediada predominantemente por citoquinas de tipo Th2 (Ogasawara M. y cols. ,2006). Los hallazgos del presente trabajo experimental, confirman resultados previos y aportan datos que permiten caracterizar mejor dicha respuesta inflamatoria, en particular en el intestino delgado. Así el incremento ileal de IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, MCP-1 y TGF- β 1 sugieren la existencia de una respuesta inflamatoria que podría estar protagonizada por células cebadas, las cuales

ejercerían mediante la liberación de los citados mediadores, el reclutamiento y supervivencia de numerosas células inmunes, entre las que se incluirían granulocitos, monocitos/macrófagos y linfocitos. Asimismo, las células cebadas podrían modular el fenotipo y la función de dichas células inflamatorias reclutadas en el intestino (Theoharides TC y cols.,1982; Sarchio SNE y cols. ,2012). En particular histamine, sintetizada, almacenada y liberada por las células cebadas, podría ejercer una función moduladora de la respuesta inmunológica intestinal ya que puede cambiar el balance Th1/Th2 mediante su acción en receptores de histamina linfocitarios (Ogasawara M, y cols.,2006).

En este modelo experimental de colestasis, la ictericia es también un factor importante en tanto que mediador de la respuesta inflamatoria. En particular, la bilirrubina posee numerosas propiedades bioquímicas y biológicas (Vitek KL y Schawertner HA. ,2007). Bilirrubina ejerce una acción protectora contra el estrés oxidativo (Vitek KL y Schawertner HA. ,2007), tiene propiedades antiapoptóticas y antimutagénicas (Bulmer AC y cols, 2008) y por último, es un potente inmunomodulador (Moseley RH. ,1999). En un modelo de endotoxemia en el ratón se ha demostrado que una sola dosis de bilirrubina ejerce efecto antioxidante así como una intensa actividad anti-inflamatoria (Moseley RH. , 1999). Por lo tanto, en el modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica no se debe excluir el importante efecto antioxidante e inmunomodulador que realizaría la bilirrubina.

En el intestino de ratas colestásicas, MCP-1, IL-4 e IL-13 liberados por células cebadas, pueden atraer otras células inflamatorias como neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos. A su vez, la liberación de IL-13 puede ser portenciada por la presencia de IL-4 que es capaz de regular el fenotipo de las células cebadas induciendo la producción de citoquinas tipo Th2, entre las cuales se incluye IL-13 e IL-10 (Bischoff SC.,2009). MCP-1/CCL2 es una de las quimioquinas mejor estudiadas de las que se expresan por células inflamatorias y del estroma. En la enteropatía hipertensiva portal, las células endoteliales podrían producir MCP-1 contribuyendo así a la atracción de monocitos, neutrófilos y linfocitos y facilitando la diapédesis de éstas células al espacio intersticial intestinal. A su vez, estas células infiltradas en el intersticio producirían mediadores inflamatorios que activarían a las

células residentes intestinales y, por lo tanto, iniciarían y facilitarían la progresión de la respuesta inflamatoria en el tracto intestinal (Kolattukudy PE y Niu J, 2012). Por lo tanto, interferir en la interacción entre MCP-1 con CCR2 puede ser un mecanismo beneficioso en la hipertensión portal ya que suprimiría la respuesta inflamatoria intestinal y, por esta razón, sus efectos sistémicos. En otros tipos de inflamación intestinal, como es la colitis ulcerosa, se ha demostrado también el incremento en la expresión de MCP-1mRNA y proteína en macrófagos, células musculares lisas y células endoteliales de la mucosa inflamada. Por esta razón, se ha propuesto el tratamiento con un inhibidor de la síntesis de MCP-1 de la enfermedad inflamatoria intestinal (Yadav A y cols. ,2010).

En la respuesta inflamatoria esplácnica, inducida por la hipertensión portal, la hipoxia puede desempeñar un protagonismo especial ya que podría activar los macrófagos causando la liberación de MCP-1 en la circulación. A su vez, MCP-1 puede inducir la degranulación perivascular de células cebadas. Entre los mediadores liberados por células cebadas las peptidasas causan activación del sistema renina-angiotensina, cuyo producto final es el octapéptido vasoactivo, angiotensina II (Caughey GH. ,2011). Las proteasas son el tipo de proteínas que con mayor abundancia producen las células cebadas. Al liberarse por degranulación, las proteasas de células cebadas, activarían la respuesta inflamatoria, estimularían la producción de angiotensina II y, por último, la liberación de aldosterona con ahorro de agua y sodio. Además la activación del sistema renina-angiotensina, favorece las interacciones adhesivas entre el endotelio vascular y los leucocitos e incrementa la permeabilidad vascular (Chao J y cols. ,2011). Sin embargo, las proteasas también están implicadas en mecanismos anti-inflamatorios, así como en la resolución de la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, la variedad de funciones de las proteasas de células cebadas, exige cautela, en la valoración de su acción patogénica en la respuesta inflamatoria esplácnica secundaria a hipertensión portal (Caughey G. ,2011).

La disminución de la concentración intestinal de IL-13 en las ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifen se ha considerado un resultado sugerente de la actividad antiinflamatoria de este fármaco. La IL-13 es una citoquina inmunoreguladora secretada por células Th2 activadas y posee funciones similares a

IL-4. En este sentido IL-13 puede contribuir a perpetuar la respuesta tipo 2, por varios mecanismos, como por ejemplo induciendo la expresión de quimioquinas que atraen a linfocitos Th2, o produciendo la liberación de adenosina e histamina que, a su vez, estimularían a células cebadas en la producción de más IL-13. Otros efectos de IL-13 atañen a las células del epitelio intestinal ya que se ha descrito su implicación en la hiperplasia de células caliciformes (Fushiotti P. ,2011).

En la enteropatía hipertensión portal, la hipoxia de la mucosa intestinal induce la expresión de factor inducible de hipoxia (HIF)-1 que constituye un factor de alarma para inducir la inflamación, aunque también promueve su resolución (Colgan SP y Taylor CT. ,2010). La hipoxia inhibe HIF-hidrolasas, inhibiendo a su vez la degradación de HIF-1 y, por tanto, favorece su estabilización (Aragones J y cols. ,2008). En la enteropatía hipertensión portal, la redistribución del flujo sanguíneo se ha sugerido que produciría mediante un proceso de isquemia-revascularización, aumento de la permeabilidad endotelial y oxidación que causaría edema intersticial (Aller MA, y cols. ,2007). Numerosos mediadores de células cebadas incluyendo IL-4, IL-13, histamina y proteasas neutras podrían participar en la producción de edema parietal intestinal (Galli SJ y cols. ,2008). A su vez, ketotifen, al reducir el componente inflamatorio intestinal de tipo 2, mediante la inhibición de la degranulación de células cebadas, favorecería el flujo sanguíneo mucoso intestinal, disminuiría el grado de edema e inhibiría la traslocación bacteriana, contribuyendo así a la disminución de la intensidad de la respuesta inflamatoria tanto esplácnica como sistémica.

Las células cebadas también podrían realizar una función mediadora en la remodelación intestinal secundaria a la insuficiencia hepática crónica colestásica experimental. En esta respuesta remodeladora participaría el parénquima, representado por el epitelio intestinal, y el estroma, constituido por el tejido conectivo y las estructuras vasculo-nerviosas. Respecto del epitelio, se ha demostrado que la hipertensión portal induce la hiperplasia de las células calciformes productoras de moco (Corcuera MI y cols. ,2005; Sanchez-Patan F y cols. ,2006). La hipersecreción de mucosa intestinal secundaria a la hipertensión portal podría tener también características defensivas para el organismo, en tanto que, componente de la barrera mucosa intestinal. Además las células caliciformes secretan en la luz

intestinal péptidos que protegen el epitelio intestinal de la agresión y promueven su reparación (Blikslager AT y cols. ,2007).

Estudios previos en un modelo de hipertensión portal prehepática en la rata, han demostrado que ketotifen reduce la presión portal, la concentración de RMCP-II en los ganglios linfáticos mesentéricos y el número de células cebadas degranuladas en el ciego. En este experimento ketotifen, fue administrado por vía subcutánea, incluido en microesferas de polímeros, el día previo a la producción de hipertensión portal y los animales fueron sacrificados a las 48 h de evolución postoperatoria (Sanchez-Patan F y cols.,2008). Estos resultados sugieren que la profilaxis antiinflamatoria con ketotifen es eficaz respecto de algunas de las alteraciones precoces que produce la hipertensión portal.

Se ha considerado por algunos autores que el incremento inicial de la presión portal tras realizar la estenosis de la vena porta, podría tener unos efectos permanentes en el desarrollo de la hipertensión portal (Geraghty JG y cols.,1989). Esta hipótesis ha sido avalada por experimentos que demuestran que la administración de propanolol, clonidina y octreótido antes de realizar la ligadura parcial portal es capaz de prevenir algunas de las alteraciones de la hipertensión portal (Lee FY y cols. ,1993; Lin HC y cols. ,1996).

Ulteriormente, al demostrarse la implicación de mecanismos inflamatorios en la producción del síndrome hipertensivo portal experimental (Aller MA, y cols. ,2005) se ha pretendido demostrar la citada hipótesis mediante la administración, previa a la producción de hipertensión portal, de fármacos antiinflamatorios. Así, la administración profiláctica del corticosteroide budesonida, reduce el edema peripancreático retroperitoenal, el exudado peritoneal, la hipoproteinemia y la hipoalbuminemia precoz en ratas con ligadura estenosante portal (Vega de Ceniga M y cols.,2003). Estos experimentos se realizaron en periodos evolutivos precoces, esto es entre 24 y 48 h del postoperatorio, ya que en esta fase aún no se ha desarrollado la circulación colateral portosistémica y, por tanto, la intensidad de la hipertensión portal es máxima.

En las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica, la administración oral de ketotifen en un periodo comprendido desde las 24 h previas a la intervención hasta su sacrificio a las 6-8 semanas del postoperatorio, permite comprobar el efecto de su administración previa al estudio proinflamatorio, representado por la intervención, la colestasis y la hipertensión portal. Los resultados obtenidos demuestran su efecto beneficioso, con disminución de la presión portal, de la ascitis y de la hepatomegalia, asociada a una significativa disminución de la fibrosis hepática asociada a la dosis del fármaco. Asimismo, esta acción terapéutica del ketotifen, permite ser atribuida a la inhibición del mecanismo patogénico que poseen las células cebadas, tanto en la producción de hipertensión portal y ascitis, como de fibrosis colestásica.

La actuación de ketotifen en la colestasis experimental también implicaría la modulación del eje sistema nervioso-célula cebada y, por lo tanto, de la inflamación neurogénica asociada a la hipertensión portal. Además, en el intestino la estimulación de los receptores nerviosos sensitivos y de las células inflamatorias incluyendo las células cebadas, es el origen de una información que se procesa en el sistema nervioso entérico. El resultado es la interpretación de las señales inflamatorias elaborando un comportamiento secretor y peristáltico que altera la flora bacteriana intestinal así como la función de la barrera intestinal (Sansone PJ., 2008). Por lo tanto, ketotifen, por su acción antiinflamatoria, similar a la que se ha descrito en procesos alérgicos, podría reducir la degranulación de células cebadas intestinales, aminorando su componente inflamatorio neurogénico y ejerciendo una actividad defensiva de la barrera mucosa intestinal por mecanismo neuroinmunológico central.

Ketotifen, por las citadas razones reduciría la intensidad inflamatoria esplácnica secundaria a la hipertensión portal y a la insuficiencia hepática, mediante el aumento en la producción de IL-10. Esta citoquina, descrita originalmente como un factor inhibidor de secreción, es producida por células T CD4^T y entre sus funciones principales destacan su capacidad para suprimir la secreción de citoquinas proinflamatorias, como por ejemplo IL-2, TNF- α e interferon- γ (Pestka S y cols., 2004). En la actualidad, IL-10 se considera una citoquina con gran poder antiinflamatorio. Esta capacidad para limitar la intensidad de la respuesta inmunológica se pretende utilizar con fines terapéuticos. Así en procesos inflamatorios intestinales,

se considera que el aumento de la producción de IL-10, atenuaría la respuesta inflamatoria y protegería a la mucosa (Emami CN y cols. ,2012).

Asimismo, IL-22 una citoquina de la familia IL-10, ejerce una acción protectora contra los mediadores proinflamatorios en las respuestas inflamatorias intestinales, estimulando a las células epiteliales para que produzcan proteínas antibacterianas que protejan la barrera mucosa. Mediante estas funciones beneficiosas IL-22 se ha demostrado que contribuye a la mejoría de diversos tipos de colitis crónica experimental (Mizoguchi A. , 2012).

En la enteropatía causada por la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata, el tratamiento con ketotifen, demuestra que causa un significativo aumento ileal de esta poderosa citoquina antiinflamatoria y, por esta razón, se podría sugerir que la estabilización de células cebadas favorecería la proliferación de células T reguladoras (Treg) productoras de IL-10 y TGF- β , e induciría una tolerancia mucosa a la agresión (Akdis CA. ,2012).

Se podría considerar que en la hipertensión portal secundaria a colestasis extrahepática microquirúrgica, las células cebadas intestinales efectuarían un importante efecto patogénico en las distintas fases evolutivas de la enteropatía hipertensiva portal. En sus fases iniciales podrían participar en la redistribución del flujo sanguíneo en la pared intestinal y, en particular, en la mucosa y submucosa, ocasionando fenómenos de isquemia-revascularización que, a su vez, causarían estrés oxidativo y nitrosativo con edema intersticial, aumentada expresión de quimioquinas y reclutamiento de leucocitos. A su vez, la respuesta inflamatoria intestinal favorecería el reclutamiento y proliferación de células cebadas con la subsiguiente producción de factores de crecimiento (TGF- β_1 y VEGF) que a largo plazo remodelarían la pared intestinal. En este caso, el tratamiento con ketotifen al reducir la respuesta inflamatoria inicial, modularía la respuesta inflamatoria a largo plazo y en consecuencia aminoraría la remodelación intestinal y en particular, la angiogénesis característica de esta enteropatía (Fernandez M y cols. ,2005), favoreciendo así el mantenimiento de la integridad de la barrera mucosa intestinal y moderando la intensidad de la circulación hiperdinámica esplácnica y sistémica (Fernandez M y cols. ,2009).

Los resultados del presente trabajo no excluyen el efecto beneficioso de las células cebadas en la patología intestinal secundaria a la colestasis extrahepática experimental. Por lo tanto, la acción anti-inflamatoria de ketotifen, no excluye que actuando en subpoblaciones proinflamatorias de células cebadas, induzca la expresión de subpoblaciones inductoras de tolerancia y, por tanto, la tendencia a la resolución de la inflamación y la homeostasis.

La disminución del volumen ascítico en las ratas colestásicas tratadas con ketotifen, sugiere la existencia de un mecanismo inflamatorio mediado por células cebadas en la patogenia de la ascitis. La ascitis es una grave complicación de las hepatopatías (Dong MH. ,2008). En las ratas con colestasis extrahepática se inicia a las 4 semanas del postoperatorio y se asocia a traslocación bacteriana intestinal con endotoxemia y respuesta inflamatoria sistémica (Assimakopoulos y Vagianos, 2009). Ya que ha sido propuesta la hipótesis de la implicación de células cebadas en la producción de ascitis en la hipertensión portal experimental secundaria a colestasis extrahepática (Aller MA, y cols. , 2010) en el presente trabajo se estudiaron las concentraciones de CGRP (Calcitonin gene-related peptide) e IL-13, en el líquido ascítico de las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica y su variación tras tratamiento con ketotifen. Los resultados demuestran que la estabilización de células cebadas reduce las concentraciones de ambos mediadores en el líquido ascítico.

IL-13 desempeña una importante acción en la respuesta inmune mediada por células Th2 (Price y cols. ,2010). Así el incremento de IL-13 se ha descrito en sangre periférica, esputo y líquido de lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos (Brightling y cols. ,2009). Aunque varios tipos de células pueden producir IL-13, en la respuesta inflamatoria de tipo 2, son las células cebadas su origen principal (Price y cols. ,2010; Zhang y cols. ,2010a). En las hepatopatías crónicas con fibrosis o cirrosis, IL-6 estimula la producción de IL-13 por células cebadas (Zhang y cols. ,2010b; Wiest y cols. ,2011). Por lo tanto, en las ratas con fibrosis hepática post-colestasis IL-6 podría estimular la liberación de IL-13 por células cebadas localizadas en la inmediación de vasos sanguíneos sub-mesoteliales. A su vez, la administración de ketotifen al estabilizar las células cebadas inhibiría su producción, así como su participación en la respuesta inflamatoria de tipo 2, causante de ascitis (Casella G y cols. ,2011).

CGRP también presenta elevadas concentraciones plasmáticas en pacientes con hepatopatías crónicas (Gupta y cols. ,1992). Su incremento en el líquido ascítico de las ratas con colestasis y su disminución tras el tratamiento con ketotifen, sugiere que su producción podría estar protagonizada por células cebadas. Las células cebadas peritoneales pueden inducir la liberación de CGRP por los nervios sensitivos (Kaur y cols. ,2009) favoreciendo el aumento de flujo sanguíneo peritoneal, el aumento de la permeabilidad vascular y, por último, el desarrollo de ascitis en las ratas colestásicas

La eficacia del tratamiento con ketotifen en la disminución de IL-13 y CGRP en el líquido ascítico de ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica, sugiere que en la producción de la ascitis participarían las células mediante, quizá causando una respuesta inflamatoria mediada por células Th2. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el tratamiento con estabilizadores de células cebadas podría constituir un tratamiento eficaz de la ascitis secundaria a insuficiencia hepática crónica e hipertensión portal.

VI. CONCLUSIONES

1. La colestasis extrahepática microquirúrgica experimental en la rata, causa hepatomegalia, con fibrosis, esplenomegalia, circulación colateral portosistémica y ascitis. Estas alteraciones son modificables mediante el tratamiento con Ketotifen, un fármaco estabilizador de las células cebadas.
2. La respuesta inflamatoria esplácnica en este modelo experimental quirúrgico de colestasis, se caracteriza por el incremento hepato-intestinal de mediadores asociados a una respuesta inflamatoria de tipo Th2 (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β_1). Quizá por ésta razón la inhibición funcional de las células cebadas reduce la concentración esplácnica de mediadores pro-inflamatorios asociados a una respuesta Th2.
3. El tratamiento con Ketotifen, un fármaco estabilizador de células cebadas, favorece el predominio de una respuesta anti-inflamatoria hepato-intestinal (IL-10, TGF- β), que disminuye el grado de hipertensión portal, así como la ascitis y la concentración de IL-13 y CGRP en el líquido ascítico.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdeldayem H, Ghoneim E, Refaei AA, Abou-Gabal A. Obstructive jaundice promotes intestinal-barrier dysfunction and bacterial translocation: experimental study. *Hepato Int* 2007;1(4):444-8.
- Abounassif MA, El-Obeid HA, Gadkariem EA. Stability studies on some benzocycloheptane antihistaminic agents. *J Pharm Biomed Anal* 2005;36(5):1011-8.
- Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver Transpl*. 2010;16(9):1016-32.
- Abraham SC, Poterucha JJ, Rosen CB, Demetris AJ, Krasinskas AM. Histologic abnormalities are common in protocol liver allograft biopsies from patients with normal liver function tests. *Am J Surg Pathol* 2008;32(7):965-73.
- Abraldes JG, García-Pagán JC. Animal models for the study of portal hypertension. *Gastroenterol Hepatol* 2006;29(1):51-9.
- Adair-Kirk TL, Senior RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(6-7):1101-10.
- Akdis CA. Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. *Nat Med* 2012;18(5):736-49.
- Akimoto T, Hayashi N, Adachi M, Kobayashi N, Zhang XJ, Ohsuga M, Katsuta Y. Viability and plasma vitamin K levels in the common bile duct-ligated rats. *Exp Anim* 2005;54(2):155-61.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Cell –cell adhesion and the extracellular matrix . En: *Molecular biology of the cell*. Edit. Garland Publishing, Inc. New York. Chapter 12,1983, pp. 673-715.
- Albrecht M, Frungieri MB, Kunz L, Rämisch R, Meineke V, Köhn FM, Mayerhofer A. Divergent effects of the major mast cell products histamine, tryptase and TNF-alpha on human fibroblast behaviour. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(23):2867-76.
- Allen K, Jaeschke H, Copple BL. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *Am J Pathol* 2011;178(1):175-86.
- Aller MA, Lorente L, Alonso S, Arias J. A model of cholestasis in the rat, using a microsurgical technique. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28 (1): 10-14.
- Aller MA, Arias JL, Lorente L, Nava MP, Durán HJ, Arias J. Neuro-immune-endocrine functional system and vascular pathology. *Med Hypotheses* 2001;57(5):561-9.
- Aller MA, Duran M, Ortega L, Arias JL, Nava MP, Prieto I, Arias J. Comparative study of macro- and microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery* 2004;24(6):442-7.
- Aller MA, Nava MP, Arias JL, Durán M, Prieto I, Llamas MA, Arias J. Microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat: a long-term study. *J Invest Surg* 2004;17(2):99-104.

- Aller MA, Nava MP, Lopez L, Mendez M, Mendez Lopez M, Arias J, Arias JI. Hypertension Portal Experimental. Editorial Complutense. Línea 300, 23:1-148,2005.
- Aller MA, Vara E, Garcia C, Palma MD, Arias JL, Nava MP, Arias J. Proinflammatory liver and antiinflammatory intestinal mediators involved in portal hypertensive rats. *Mediators Inflamm* 2005;2005(2):101-11.
- Aller MA, Vara E, García C, Nava MP, Angulo A, Sánchez-Patán F, Calderón A, Vergara P, Arias J. Hepatic lipid metabolism changes in short- and long-term prehepatic portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol* 2006;12(42):6828-34.
- Aller MA, Nava MP, Cuellar C, Chivato T, Arias JL, Sanchez-Patan F, de Vicente F, Alvarez E, Arias J. Evolutionary phases of experimental prehepatic portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22(7):1127-33.
- Aller MA, Arias JL, Arias J. The mast cell integrates the splanchnic and systemic inflammatory response in portal hypertension. *J Transl Med.* 2007;5:44.
- Aller MA, Arias JL, Cruz A, Arias J. Inflammation: a way to understanding the evolution of portal hypertension. *Theor Biol Med Model* 2007;4:44.
- Aller MA, Arias JL, García-Domínguez J, Arias JI, Durán M, Arias J. Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2008;1(1):6.
- Aller MA, Vara E, García C, Méndez M, Méndez-López M, Mejía I, López L, Arias JL, Arias J. Prehepatic portal hypertension worsens the enterohepatic redox balance in thioacetamide-cirrhotic rats. *Pathophysiology* 2008;15(4):233-42.
- Aller MA, Nava MP, Méndez M, Vergara P, Arias JL. Laboratory Rat Management. En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009a: 7-31.
- Aller MA, Prieto I, Cruz A, Losada M, Arias JI, García-Domínguez J, Argudo S, Arias JL, Arias J. Extrahepatic Cholestasis En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009b: 137-156.
- Aller MA, Arias J. Microsurgery: Instruments and Techniques En: *Microsurgery in Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009: 32-48.
- Aller MA, Nava MP. Anesthesia, Analgesia and Postoperative Care. En: *Microsurgery in Liver Research*, Aller MA, Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009: 49-70.
- Aller MA, Mendez M, Nava MP, Lopez L, Arias JL, Arias J. The value of microsurgery in liver research. *Liver Int* 2009;29(8):1132-40.
- Aller MA, García-Domínguez J, Vergara P, Arias J. Mast cells in wound-healing cholestatic liver response. *Burns* 2010;36(2):292-4.
- Aller MA, Arias JL, Prieto I, Losada M, Arias J. Bile duct ligation: step-by-step to cholangiocyte inflammatory tumorigenesis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22(6):651-61.

- Aller MA, Arias JJ, Arias J. Pathological axes of wound repair: Gastrulation revisited. *Theor Biol Med Model* 2010c; 7:37.
- Aller MA, Prieto I, Argudo S, de Vicente F, Santamaría L, de Miguel MP, Arias JL, Arias J. The interstitial lymphatic peritoneal mesothelium axis in portal hypertensive ascites: when in danger, go back to the sea. *Int J Inflamm* 2010;2010:148689.
- Alpini G, Lenzi R, Sarkozi L, Tavoloni N. Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. Evidence for a secretory function of proliferated bile ductules. *J Clin Invest* 1988;81(2):569-78.
- Alpini G, Roberts S, Kuntz SM, Ueno Y, Gubba S, Podila PV, LeSage G, LaRusso NF. Morphological, molecular, and functional heterogeneity of cholangiocytes from normal rat liver. *Gastroenterology* 1996;110(5):1636-43.
- Alpini G, Glaser S, Robertson W, Phinizy JL, Rodgers RE, Caligiuri A, LeSage G. Bile acids stimulate proliferative and secretory events in large but not small cholangiocytes. *Am J Physiol* 1997;273(2 Pt 1):G518-29.
- Alpini G, Glaser S, Robertson W, Rodgers RE, Phinizy JL, Lasater J, LeSage GD. Large but not small intrahepatic bile ducts are involved in secretin-regulated ductal bile secretion. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 1):G1064-74.
- Alpini G, Ulrich C, Roberts S, Phillips JO, Ueno Y, Podila PV, Colegio O, LeSage GD, Miller LJ, LaRusso NF. Molecular and functional heterogeneity of cholangiocytes from rat liver after bile duct ligation. *Am J Physiol* 1997;272(2 Pt 1):G289-97.
- Alpini G, Ueno Y, Glaser SS, Marzioni M, Phinizy JL, Francis H, Lesage G. Bile acid feeding increased proliferative activity and apical bile acid transporter expression in both small and large rat cholangiocytes. *Hepatology* 2001;34(5):868-76.
- Alpini G, Glaser S, Alvaro D, Ueno Y, Marzioni M, Francis H, Baiocchi L, Stati T, Barbaro B, Phinizy JL, Mauldin J, Lesage G. Bile acid depletion and repletion regulate cholangiocyte growth and secretion by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway in rats. *Gastroenterology* 2002;123(4):1226-37.
- Alpini G, McGill JM, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Hepatology* 2002;35(5):1256-68.
- Alvaro D, Alpini G, Jezequel AM, Bassotti C, Francia C, Fraioli F, Romeo R, Marucci L, Le Sage G, Glaser SS, Benedetti A. Role and mechanisms of action of acetylcholine in the regulation of rat cholangiocyte secretory functions. *J Clin Invest* 1997;100(6):1349-62.
- Alvaro D, Mancino MG, Onori P, Franchitto A, Alpini G, Francis H, Glaser S, Gaudio E. Estrogens and the pathophysiology of the biliary tree. *World J Gastroenterol* 2006;12(22):3537-45.
- Alvaro D, Macarri G, Mancino MG, Marzioni M, Bragazzi M, Onori P, Corradini SG, Invernizzi P, Franchitto A, Attili AF, Gaudio E, Benedetti A. Serum and biliary insulin-like growth factor I and vascular endothelial growth factor in

- determining the cause of obstructive cholestasis. *Ann Intern Med* 2007;147(7):451-9.
- Alving K, Sundström C, Matran R, Panula P, Hökfelt T, Lundberg JM. Association between histamine-containing mast cells and sensory nerves in the skin and airways of control and capsaicin-treated pigs. *Cell Tissue Res* 1991;264(3):529-38.
- Aragónés J, Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Dresselaers T, Mazzone M, Dirx R, Zacchigna S, Lemieux H, Jeoung NH, Lambrechts D, Bishop T, Lafuste P, Diez-Juan A, Harten SK, Van Noten P, De Bock K, Willam C, Tjwa M, Grosfeld A, Navet R, Moons L, Vandendriessche T, Deroose C, Wijeyekoon B, Nuyts J, Jordan B, Silasi-Mansat R, Lupu F, Dewerchin M, Pugh C, Salmon P, Mortelmans L, Gallez B, Gorus F, Buyse J, Sluse F, Harris RA, Gnaiger E, Hespel P, Van Hecke P, Schuit F, Van Veldhoven P, Ratcliffe P, Baes M, Maxwell P, Carmeliet P. Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet* 2008;40(2):170-80.
- Arduini A, Serviddio G, Escobar J, Tormos AM, Bellanti F, Viña J, Monsalve M, Sastre J. Mitochondrial biogenesis fails in secondary biliary cirrhosis in rats leading to mitochondrial DNA depletion and deletions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;301(1):G119-27.
- Arias JI, Aller MA, Arias J. The use of inflammation by tumor cells. *Cancer* 2005;104(2):223-8.
- Arias JI, Aller MA, Sánchez-Patan F, Arias J. Inflammation and cancer: is trophism the link? *Surg Oncol*. 2006;15(4):235-42.
- Arias JI, Aller MA, Arias J. Cancer cell: using inflammation to invade the host. *Mol Cancer* 2007;6:29.
- Armbrust T, Batusic D, Ringe B, Ramadori G. Mast cells distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis. Indications for mast cell participation in development of liver fibrosis. *J Hepatol* 1997;26(5):1042-54.
- Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grützkau A, Henz BM. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol* 1999;8(1):1-16.
- Assimakopoulos SF, Vagianos CE, Zervoudakis G, Filos KS, Georgiou C, Nikolopoulou V, Scopa CD. Gut regulatory peptides bombesin and neurotensin reduce hepatic oxidative stress and histological alterations in bile duct ligated rats. *Regul Pept* 2004;120(1-3):185-93.
- Assimakopoulos SF, Maroulis I, Patsoukis N, Vagenas K, Scopa CD, Georgiou CD, Vagianos CE. Effect of antioxidant treatments on the gut-liver axis oxidative status and function in bile duct-ligated rats. *World J Surg* 2007;31(10):2023-32.
- Assimakopoulos SF, Vagianos CE. Bile duct ligation in rats: a reliable model of hepatorenal syndrome? *World J Gastroenterol* 2009;15(1):121-3.

- Assimakopoulos SF, Konstantinou D, Georgiou C, Chroni E. Metabolism of polyamines and oxidative stress in the brain of cholestatic rats. *Amino Acids* 2010;38(3):973-4.
- Atamas SP, White B. The role of chemokines in the pathogenesis of scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15(6):772-7.
- Au SR, Au K, Saggars GC, Karne N, Ehrlich HP. Rat mast cells communicate with fibroblasts via gap junction intercellular communications. *J Cell Biochem* 2007;100(5):1170-7.
- Aubé C, Moal F, Oberti F, Roux J, Croquet V, Gallois Y, Argaud C, Caron C, Calès P. Diagnosis and measurement of liver fibrosis by MRI in bile duct ligated rats. *Dig Dis Sci* 2007;52(10):2601-9.
- Azouz A, Razzaque MS, El-Hallak M, Taguchi T. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. *Med Electron Microsc* 2004;37(3):141-8.
- Azmaiparashvili E, Kordzaia D, Dzidziguri D. Biliary hypertension as the cell proliferation trigger in bile duct ligated rats. *Georgian Med News* 2009;(168):111-6.
- Bachelet I, Levi-Schaffer F, Mekori YA. Mast cells: not only in allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006;26(3):407-25.
- Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22(4):464-71.
- Barón V, Hernández J, Noyola M, Escalante B, Muriel P. Nitric oxide and inducible nitric oxide synthase expression are downregulated in acute cholestasis in the rat accompanied by liver ischemia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2000;127(3):243-9.
- Bassler D, Mitra A, Ducharme FM, Forster J. Ketotifen alone or as additional medication for longterm control of asthma and wheeze in children. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2004; 1.
- Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells* 2007;24(2):153-66.
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115(2):209-18.
- Beck PL, Lee SS. Vitamin K1 improves survival in bile-duct-ligated rats with cirrhosis. *J Hepatol* 1995; 23: 235.
- Benedetti A, Bassotti C, Rapino K, Marucci L, Jezequel AM. A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *J Hepatol* 1996;24(3):335-42.
- Bergasa NV, Borque MJ, Wahl LM, Rabin L, Jones EA. Modulation of thioacetamide-induced hepatocellular necrosis by prostaglandins is associated with novel histologic changes. *Liver* 1992;12(4 Pt 1):168-74.
- Bergasa NV. The pruritus of cholestasis. *Semin Dermatol* 1995;14(4):302-12.
- Bergasa NV, Jones EA. The pruritus of cholestasis: potential pathogenic and therapeutic implications of opioids. *Gastroenterology* 1995;108(5):1582-8.

- Bergheim I, Harsch S, Mueller O, Schimmel S, Fritz P, Stange EF. Apical sodium bile acid transporter and ileal lipid binding protein in gallstone carriers. *J Lipid Res* 2006;47(1):42-50.
- Bergheim I, Guo L, Davis MA, Duveau I, Arteel GE. Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316(2):592-600.
- Bergmeyer HU, Bowers GN Jr, Horder M, Moss DW. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. *Clin Chim Acta* 1976;70(2):F19-29.
- Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem* 1978;24(1):58-73.
- Bergmeyer HU, Hørder M. International federation of clinical chemistry. Scientific committee. Expert panel on enzymes. IFCC document stage 2, draft 1; 1979-11-19 with a view to an IFCC recommendation. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980;18(8):521-34.
- Bernadich C, Bandi JC, Melin P, Bosch J. Effects of F-180, a new selective vasoconstrictor peptide, compared with terlipressin and vasopressin on systemic and splanchnic hemodynamics in a rat model of portal hypertension. *Hepatology* 1998;27(2):351-6.
- Bhattacharya A, Ghosal SK. Effect of hydrophobic permeation enhancers on the release and skin permeation kinetics from matrix type transdermal drug delivery system of ketotifen fumarate. *Acta Pol Pharm* 2001;58(2):101-5.
- Bischofs IB, Schwarz US. Cell organization in soft media due to active mechanosensing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(16):9274-9.
- Bischoff SC. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. *Semin Immunopathol* 2009;31(2):185-205.
- Bissell DM. Assessing fibrosis without a liver biopsy: are we there yet? *Gastroenterology* 2004;127(6):1847-9.
- Black DM, Behrns KE. A scientist revisits the atrophy-hypertrophy complex: hepatic apoptosis and regeneration. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11(4):849-64.
- Blanco-Rivero J, Aller MA, Arias J, Ferrer M, Balfagón G. Long-term portal hypertension increases the vasodilator response to acetylcholine in rat aorta: role of prostaglandin I₂. *Clin Sci (Lond)* 2009;117(10):365-74.
- Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev* 2007;87(2):545-64.
- Bogert PT, LaRusso NF. Cholangiocyte biology. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23(3):299-305.
- Bogorad RL, Ostroukhova TY, Orlova AN, Rubtsov PM, Smirnova OV. Prolactin receptors in rat cholangiocytes: regulation of level and isoform ratio is sex independent. *Biochemistry (Mosc)* 2006;71(2):178-84.

- Bomzon A, Gali D, Better OS, Blendis LM. Reversible suppression of the vascular contractile response in rats with obstructive jaundice. *J Lab Clin Med* 1985;105(5):568-72.
- Bomzon A, Blendis LM. Vascular reactivity in experimental portal hypertension. *Am J Physiol* 1987;252(2 Pt 1):G158-62.
- Bosch J, Pizcueta P, Feu F, Fernández M, García-Pagán JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21(1):1-14.
- Boulter L, Govaere O, Bird TG, Radulescu S, Ramachandran P, Pellicoro A, Ridgway RA, Seo SS, Spee B, Van Rooijen N, Sansom OJ, Iredale JP, Lowell S, Roskams T, Forbes SJ. Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med* 2012;18(4):572-9.
- Boyer JL. New perspectives for the treatment of cholestasis: lessons from basic science applied clinically. *J Hepatol* 2007;46(3):365-71.
- Boyer JL. It's all about bile. *Hepatology* 2009;49(3):711-23.
- Breyer-Pfaff U, Mey U, Green MD, Tephly TR. Comparative N-glucuronidation kinetics of ketotifen and amitriptyline by expressed human UDP-glucuronosyltransferases and liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2000;28(8):869-72.
- Brightling CE, Saha S, Hollins F. Interleukin-13: prospects for new treatments. *Clin Exp Allergy* 2010;40(1):42-9.
- Bulmer AC, Ried K, Blanchfield JT, Wagner KH. The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutat Res* 2008;658(1-2):28-41.
- Butcher MJ, Galkina EV. Phenotypic and functional heterogeneity of macrophages and dendritic cell subsets in the healthy and atherosclerosis-prone aorta. *Front Physiol* 2012;3:44.
- Butterworth RF, Norenberg MD, Felipe V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT; Members of the ISHEN Commission on Experimental Models of HE. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int* 2009;29(6):783-8.
- Campbell KM, Sabla GE, Bezerra JA. Transcriptional reprogramming in murine liver defines the physiologic consequences of biliary obstruction. *J Hepatol* 2004;40(1):14-23.
- Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Tani M, Sebo TJ, Gores GJ. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* 2002;123(4):1323-30.
- Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004;39(2):273-8.
- Cantor JO, Nadkarni PP. Hyaluronan: the Jekyll and Hyde molecule. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006;5(4):257-60.
- Carroll-Portillo A, Surviladze Z, Cambi A, Lidke DS, Wilson BS. Mast cell synapses and exosomes: membrane contacts for information exchange. *Front Immunol* 2012;3:46.

- Casella G, Villanacci V, Bassotti G. Eosinophilic ascites resolution with ketotifen. *Mayo Clin Proc* 2011;86(10):1027.
- Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Denef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol* 2002;36(2):200-9.
- Cassiman D, Roskams T. Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. *J Hepatol* 2002;37(4):527-35.
- Castaing D, Houssin D, Bismuth H. Anatomy of the liver and portal system of the rat. En : *Hepatic and portal surgery of the rat*. Edit. Masson. Paris. 1980, pp27-46.
- Castañeda B, Debernardi-Venon W, Bandi JC, Andreu V, Pérez-del-Pulgar S, Moitinho E, Pizcueta P, Bosch J. The role of portal pressure in the severity of bleeding in portal hypertensive rats. *Hepatology* 2000;31(3):581-6.
- Caughey GH. Mast cell proteases as protective and inflammatory mediators. *Adv Exp Med Biol* 2011;716:212-34.
- Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, Uzan G, Charbord P. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood*. 2003;15;101(8):2973-82.
- Claman HN. Mast cells and fibrosis. The relevance to scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 1990;16(1):141-51.
- Clements WD, McCaigue M, Erwin P, Halliday I, Rowlands BJ. Biliary decompression promotes Kupffer cell recovery in obstructive jaundice. *Gut* 1996;38(6):925-31.
- Clements WD, Parks R, Erwin P, Halliday MI, Barr J, Rowlands BJ. Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction. *Gut* 1996;39(4):587-93.
- Clements WD, Erwin P, McCaigue MD, Halliday I, Barclay GR, Rowlands BJ. Conclusive evidence of endotoxaemia in biliary obstruction. *Gut* 1998;42(2):293-9.
- Colgan SP, Taylor CT. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7(5):281-7.
- Cook JG. Creatinine assay in the presence of protein. *Clin Chim Acta* 1971;32(3):485-6.
- Corcuera Pindado MT, Nava Hidalgo MP, Angulo Burgos A, Aller Reyero MA, Gómez Aguado F, Casado Fariñas I, Alonso Martín MJ, Pérez AJ. Splanchnic remodeling secondary to experimental prehepatic portal hypertension. *An Med Interna* 2005;22(7):317-22.
- Costa AM, Tuchweber B, Lamireau T, Yousef IM, Balabaud C, Rosenbaum J, Desmoulière A. Role of apoptosis in the remodeling of cholestatic liver injury following release of the mechanical stress. *Virchows Arch* 2003;442(4):372-80.
- Cuenca J, Martín-Sanz P, Alvarez-Barrientos AM, Boscá L, Goren N. Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase

- expression and activation in the heart during sepsis. *Am J Pathol* 2006;169(5):1567-76.
- Chan CC, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Hou MC, Huang HC, Lee SD. Effects of endothelin-1 on portal-systemic collaterals of common bile duct-ligated cirrhotic rats. *Eur J Clin Invest* 2004;34(4):290-6.
- Chao J, Wood JG, Gonzalez NC. Alveolar macrophages initiate the systemic microvascular inflammatory response to alveolar hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 2011;178(3):439-48.
- Chen B, Fu B. A model for charged molecule transport in the interstitial space. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2005;1:55-8.
- Cheng CW, Duwaerts CC, Rooijen Nv, Wintermeyer P, Mott S, Gregory SH. NK cells suppress experimental cholestatic liver injury by an interleukin-6-mediated, Kupffer cell-dependent mechanism. *J Hepatol* 2011;54(4):746-52.
- Chiang CH, Chen JL, Liu YT, Wang DP. Therapeutic effect and pharmacokinetics of ketotifen transdermal delivery system. *Drug Dev Ind Pharm* 1998;24(3):213-7.
- Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology* 2009;50(6):2007-13.
- Chu D, Adler DG. Malignant biliary tract obstruction: evaluation and therapy. *J Natl Compr Canc Netw* 2010;8(9):1033-44.
- Corradi F, Brusasco C, Fernández J, Vila J, Ramirez MJ, Seva-Pereira T, Fernández-Varo G, Mosbah IB, Acevedo J, Silva A, Rocco PR, Pelosi P, Gines P, Navasa M. Effects of pentoxifylline on intestinal bacterial overgrowth, bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats with ascites. *Dig Liver Dis* 2012;44(3):239-44.
- Davis GE. Angiogenesis and Proteinases: Influence on Vascular Morphogenesis, Stabilization and Regression. *Drug Discov Today Dis Models* 2011;8(1):13-20.
- Day AJ, de la Motte CA. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol* 2005;26(12):637-43.
- de Vries VC, Noelle RJ. Mast cell mediators in tolerance. *Curr Opin Immunol* 2010;22(5):643-8.
- Deitch EA. Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma* 1990;30(12 Suppl):S184-9.
- de Jonge WJ, The FO, Van der Coelen D, Bennink RJ, Reitsma PH, van Deventer SJ, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. Mast cell degranulation during abdominal surgery initiates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 2004;127(2):535-45.
- de Jonge WJ. Mast cells in intestinal inflammation, barrier function, and postoperative motility. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;53 (Suppl 2):S56-7.
- De Minicis S, Candelaresi C, Marzioni M, Saccomano S, Roskams T, Casini A, Risaliti A, Salzano R, Cautero N, di Francesco F, Benedetti A, Svegliati-Baroni G. Role of endogenous opioids in modulating HSC activity in vitro and liver fibrosis in vivo. *Gut* 2008;57(3):352-64.

- Deng YH, Pu CL, Li YC, Zhu J, Xiang C, Zhang MM, Guo CB. Analysis of biliary epithelial-mesenchymal transition in portal tract fibrogenesis in biliary atresia. *Dig Dis Sci* 2011;56(3):731-40.
- Desmet VJ, Roskams T. Cirrhosis reversal: a dual between dogma and myth. *J Hepatol* 2004;40(5):860-7.
- Desmoulière A, Darby I, Costa AM, Raccurt M, Tuchweber B, Sommer P, Gabbiani G. Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest* 1997;76(6):765-78.
- De Winter BY, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822(1):66-73.
- Díaz R, Kim JW, Hui JJ, Li Z, Swain GP, Fong KS, Csiszar K, Russo PA, Rand EB, Furth EE, Wells RG. Evidence for the epithelial to mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis. *Hum Pathol* 2008;39(1):102-15.
- Diéguez B, Aller MA, Nava MP, Palma MD, Arias JL, López L, Arias J. Chronic portal hypertension in the rat by triple-portal stenosing ligation. *J Invest Surg* 2002;15(6):329-36.
- Diez-Arias JA, Aller MA, Palma MD, Arias JL, Muñoz E, Sánchez M, Arias J. Increased duodenal mucosa infiltration by mast cells in rats with portal hypertension. *Dig Surg* 2001;18(1):34-40.
- Diehl AM. Neighborhood watch orchestrates liver regeneration. *Nat Med* 2012;18(4):497-9.
- Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 2004;8(4):445-54.
- Dold S, Laschke MW, Zhau Y, Schilling M, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated leukocyte recruitment regulates hepatocellular damage in acute obstructive cholestasis in mice. *Inflamm Res* 2010;59(4):291-8.
- Dong MH, Saab S. Complications of cirrhosis. *Dis Mon* 2008;54(7):445-56.
- Donner MG, Schumacher S, Warskulat U, Heinemann J, Häussinger D. Obstructive cholestasis induces TNF-alpha- and IL-1 -mediated periportal downregulation of Bsep and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293(6):G1134-46.
- Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971;31(1):87-96.
- Doumas BT, Wu TW, Poon KC, Jendrzeczak B. Chemical nature of a synthetic bilirubin conjugate and its reactivities in the total and direct reactions by the Jendrassik-Gróf method. *Clin Chem* 1985;31(10):1677-82.
- Egan CA, Rallis TM. Treatment of chronic urticaria with ketotifen. *Arch Dermatol* 1997;133(2):147-9.
- Emami CN, Chokshi N, Wang J, Hunter C, Guner Y, Goth K, Wang L, Grishin A, Ford HR. Role of interleukin-10 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Am J Surg* 2012;203(4):428-35.

- Eslimi D, Oryan S, Nasehi M, Zarrindast MR. Effects of opioidergic systems upon anxiolytic-like behaviors induced in cholestatic rats. *Eur J Pharmacol* 2011;670(1):180-5.
- Esteller A. Physiology of bile secretion. *World J Gastroenterol* 2008;14(37):5641-9.
- Evanko SP, Tammi MI, Tammi RH, Wight TN. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59(13):1351-65.
- Farrell DJ, Hines JE, Walls AF, Kelly PJ, Bennett MK, Burt AD. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology* 1995;22(4 Pt 1):1175-81.
- Fernandez M, Mejias M, Angermayr B, Garcia-Pagan JC, Rodés J, Bosch J. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 2005;43(1):98-103.
- Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009;50(3):604-20.
- Fernández-Martínez E, Pérez-Alvarez V, Tsutsumi V, Shibayama M, Muriel P. Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp Toxicol Pathol* 2006; 58 (1): 49-58.
- Fickert P, Fuchsbichler A, Moustafa T, Wagner M, Zollner G, Halilbasic E, Stöger U, Arrese M, Pizarro M, Solís N, Carrasco G, Caligiuri A, Sombetzki M, Reisinger E, Tsybrovskyy O, Zatloukal K, Denk H, Jaeschke H, Pinzani M, Trauner M. Farnesoid X receptor critically determines the fibrotic response in mice but is expressed to a low extent in human hepatic stellate cells and periductal myofibroblasts. *Am J Pathol* 2009;175(6):2392-405.
- Fiorotto R, Spirlì C, Fabris L, Cadamuro M, Okolicsanyi L, Strazzabosco M. Ursodeoxycholic acid stimulates cholangiocyte fluid secretion in mice via CFTR-dependent ATP secretion. *Gastroenterology* 2007;133(5):1603-13.
- Fiorucci S, Antonelli E, Rizzo G, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Orlandi S, Pellicciari R, Morelli A. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004;127(5):1497-512.
- Foley TT, Siggers GC, Moyer KE, Ehrlich HP. Rat mast cells enhance fibroblast proliferation and fibroblast-populated collagen lattice contraction through gap junctional intercellular communications. *Plast Reconstr Surg* 2011;127(4):1478-86.
- Folin O. Beitrag zur chemie des kreatinins und kreatins im hame. *Physiol Chem* 1904; 41: 223-42.
- Ford AC, Talley NJ. IBS in 2010: advances in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8(2):76-8.
- Frag EY, Mohamed GG, Khalil MM, Hwehy MM. Potentiometric determination of ketotifen fumarate in pharmaceutical preparations and urine using carbon paste and PVC membrane selective electrodes. *Int J Anal Chem* 2011;2011:604-41.
- Fragiadaki M, Mason RM. Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis - evidence for and against. *Int J Exp Pathol* 2011;92(3):143-50.

- Francés R, Chiva M, Sánchez E, González-Navajas JM, Llovet T, Zapater P, Soriano G, Muñoz C, Balanzó J, Pérez-Mateo M, Song XY, Guarner C, Such J. Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF-alpha monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol* 2007;46(5):797-803.
- Franceschini B, Ceva-Grimaldi G, Russo C, Dioguardi N, Grizzi F. The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases. *Dig Dis Sci* 2006;51(12):2248-56.
- Francis H, Meininger CJ. A review of mast cells and liver disease: What have we learned? *Dig Liver Dis* 2010;42(8):529-36.
- Friedman SL. Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology*. 2008;254(3):120-9.
- Fuschiotti P. Role of IL-13 in systemic sclerosis. *Cytokine* 2011;56(3):544-9.
- Gallant-Behm CL, Hildebrand KA, Hart DA. The mast cell stabilizer ketotifen prevents development of excessive skin wound contraction and fibrosis in red Duroc pigs. *Wound Repair Regen* 2008;16(2):226-33.
- Galli SJ. New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 1990;62(1):5-33.
- Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;6(2):135-42.
- Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005;23:749-86.
- Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8(6):478-86.
- Galli SJ, Tsai M. Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *J Dermatol Sci* 2008;49(1):7-19.
- Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol* 2011;12(11):1035-44.
- Garbuzenko E, Nagler A, Pickholtz D, Gillery P, Reich R, Maquart FX, Levi-Schaffer F. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. *Clin Exp Allergy* 2002;32(2):237-46.
- García-Dominguez J, Aller MA, García C, de Vicente F, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, Alonso MJ, Vara E, Arias J. Splanchnic Th(2) and Th(1) cytokine redistribution in microsurgical cholestatic rats. *J Surg Res* 2010;162(2):203-12.
- García-Moreno LM, Angeles Aller M, Conejo NM, Gómez MA, Martín FR, Arias J, Arias JL. Brain Ag-NOR activity in cholestatic rats with hepatic encephalopathy. *Hepatol Res* 2002;24(3):275-281.
- García-Tsao G, Albillos A, Barden GE, West AB. Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology* 1993;17(6):1081-5.

- Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18(2):353-72.
- Gartung C, Ananthanarayanan M, Rahman MA, Schuele S, Nundy S, Soroka CJ, Stolz A, Suchy FJ, Boyer JL. Down-regulation of expression and function of the rat liver Na⁺/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 1996;110(1):199-209.
- Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Alvaro D. Hepatic microcirculation and peribiliary plexus in experimental biliary cirrhosis: a morphological study. *Gastroenterology* 1996;111(4):1118-24.
- Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Franchitto A, Onori P, Ueno Y, Marziani M, Fava G, Venter J, Reichenbach R, Summers R, Alpini G. Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct ligated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291(2):307-17.
- Geerts AM, Vanheule E, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *Int J Exp Pathol* 2008;89(4):251-63.
- Gehring S, Dickson EM, San Martin ME, van Rooijen N, Papa EF, Harty MW, Tracy TF Jr, Gregory SH. Kupffer cells abrogate cholestatic liver injury in mice. *Gastroenterology* 2006;130(3):810-22.
- Geier A, Dietrich CG, Voigt S, Kim SK, Gerloff T, Kullak-Ublick GA, Lorenzen J, Matern S, Gartung C. Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology* 2003;38(2):345-54.
- Georges PC, Hui JJ, Gombos Z, McCormick ME, Wang AY, Uemura M, Mick R, Janney PA, Furth EE, Wells RG. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293(6):1147-54.
- Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, Clavien PA. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg* 2008;95(5):646-56.
- Geraghty JG, Angerson WJ, Carter DC. Portal venous pressure and portasystemic shunting in experimental portal hypertension. *Am J Physiol* 1989;257:52-7.
- Geudens I, Gerhardt H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development* 2011;138(21):4569-83.
- Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit* 2005;11(11):337-45.
- Gilles S, Zahler S, Welsch U, Sommerhoff CP, Becker BF. Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. *Cardiovasc Res* 2003;60(3):608-16.

- Glaser S, Francis H, Demorrow S, Lesage G, Fava G, Marzioni M, Venter J, Alpini G. Heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *World J Gastroenterol* 2006;12(22):3523-36.
- Glaser SS, Gaudio E, Miller T, Alvaro D, Alpini G. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert Rev Mol Med* 2009;11:7.
- Glaser SS, Onori P, Wise C, Yang F, Marzioni M, Alvaro D, Franchitto A, Mancinelli R, Alpini G, Munshi MK, Gaudio E. Recent advances in the regulation of cholangiocyte proliferation and function during extrahepatic cholestasis. *Dig Liver Dis* 2010;42(4):245-52.
- Glaser SS, Gaudio E, Alpini G. Vascular factors, angiogenesis and biliary tract disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;26(3):246-50.
- Glaser S, Gaudio E, Renzi A, Mancinelli R, Ueno Y, Venter J, White M, Kopriva S, Chiasson V, DeMorrow S, Francis H, Meng F, Marzioni M, Franchitto A, Alvaro D, Supowit S, DiPette DJ, Onori P, Alpini G. Knockout of the neurokinin-1 receptor reduces cholangiocyte proliferation in bile duct-ligated mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;301(2):297-305.
- Gordon JR, Galli SJ. Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. Role for mast cell-derived transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;180(6):2027-37.
- Grant SM, Goa KL, Fitton A, Sorkin EM. Ketotifen. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in asthma and allergic disorders. *Drugs* 1990;40(3):412-48.
- Green J, Better OS. Systemic hypotension and renal failure in obstructive jaundice-mechanistic and therapeutic aspects. *J Am Soc Nephrol* 1995;5(11):1853-71.
- Greiner JV, Mundorf T, Dubiner H, Lonsdale J, Casey R, Parver L, Kapik BM, Shams NB, Abelson MB. Efficacy and safety of ketotifen fumarate 0.025% in the conjunctival antigen challenge model of ocular allergic conjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 2003;136(6):1097-105.
- Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatol* 2007;6:7.
- Gruber BL. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 2003;5(2):147-53.
- Guerrero S, Muñiz E, Teijón C, Olmo R, Teijón JM, Blanco MD. Ketotifen-loaded microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers: characterization and in vivo evaluation. *J Pharm Sci* 2008;97(8):3153-69.
- Gujral JS, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology* 2003;38(2):355-63.
- Gupta S, Morgan TR, Gordan GS. Calcitonin gene-related peptide in hepatorenal syndrome. A possible mediator of peripheral vasodilation? *J Clin Gastroenterol* 1992;14(2):122-6.

- Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Jabejdar-Maralani P, Shafaroodi H, Borhani AA, Houshmand G, Sadeghipour H, Dehghani M, Dehpour AR. Resistance of cholestatic rats against epinephrine-induced arrhythmia: the role of nitric oxide and endogenous opioids. *Eur J Pharmacol* 2004;499(3):307-13.
- Hallgren J, Gurish MF. Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunol Rev* 2007;217:8-18.
- Harry D, Anand R, Holt S, Davies S, Marley R, Fernando B, Goodier D, Moore K. Increased sensitivity to endotoxemia in the bile duct-ligated cirrhotic rat. *Hepatology* 1999;30(5):1198-205.
- Hart SP, Dransfield I. Activation of human lung mast cells by monomeric immunoglobulin E. *Eur Respir J* 2005;26(4):744-5.
- Harty MW, Huddleston HM, Papa EF, Puthawala T, Tracy AP, Ramm GA, Gehring S, Gregory SH, Tracy TF Jr. Repair after cholestatic liver injury correlates with neutrophil infiltration and matrix metalloproteinase 8 activity. *Surgery* 2005;138(2):313-20.
- Harunari N, Armendariz R, Zhu KQ, Deubner H, Engrav LH, Muangman P, Carrougner GJ, Gibran NS. Comparison of collagen nodules and mast cells between human hypertrophic scar and thick scar in the female red duroc pig. *Wound Repair Regen* 2005;13: 27.
- Hayashi H, Sakai T. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300(5):729-38.
- He SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2004;10(3):309-18.
- Heathcote EJ. Diagnosis and management of cholestatic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5(7):776-82.
- Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond)* 2007;112(5):265-80.
- Henry RJ, Golub OJ, Sobel C. Some of the variables involved in the fractionation of serum proteins by paper electrophoresis. *Clin Chem* 1957;3(1):49-64.
- Higgins T, Beutler E, Doumas BT. Hemoglobin, Iron, and Bilirubin. En: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis* Fourth Edition. Edit. Elsevier Saunders. St.Louis. Missouri. USA. 2006, pp1165 –1208.
- Hildebrand KA, Zhang M, Hart DA. Myofibroblast upregulators are elevated in joint capsules in posttraumatic contractures. *Clin Orthop Relat Res* 2007;456:85-91.
- Hirschfield GM, Heathcote EJ, Gershwin ME. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. *Gastroenterology* 2010;139(5):1481-96.
- Hoefs JC, Morgan T, Ilagan BJ. Testing beneficial therapy in human cirrhosis using animal models of cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2011;56(4):929-30.
- Holt AP, Salmon M, Buckley CD, Adams DH. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008;12(4): 861-2.
- Huang YT, Hsu YC, Chen CJ, Liu CT, Wei YH. Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats. *J Biomed Sci* 2003;10(2):170-8.

- Huang LT, Chen CC, Sheen JM, Chen YJ, Hsieh CS, Tain YL. The interaction between high ammonia diet and bile duct ligation in developing rats: assessment by spatial memory and asymmetric dimethylarginine. *Int J Dev Neurosci* 2010;28(2):169-74.
- Huang CY, Hsiao JK, Lu YZ, Lee TC, Yu LC. Anti-apoptotic PI3K/Akt signaling by sodium/glucose transporter 1 reduces epithelial barrier damage and bacterial translocation in intestinal ischemia. *Lab Invest* 2011;91(2):294-309.
- Huang P, Liu D, Gan X, Zhang R, Gao W, Xia Z, Hei Z. Mast cells activation contribute to small intestinal ischemia reperfusion induced acute lung injury in rats. *Injury* 2012;43(8):1250-6.
- Hung CH, Suen JL, Hua YM, Chiang W, Chang HC, Chen CN, Jong YJ. Suppressive effects of ketotifen on Th1- and Th2-related chemokines of monocytes. *Pediatr Allergy Immunol* 2007;18(5):378-84.
- Iba Y, Shibata A, Kato M, Masukawa T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *Int Immunopharmacol* 2004;4(14):1873-80.
- Iida A, Yoshidome H, Shida T, Takano S, Takeuchi D, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Miyazaki M. Hepatocyte nuclear factor-kappa beta (NF-kappaB) activation is protective but is decreased in the cholestatic liver with endotoxemia. *Surgery* 2010;148(3):477-89.
- Ikeda R, Michitaka K, Yamauchi Y, Matsui H, Onji M. Changes in gastrointestinal lymph and blood vessels in patients with cirrhotic portal hypertension. *J Gastroenterol* 2001;36(10):689-95.
- Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002;122(5):1399-410.
- Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology* 2005;128(1):138-46.
- Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J*. 2006;20(7):811-27.
- Ingoldby CJ, McPherson GA, Blumgart LH. Endotoxemia in human obstructive jaundice. Effect of polymyxin B. *Am J Surg* 1984;147(6):766-71.
- Inoue K, Ogawa K, Okada J, Sugibayashi K. Enhancement of skin permeation of ketotifen by supersaturation generated by amorphous form of the drug. *J Control Release* 2005;108(2-3):306-18.
- Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007;117(3):539-48.
- Isayama F, Hines IN, Kremer M, Milton RJ, Byrd CL, Perry AW, McKim SE, Parsons C, Rippe RA, Wheeler MD. LPS signaling enhances hepatic fibrogenesis caused by experimental cholestasis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290(6):G1318-28.

- Ismail MH, Pinzani M. Reversal of hepatic fibrosis: pathophysiological basis of antifibrotic therapies. *Hepatic Medicine: Evidence and Research* 2011; 3:69-80.
- Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006;43(2 Suppl 1):S121-31.
- Jacob G, Nassar N, Hayam G, Ben-Haim S, Edoute Y, Better OS, Bomzon A. Cardiac function and responsiveness to beta-adrenoceptor agonists in rats with obstructive jaundice. *Am J Physiol* 1993;265(2 Pt 1):G314-20.
- Jacob G, Said O, Finberg J, Bomzon A. Peripheral vascular neuroeffector mechanisms in experimental cholestasis. *Am J Physiol* 1993;265(3 Pt 1):G579-86.
- Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26 (Suppl 1):173-9.
- Jaeschke H, Woolbright BL. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplant Rev (Orlando)* 2012;26(2):103-14.
- Jeong WI, Lee CS, Park SJ, Chung JY, Jeong KS. Kinetics of macrophages, myofibroblasts and mast cells in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *Anticancer Res* 2002;22(2A):869-77.
- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 435-61.
- Jones NL, Roifman CM, Griffiths AM, Sherman P. Ketotifen therapy for acute ulcerative colitis in children: a pilot study. *Dig Dis Sci* 1998;43(3):609-15.
- Joubert CJ. Principles of care and management in a laboratory animal facility. *J S Afr Vet Assoc* 1978;49(3):153-4.
- Jungfer B, Jansen T, Przybilla B, Plewig G. Solid persistent facial edema of acne: successful treatment with isotretinoin and ketotifen. *Dermatology* 1993;187(1):34-7.
- Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alpini G. Regulation of cholangiocyte bicarbonate secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281(3):G612-25.
- Karatepe O, Acet E, Battal M, Adas G, Kemik A, Altiok M, Kamali G, Koculu S, Catay A, Kamali S, Karahan S. Effects of glutamine and curcumin on bacterial translocation in jaundiced rats. *World J Gastroenterol* 2010;16(34):4313-20.
- Kassel KM, Sullivan BP, Luyendyk JP. Lipopolysaccharide enhances transforming growth factor β 1-induced platelet-derived growth factor-B expression in bile duct epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27(4):714-21.
- Katsuta Y, Zhang XJ, Ohsuga M, Akimoto T, Komeichi H, Shimizu S, Inami T, Miyamoto A, Satomura K, Takano T. Hemodynamic features of advanced cirrhosis due to chronic bile duct ligation. *J Nihon Med Sch* 2005;72(4):217-25.
- Kaur R, O'Shaughnessy CT, Jarvie EM, Winchester WJ, McLean PG. Characterization of a calcitonin gene-related peptide release assay in rat isolated distal colon. *Arch Pharm Res* 2009;32(12):1775-81.

- Kennett EC, Davies MJ. Degradation of matrix glycosaminoglycans by peroxynitrite/peroxynitrous acid: evidence for a hydroxyl-radical-like mechanism. *Free Radic Biol Med* 2007; 42 (8): 1278-89.
- Kennelly R, Conneely JB, Bouchier-Hayes D, Winter DC. Mast cells in tissue healing: from skin to the gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des* 2011;17(34):3772-5.
- Kershenobich Stalnikowitz D, Weissbrod AB. Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann Hepatol* 2003;2(4):159-63.
- Kidd M, McKenzie SH, Steven I, Cooper C, Lanz R; Australian Ketotifen Study Group. Efficacy and safety of ketotifen eye drops in the treatment of seasonal allergic conjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 2003;87(10):1206-11.
- Kilicoglu B, Gencay C, Kismet K, Serin Kilicoglu S, Erguder I, Erel S, Sunay AE, Erdemli E, Durak I, Akkus MA. The ultrastructural research of liver in experimental obstructive jaundice and effect of honey. *Am J Surg* 2008;195(2):249-56.
- Kinet JP. The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. *Immunol Rev* 2007;217:5-7.
- Kinnman N, Housset C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d496-503.
- Kirkland JG, Godfrey CB, Garrett R, Kakar S, Yeh BM, Corvera CU. Reversible surgical model of biliary inflammation and obstructive jaundice in mice. *J Surg Res* 2010;164(2):221-7.
- Kischer CW, Bailey JF. The mast cell in hypertrophic scars. *Tex Rep Biol Med* 1972;30(4):327-38.
- Klooker TK, Braak B, Koopman KE, Welting O, Wouters MM, van der Heide S, Schemann M, Bischoff SC, van den Wijngaard RM, Boeckstaens GE. The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2010;59(9):1213-21.
- Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Kamitani S, Kawasaki S, Nagase T. Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol Cell Biochem* 2010;337(1-2):77-81.
- Kojima K, Hosokawa M, Kobayashi K, Tainaka H, Chiba K. Microarray analysis of hepatic gene expression during long-term cholestasis induced by common bile duct ligation in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2004;115-116:63-75.
- Kolattukudy PE, Niu J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway. *Circ Res* 2012;110(1):174-89.
- Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol* 2006;12(46):7413-20.
- Kondo S, Kagami S, Kido H, Strutz F, Müller GA, Kuroda Y. Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(8):1668-76.

- König J, Seithel A, Gradhand U, Fromm MF. Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006;372(6):432-43.
- Konstantinidis K, Kitsis RN. Cardiovascular biology: Escaped DNA inflames the heart. *Nature* 2012;485(7397):179-80.
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984;65(3):305-11.
- Kramer HJ Impaired renal function in obstructive jaundice: roles of the thromboxane and endothelin systems. *Nephron* 1997;77(1):1-12
- Kravetz D, Sikuler E, Groszmann RJ. Splanchnic and systemic hemodynamics in portal hypertensive rats during hemorrhage and blood volume restitution. *Gastroenterology* 1986;90(5 Pt 1):1232-40.
- Kremer AE, Oude Elferink RP, Beuers U. Pathophysiology and current management of pruritus in liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011;35(2):89-97.
- Kroeger RJ, Groszmann RJ. Increased portal venous resistance hinders portal pressure reduction during the administration of beta-adrenergic blocking agents in a portal hypertensive model. *Hepatology* 1985;5(1):97-101.
- Kroeger RJ, Groszmann RJ. The effect of the combination of nitroglycerin and propranolol on splanchnic and systemic hemodynamics in a portal hypertensive rat model. *Hepatology* 1985;5(3):425-30.
- Kruglov EA, Nathanson RA, Nguyen T, Dranoff JA. Secretion of MCP-1/CCL2 by bile duct epithelia induces myofibroblastic transdifferentiation of portal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290(4):G765-71.
- Kuhlmann WD, Peschke P. Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *Int J Exp Pathol* 2006;87(5):343-59.
- Kupietzky A, Levi-Schaffer F. The role of mast cell-derived histamine in the closure of an in vitro wound. *Inflamm Res* 1996;45(4):176-80.
- Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci* 2003;18:65-70.
- Lamb E, Newman DJ, Price C.P. Kidney Function Test . En: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis* Fourth Edition. Edit. Elsevier Saunders. St Louis. Missouri. USA. 2006, pp 797–835.
- Larsen K. Creatinine assay by a reaction-kinetic principle. *Clin Chim Acta* 1972;41:209-17.
- Laschke MW, Dold S, Jeppsson B, Schilling MK, Menger MD, Thorlacius H. Rho-kinase inhibitor attenuates cholestasis-induced CXC chemokine formation, leukocyte recruitment, and hepatocellular damage in the liver. *J Surg Res* 2010;159(2):666-73.
- Lautt WW. Relationship between hepatic blood flow and overall metabolism: the hepatic arterial buffer response. *Fed Proc* 1983;42(6):1662-6.
- Lazaridis KN, Strazzabosco M, Larusso NF. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia. *Gastroenterology* 2004;127(5):1565-77.

- Le Bigot JF, Cresteil T, Kiechel JR, Beaune P. Metabolism of ketotifen by human liver microsomes. In vitro characterization of a tertiary amine glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 1983;11(6):585-9.
- Le Bigot JF, Begue JM, Kiechel JR, Guillouzo A. Species differences in metabolism of ketotifen in rat, rabbit and man: demonstration of similar pathways in vivo and in cultured hepatocytes. *Life Sci* 1987;40(9):883-90.
- Lee FY, Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. Administration of N omega-nitro-L-arginine ameliorates portal-systemic shunting in portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1993;105(5):1464-70.
- Lee YS, Vijayasingam S. Mast cells and myofibroblasts in keloid: a light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study. *Ann Acad Med Singapore* 1995;24(6):902-5.
- Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25(2):195-206.
- Levy R, Schlaeffer F, Keynan A, Nagauker O, Yaari A, Sikuler E. Increased neutrophil function induced by bile duct ligation in a rat model. *Hepatology* 1993;17(5):908-14.
- Li MK, Crawford JM. The pathology of cholestasis. *Semin Liver Dis* 2004;24(1):21-42.
- Li T, Yang Z. Research progress of vasculopathy in portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2005;11(39):6079-84.
- Li WG, Hu SX, Xue BD, Jiang ZG, Huang ZQ. Observation of hepato hilar peribiliary vascular plexus with complete absence of hepatic artery blood supply in rats. *Transplant Proc* 2007;39(10):3424-8.
- Lin HC, Yang MC, Hou MC, Li SM, Huang YT, Yu PC, Tsai YT, Lee SD. Effects of long-term administration of octreotide in portal vein-stenosed rats. *Hepatology* 1996;23(3):537-43.
- Liu Z, Sakamoto T, Yokomuro S, Ezure T, Subbotin V, Murase N, Contrucci S, Demetris AJ. Acute obstructive cholangiopathy in interleukin-6 deficient mice: compensation by leukemia inhibitory factor (LIF) suggests importance of gp-130 signaling in the ductular reaction. *Liver* 2000;20(2):114-24.
- Llamas MA, Aller MA, Marquina D, Nava MP, Arias J. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes increases in chronic portal hypertensive rats. *Dig Dis Sci* 2010;55(8):2244-54.
- Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J* 2011; 38(1):191-208.
- Lojek A, Cíž M, Pekarová M, Ambrožová G, Vašíček O, Moravcová J, Kubala L, Drábíková K, Jančinová V, Perečko T, Pečivová J, Mačíčková T, Nosál R. Modulation of metabolic activity of phagocytes by antihistamines. *Interdiscip Toxicol* 2011;4(1):15-9.
- López L, Begega A, Arias JL, Lorente L, Aller MA, Durán Poveda M, Arias J. Citocromo Oxidasa Hepática en Ratas con Colestasis Microquirúrgica y con Anastomosis Portocava. *Rev Esp Enferm Dig* 1999;91(5): 365-73.

- Lopez-Font I, Gea-Sorlí S, de-Madaria E, Gutiérrez LM, Pérez-Mateo M, Closa D. Pancreatic and pulmonary mast cells activation during experimental acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2010;16(27):3411-7.
- Lorente L, Arias J, Aller MA, Durán H. Anatomía e histología hepática: Anatomía. En: *Cirugía Hepática Experimental*. Arias J, Lorente L, Aller MA, Rodríguez J, Alonso MS, Trobo JJ, Durán H. Edit. Kronos. Zaragoza, 1993, pp 41-94.
- Lorente L, Aller MA, Duran HJ, Cejalvo D, Lloris JM, Arias J. Extrahepatic biliary anatomy in Wistar rats. *Surg Res Comm* 17: 31-38, 1995.
- Lorente L, Aller MA, Arias J. Liver Anatomy. En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA, Arias J. Eds. Bentham Scientific publishers, 2009, pp 99-107.
- Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, Scott ZA, Coyle AJ, Reed JL, Van Snick J, Strom TB, Zheng XX, Noelle RJ. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* 2006;442(7106):997-1002.
- Ma F, Li Y, Jia L, Han Y, Cheng J, Li H, Qi Y, Du J. Macrophage-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 is essential for TGF β /Smad activation and cardiac fibrosis induced by angiotensin II. *PLoS One* 2012;7(5):e35144.
- Magen I, Avraham Y, Ackerman Z, Vorobiev L, Mechoulam R, Berry EM. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT1A receptor activation. *Br J Pharmacol* 2010;159(4):950-7.
- Maillette de Buy Wenniger L, Beuers U. Bile salts and cholestasis. *Dig Liver Dis* 2010;42(6):409-18.
- Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006;11:1696-701.
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;43(2 Suppl 1):S31-44.
- Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* 2003; 83: 337-76.
- Martin U, Roemer D. Ketotifen: a histamine release inhibitor. *Monogr Allergy* 1977;12:145-9.
- Martinek RG. Improved micro-method for determination of serum bilirubin. *Clin Chim Acta*. 1966;13: 161-70.
- Marzioni M, Glaser S, Francis H, Marucci L, Benedetti A, Alvaro D, Taffetani S, Ueno Y, Roskams T, Phinizy JL, Venter J, Fava G, Lesage GD, Alpini G. Autocrine/paracrine regulation of the growth of the biliary tree by the neuroendocrine hormone serotonin. *Gastroenterology* 2005;128(1):121-37.
- Marzioni M, Francis H, Benedetti A, Ueno Y, Fava G, Venter J, Reichenbach R, Mancino MG, Summers R, Alpini G, Glaser S. Ca²⁺-dependent cytoprotective effects of ursodeoxycholic and tauroursodeoxycholic acid on the biliary epithelium in a rat model of cholestasis and loss of bile ducts. *Am J Pathol* 2006;168(2):398-409.
- Marzioni M, Alpini G, Saccomanno S, Candelaresi C, Venter J, Rychlicki C, Fava G, Francis H, Trozzi L, Glaser S, Benedetti A. Glucagon-like peptide-1 and its

- receptor agonist exendin-4 modulate cholangiocyte adaptive response to cholestasis. *Gastroenterology* 2007;133(1):244-55.
- Masyuk AI, Masyuk TV, Splinter PL, Huang BQ, Stroope AJ, LaRusso NF. Cholangiocyte cilia detect changes in luminal fluid flow and transmit them into intracellular Ca²⁺ and cAMP signaling. *Gastroenterology* 2006;131(3):911-20.
- Masyuk AI, LaRusso NF. Aquaporins in the hepatobiliary system. *Hepatology* 2006;43(2 Suppl 1):S75-81.
- Masyuk AI, Gradilone SA, Banales JM, Huang BQ, Masyuk TV, Lee SO, Splinter PL, Stroope AJ, Larusso NF. Cholangiocyte primary cilia are chemosensory organelles that detect biliary nucleotides via P2Y₁₂ purinergic receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295(4):G725-34.
- Matsumoto Y, Niimoto S, Katayama K, Hirose K, Yamaguchi A, Torigoe K. Effects of biliary drainage in obstructive jaundice on microcirculation, phagocytic activity, and ultrastructure of the liver in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9(3):360-6.
- Matsunaga Y, Kawasaki H, Terada T. Stromal mast cells and nerve fibers in various chronic liver diseases: relevance to hepatic fibrosis. *Am J Gastroenterol* 1999;94(7):1923-32.
- Matsunaga Y, Terada T. Mast cell subpopulations in chronic inflammatory hepatobiliary diseases. *Liver* 2000;20(2):152-6.
- Mani AR, Nahavandi A, Moosavi M, Safarinejad R, Dehpour AR. Dual nitric oxide mechanisms of cholestasis-induced bradycardia in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29(10):905-8.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011;11(8):519-31.
- Meran S, Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol* 2011;92(3):158-67.
- Metz M, Maurer M. Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends Immunol* 2007;28(5):234-41.
- Metz M, Grimaldeston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev* 2007;217:304-28.
- Mihun ZM, Kufinec J, Hofman H, Zinic M, Kajfez F. "Ketotifen," En: *Analytical Profiles of Drug Substances*, vol. 13, p.240, Elsevier, 1984.
- Minagawa N, Nagata J, Shibao K, Masyuk AI, Gomes DA, Rodrigues MA, Lesage G, Akiba Y, Kaunitz JD, Ehrlich BE, Larusso NF, Nathanson MH. Cyclic AMP regulates bicarbonate secretion in cholangiocytes through release of ATP into bile. *Gastroenterology* 2007;133(5):1592-602.
- Minter RM, Fan MH, Sun J, Niederbichler A, Ipaktchi K, Arbabi S, Hemmila MR, Remick DG, Wang SC, Su GL. Altered Kupffer cell function in biliary obstruction. *Surgery* 2005;138(2):236-45.

- Minter RM, Bi X, Ben-Josef G, Wang T, Hu B, Arbabi S, Hemmila MR, Wang SC, Remick DG, Su GL. LPS-binding protein mediates LPS-induced liver injury and mortality in the setting of biliary obstruction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296(1):G45-54.
- Mitchell C, Couton D, Couty JP, Anson M, Crain AM, Bizet V, Rénia L, Pol S, Mallet V, Gilgenkrantz H. Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice. *Am J Pathol* 2009;174(5):1766-75.
- Miyoshi H, Rust C, Guicciardi ME, Gores GJ. NF-kappaB is activated in cholestasis and functions to reduce liver injury. *Am J Pathol* 2001;158(3):967-75.
- Mizoguchi A. Healing of intestinal inflammation by IL-22. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18(9):1777-84.
- Moazzam FN, Brems JJ, Yong SL, Filkins JP, Fisher SG, Holt DR, Gamelli RL, Ding JW. Endotoxin potentiates hepatocyte apoptosis in cholestasis. *J Am Coll Surg* 2002;194(6):731-9.
- Moezi L, Shafaroodi H, Sarkar S, Emami-Razavi SH, Sanatkar M, Mirazi N, Dehpour AR. Involvement of nitrenergic and opioidergic systems in the hypothermia induced by cholestasis in rats. *Pathophysiology* 2006;13(4):227-32.
- Mombeini T, Roushanzamir F, Jorjani M, Pourpak Z, Gaskari SA, Mehr SE, Dehpour AR. Alteration in specific opioid-receptor labeling on peripheral blood leukocytes of bile duct-ligated rat. *Pathophysiology* 2006;13(2):111-7.
- Monument MJ, Hart DA, Befus AD, Salo PT, Zhang M, Hildebrand KA. The mast cell stabilizer ketotifen fumarate lessens contracture severity and myofibroblast hyperplasia: a study of a rabbit model of posttraumatic joint contractures. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92(6):1468-77.
- Monument MJ, Hart DA, Befus AD, Salo PT, Zhang M, Hildebrand KA. The mast cell stabilizer ketotifen reduces joint capsule fibrosis in a rabbit model of post-traumatic joint contractures. *Inflamm Res* 2012;61(4):285-92.
- Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, Befus AD. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol* 2010;3(2):111-28.
- Moquillaza LM, Aller MA, Nava MP, Santamaría L, Vergara P, Arias J. Partial hepatectomy, partial portal vein stenosis and mesenteric lymphadenectomy increase splanchnic mast cell infiltration in the rat. *Acta Histochem* 2010;112(4):372-82.
- Mori V, Bartoloni St Omer F. On the behavior of mast cells in experimental cholestatic hepatopathy caused by ligation of the common bile duct. *Arch De Vecchi Anat Patol* 1966;47(3):1089-98.
- Moriez R, Leveque M, Salvador-Cartier C, Barreau F, Theodorou V, Fioramonti J, Bueno L, Eutamene H. Mucosal mast cell proteases are involved in colonic permeability alterations and subsequent bacterial translocation in endotoxemic rats. *Shock* 2007;28(1):118-24.
- Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem Biol Interact* 2011;193(3):225-31.

- Mormone E, Lu Y, Ge X, Fiel MI, Nieto N. Fibromodulin, an oxidative stress-sensitive proteoglycan, regulates the fibrogenic response to liver injury in mice. *Gastroenterology* 2012;142(3):612-621.
- Morwood SR, Nicholson LB. Modulation of the immune response by extracellular matrix proteins. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2006;54(6):367-74.
- Moseley RH. Sepsis and cholestasis. *Clin Liver Dis* 1999;3(3):465-75.
- Moyer KE, Siggers GC, Ehrlich HP. Mast cells promote fibroblast populated collagen lattice contraction through gap junction intercellular communication. *Wound Repair Regen* 2004;12(3):269-75.
- Muddu AK, Guha IN, Elsharkawy AM, Mann DA. Resolving fibrosis in the diseased liver: translating the scientific promise to the clinic. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(4):695-714.
- Nahavandi A, Dehpour AR, Mani AR, Homayounfar H, Abdoli A, Abdolhoseini MR. The role of nitric oxide in bradycardia of rats with obstructive cholestasis. *Eur J Pharmacol* 2001;411(1-2):135-141.
- Nakanuma Y, Yasoshima M, Tsuneyama K, Harada K. Histopathology of primary biliary cirrhosis with emphasis on expression of adhesion molecules. *Semin Liver Dis* 1997;17(1):35-47.
- Nakamura A, Yamazaki K, Suzuki K, Sato S. Increased portal tract infiltration of mast cells and eosinophils in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1997;92(12):2245-9.
- Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR, Su GL. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 1999;30(4):934-43.
- Nathanson MH, Boyer JL. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 1991;14(3):551-66.
- Nelson L, Vergnolle N, D'Mello C, Chapman K, Le T, Swain MG. Endogenous opioid-mediated antinociception in cholestatic mice is peripherally, not centrally, mediated. *J Hepatol* 2006;44(6):1141-9.
- Newton JL. Fatigue in primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2008;12(2):367-83.
- Ng, CP, Swartz MA. Mechanisms of Interstitial Flow-Induced Remodeling of Fibroblast–Collagen Cultures. *Ann Biomed Engin* 2006; 34(3): 446-454.
- Nguyen DL, Juran BD, Lazaridis KN. Primary biliary cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010;24(5):647-54.
- Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004;53(3):438-45.
- Ogasawara M, Yamauchi K, Satoh Y, Yamaji R, Inui K, Jonker JW, Schinkel AH, Maeyama K. Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: organic cation transporters as a histamine transporter and histamine metabolism. *J Pharmacol Sci* 2006;101(1):24-30.

- O'Connor MJ. Mechanical biliary obstruction. A review of the multisystemic consequences of obstructive jaundice and their impact on perioperative morbidity and mortality. *Am Surg* 1985;51(5): 245-51.
- Oguz S, Kanter M, Erboga M, Erenoglu C. Protective effects of thymoquinone against cholestatic oxidative stress and hepatic damage after biliary obstruction in rats. *J Mol Histol* 2012;43(2):151-9.
- Ohara N, Schaffner T, Reichen J. Structure-function relationship in secondary biliary cirrhosis in the rat. Stereologic and hemodynamic characterization of a model. *J Hepatol* 1993;17(2):155-62.
- Olds RJ, Olds JR. A colour atlas of the rat- dissection guide. Edit. Wolfe Medical Publications LTD. London. UK. 1979.
- Oliva A, Multigner L. Ketotifen improves sperm motility and sperm morphology in male patients with leukocytospermia and unexplained infertility. *Fertil Steril* 2006;85(1):240-3.
- Omenetti A, Popov Y, Jung Y, Choi SS, Witek RP, Yang L, Brown KD, Schuppan D, Diehl AM. The hedgehog pathway regulates remodelling responses to biliary obstruction in rats. *Gut* 2008;57(9):1275-82.
- Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, Witek RP, Alpini G, Venter J, Vandongen HM, Syn WK, Baroni GS, Benedetti A, Schuppan D, Diehl AM. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest* 2008;118(10):3331-42.
- Omenetti A, Bass LM, Anders RA, Clemente MG, Francis H, Guy CD, McCall S, Choi SS, Alpini G, Schwarz KB, Diehl AM, Whittington PF. Hedgehog activity, epithelial-mesenchymal transitions, and biliary dysmorphogenesis in biliary atresia. *Hepatology* 2011;53(4):1246-58.
- Omenetti A, Diehl AM. Hedgehog signaling in cholangiocytes. *Curr Opin Gastroenterol* 2011;27(3):268-75.
- O'Neil S, Hunt J, Filkins J, Gamelli R. Obstructive jaundice in rats results in exaggerated hepatic production of tumor necrosis factor-alpha and systemic and tissue tumor necrosis factor-alpha levels after endotoxin. *Surgery* 1997;122(2):281-6.
- Orellana M, Avalos N, Abarca M, Valdés E. Microsomal and peroxisomal fatty acid oxidation in bile duct ligated rats: a comparative study between liver and kidney. *Gen Pharmacol* 1997;28(4):525-9.
- O'Sullivan M. Therapeutic potential of ketotifen in irritable bowel syndrome (IBS) may involve changes in mast cells at sites beyond the rectum. *Gut* 2011;60(3):423.
- Oude Elferink RP, Kremer AE, Beuers U. Mediators of pruritus during cholestasis. *Curr Opin Gastroenterol* 2011;27(3):289-93.
- Oude Elferink RP, Kremer AE, Martens JJ, Beuers UH. The molecular mechanism of cholestatic pruritus. *Dig Dis* 2011;29(1):66-71.

- Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 2002;123(5):1667-76.
- Pakarinen MP, Rintala RJ. Surgery of biliary atresia. *Scand J Surg* 2011;100(1):49-53.
- Palma MD, Aller MA, Vara E, Nava MP, Garcia C, Arias-Diaz J, Balibrea JL, Arias J. Portal hypertension produces an evolutive hepato-intestinal pro- and anti-inflammatory response in the rat. *Cytokine* 2005;31(3):213-26.
- Panteghini M. The importance of analytical quality specifications for biomarker assays currently used in acute cardiac care. *Acute Card Care* 2006;8(3):133-8.
- Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Jonczyk A, Goodman SL, Schuppan D. Inhibition of integrin α v β 6 on cholangiocytes blocks transforming growth factor- β activation and retards biliary fibrosis progression. *Gastroenterology* 2008;135(2):660-70.
- Penissi AB, Rudolph MI, Piezzi RS. Role of mast cells in gastrointestinal mucosal defense. *Biocell* 2003;27(2):163-72.
- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004;22:929-79.
- Peters T Jr. Proposals for standardization of total protein assays. *Clin Chem* 1968;14(12):1147-59.
- Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2000;21(3):49-98.
- Popov Y, Sverdlov DY, Bhaskar KR, Sharma AK, Millonig G, Patsenker E, Krahenbuhl S, Krahenbuhl L, Schuppan D. Macrophage-mediated phagocytosis of apoptotic cholangiocytes contributes to reversal of experimental biliary fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298(3):G323-34.
- Portincasa P, Grattagliano I, Testini M, Caruso ML, Wang DQ, Moschetta A, Calamita G, Vacca M, Valentini AM, Renna G, Lissidini G, Palasciano G. Parallel intestinal and liver injury during early cholestasis in the rat: modulation by bile salts and antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2007;42(9):1381-91.
- Poupon R, Poupon RE. Treatment of primary biliary cirrhosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000;14(4):615-28.
- Poupon R, Chazouillères O, Poupon RE. Chronic cholestatic diseases. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl):129-40.
- Póvoa P, Ducla-Soares J, Fernandes A, Palma-Carlos AG. A case of systemic mastocytosis; therapeutic efficacy of ketotifen. *J Intern Med* 1991;229(5):475-7.
- Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eisley CJ, Erle DJ, Locksley RM. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(25):11489-94.
- Prieto I, Aller MA, Santamaría L, Nava MP, Madero R, Pérez-Robledo JP, Arias J. Prehepatic portal hypertension produces increased mast cell density in the

- small bowel and in mesenteric lymph nodes in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20(7):1025-31.
- Proell V, Carmona-Cuenca I, Murillo MM, Huber H, Fabregat I, Mikulits W. TGF-beta dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells. *Comp Hepatol* 2007;6:1.
- Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006;43(2 Suppl 1):S54-62.
- Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest* 2004;84(2):153-9.
- Ramadori G, Saile B. Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. *Gastroenterology* 2004;127(3):997-1000.
- Ramm GA, Carr SC, Bridle KR, Li L, Britton RS, Crawford DH, Vogler CA, Bacon BR, Tracy TF. Morphology of liver repair following cholestatic liver injury: resolution of ductal hyperplasia, matrix deposition and regression of myofibroblasts. *Liver* 2000;20(5):387-96.
- Ramos L, Peña G, Cai B, Deitch EA, Ulloa L. Mast cell stabilization improves survival by preventing apoptosis in sepsis. *J Immunol* 2010;185(1):709-16.
- Repchinsky C. Up-to-date drug information. *Can Fam Physician* 2001;47:1545.
- Rhodes JM, Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med* 2007;11(2):176-205.
- Rioux KP, Wallace JL. Long-term antigen challenge results in progressively diminished mucosal mast cell degranulation in rats. *Gastroenterology* 1996;111(6):1516-23.
- Roberts SK, Ludwig J, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology* 1997;112(1):269-79.
- Rocha MF, Aguiar JE, Sidrim JJ, Costa RB, Feitosa RF, Ribeiro RA, Lima AA. Role of mast cells and pro-inflammatory mediators on the intestinal secretion induced by cholera toxin. *Toxicon* 2003;42(2):183-9.
- Rockey DC. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis* 2006;10(3):459-79.
- Rodríguez J. Anestesia. En: *Trasplante experimental de órganos*. Arias J, Aller MA, Lorente L, Rodríguez J, De Pedro JA, Brandau D, Durán H. Eds. Garsi SA, Madrid, 1989; pp 65-68.
- Rodríguez-Garay EA. Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann Hepatol* 2003;2(4):150-8.
- Roeb E, Purucker E, Breuer B, Nguyen H, Heinrich PC, Rose-John S, Matern S. TIMP expression in toxic and cholestatic Liver injury in rat. *J Hepatol* 1997; 27(3): 535-44.
- Ruh J, Vogel F, Schmidt E. In vivo assessment of villous microcirculation in the rat small intestine in indomethacin-induced inflammation: role of mast-cell stabilizer Ketotifen. *Acta Physiol Scand* 2000;170(2):137-43.

- Rutherford AE, Pratt DS. Cholestasis and cholestatic syndromes. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22(3):209-14.
- Saavedra Y, Vergara P. Somatostatin inhibits intestinal mucosal mast cell degranulation in normal conditions and during mast cell hyperplasia. *Regul Pept* 2003;111(1-3):67-75.
- Saito JM, Maher JJ. Bile duct ligation in rats induces biliary expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant. *Gastroenterology* 2000;118(6):1157-68.
- Sakamoto T, Kamijima M, Miyake M. Neurogenic airway microvascular leakage induced by toluene inhalation in rats. *Eur J Pharmacol* 2012;685(1-3):180-5.
- Sampson EJ, Baird MA, Burtis CA, Smith EM, Witte DL, Bayse DD. A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. *Clin Chem* 1980;26(7):816-26.
- Sánchez-Patán F, Aller MA, Corcuera MT, Vara E, Casado I, Gómez F, García C, Alonso MJ, Arias J. Chronic inflammatory portal hypertensive enteropathy in the rat. *Cir Esp* 2006;80(3):162-7.
- Sánchez-Patán F, Anchuelo R, Corcuera MT, Casado I, Gómez-Aguado F, Aller MA, Cruz A, Alonso MJ, Arias J. Biliary fibrosis in microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery* 2008;28(5):361-6.
- Sánchez-Patán F, Anchuelo R, Aller MA, Vara E, García C, Nava MP, Arias J. Chronic prehepatic portal hypertension in the rat: is it a type of metabolic inflammatory syndrome? *Lipids Health Dis* 2008;7:4.
- Sánchez-Patán F, Aller MA, Cuellar C, Rodero M, Corcuera MT, Nava MP, Gómez F, Blanco MD, Guerrero S, Anchuelo R, Muñiz E, Alonso MJ, Teijón JM, Arias J. Mast cell inhibition by ketotifen reduces splanchnic inflammatory response in a portal hypertension model in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2008;60(4-5):347-55.
- Sansonetti PJ. Host-bacteria homeostasis in the healthy and inflamed gut. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24(4):435-9.
- Sarchio SN, Kok LF, O'Sullivan C, Halliday GM, Byrne SN. Dermal mast cells affect the development of sunlight-induced skin tumours. *Exp Dermatol* 2012;21(4):241-8.
- Sastre E, Balfagón G, Revuelta-López E, Aller MÁ, Nava MP, Arias J, Blanco-Rivero J. Effect of short- and long-term portal hypertension on adrenergic, nitrenergic and sensory functioning in rat mesenteric artery. *Clin Sci (Lond)* 2012;122(7):337-48.
- Scandinavian Committee on Enzymes . *Scand J Clin Lab Invest* 1976;33: 287-306.
- Schaffner F. Primary biliary cirrhosis as a collagen disease. *Postgrad Med* 1979;65(6):97-102.
- Schoch C. In vitro inhibition of human conjunctival mast-cell degranulation by ketotifen. *J Ocul Pharmacol Ther* 2003;19(1):75-81.
- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schiele F,

- Schimmel HG, Weidemann G, Siekmann L; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002;40(7): 718-24.
- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schiele F, Schimmel HG, Weidemann G, Siekmann L; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002;40 (7): 725-33.
- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schiele F, Schimmel HG, Weidemann G, Siekmann L; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002;40 (7): 734-8.
- Schumann G, Aoki R, Ferrero CA, Ehlers G, Ferard G, Gella FJ, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kytzia HJ, Lessinger JM, Miller WG, Nagel R, Pauwels J, Schimmel H, Siekmann L, Weidemann G, Yoshida K, Ceriotti F. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(9): 1146-55.
- Schwarzer G, Bassler D, Mitra A, Ducharme FM, Forster J. Ketotifen alone or as additional medication for long-term control of asthma and wheeze in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;(1):CD001384.
- Sedlaczek N, Jia JD, Bauer M, Herbst H, Ruehl M, Hahn EG, Schuppan D. Proliferating bile duct epithelial cells are a major source of connective tissue growth factor in rat biliary fibrosis. *Am J Pathol* 2001;158(4):1239-44.
- Seeley EJ, Sutherland RE, Kim SS, Wolters PJ. Systemic mast cell degranulation increases mortality during polymicrobial septic peritonitis in mice. *J Leukoc Biol* 2011;90(3):591-7.
- Serna H, Porrás M, Vergara P. Mast cell stabilizer ketotifen [4-(1-methyl-4-piperidylidene)-4h-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]thiophen-10(9H)-one

- fumarate] prevents mucosal mast cell hyperplasia and intestinal dysmotility in experimental *Trichinella spiralis* inflammation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319 (3): 1104-11.
- Sherlock S. Chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 1984;4(1 Suppl):25S-28S.
- Sherlock S, Epstein O. Primary biliary cirrhosis. The present position. *Ann N Y Acad Sci* 1986;465:378-85.
- Shivakumar P, Campbell KM, Sabla GE, Miethke A, Tiao G, McNeal MM, Ward RL, Bezerra JA. Obstruction of extrahepatic bile ducts by lymphocytes is regulated by IFN-gamma in experimental biliary atresia. *J Clin Invest* 2004;114(3):322-9.
- Sicklick JK, Choi SS, Bustamante M, McCall SJ, Pérez EH, Huang J, Li YX, Rojkind M, Diehl AM. Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291(4):G575-83.
- Sigal M, Siebert N, Zechner D, Menschikow E, Abshagen K, Vollmar B, Eipel C. Darbepoetin- α inhibits the perpetuation of necro-inflammation and delays the progression of cholestatic fibrosis in mice. *Lab Invest* 2010;90(10):1447-56.
- Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol* 1985;248(6 Pt 1):G618-25.
- Sikuler E, Groszmann RJ. Hemodynamic studies in long- and short-term portal hypertensive rats: the relation to systemic glucagon levels. *Hepatology* 1986;6(3):414-8.
- Sköld CM, Ohkuni Y, Liu XD, Numerof R, Rennard SI. Co-cultured human mast cells stimulate fibroblast-mediated contraction of collagen gels. *Inflammation* 2001;25(1):47-51.
- Slott PA, Liu MH, Tavoloni N. Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology* 1990;99(2):466-77.
- Snoek SA, Dhawan S, van Bree SH, Cailotto C, van Diest SA, Duarte JM, Stanisor OI, Hilbers FW, Nijhuis L, Koeman A, van den Wijngaard RM, Zuurbier CJ, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ. Mast cells trigger epithelial barrier dysfunction, bacterial translocation and postoperative ileus in a mouse model. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24(2):172-e91.
- Soylu AR, Aydogdu N, Basaran UN, Altaner S, Tarcin O, Gedik N, Umit H, Tezel A, Dokmeci G, Baloglu H, Ture M, Kutlu K, Kaymak K. Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats. *World J Gastroenterol* 2006;12(42):6835-41.
- Spataro AC, Bosmann HB. Mechanism of action of disodium cromoglycate--mast cell calcium ion influx after a histamine-releasing stimulus. *Biochem Pharmacol* 1976;25(5):505-10.
- Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* 2006;85(8):699-715.

- Strazzabosco M, Mennone A, Boyer JL. Intracellular pH regulation in isolated rat bile duct epithelial cells. *J Clin Invest* 1991;87(5):1503-12.
- Strazzabosco M, Fiorotto R, Melero S, Glaser S, Francis H, Spirli C, Alpini G. Differentially expressed adenylyl cyclase isoforms mediate secretory functions in cholangiocyte subpopulation. *Hepatology* 2009;50(1):244-52.
- Sugihara A, Tsujimura T, Fujita Y, Nakata Y, Terada N. Evaluation of role of mast cells in the development of liver fibrosis using mast cell-deficient rats and mice. *J Hepatol* 1999;30(5):859-67.
- Szabó E, Lódi C, Korpos E, Batmunkh E, Rottenberger Z, Deák F, Kiss I, Tokés AM, Lotz G, László V, Kiss A, Schaff Z, Nagy P. Expression of matrilin-2 in oval cells during rat liver regeneration. *Matrix Biol* 2007;26(7):554-60.
- Sztrymf B, Rabiller A, Nunes H, Savale L, Lebrec D, Le Pape A, de Montpreville V, Mazmanian M, Humbert M, Hervé P. Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats. *Eur Respir J* 2004;23(5):752-8.
- Sztrymf B, Libert JM, Mougeot C, Lebrec D, Mazmanian M, Humbert M, Herve P. Cirrhotic rats with bacterial translocation have higher incidence and severity of hepatopulmonary syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20(10):1538-44.
- Tahan G, Tarcin O, Tahan V, Eren F, Gedik N, Sahan E, Biberoglu N, Guzel S, Bozbas A, Tozun N, Yucel O. The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Dig Dis Sci* 2007;52(12):3348-54.
- Takeshita A, Shibayama Y. Role of mast cells in hepatic remodeling during cholestasis and its resolution: relevance to regulation of apoptosis. *Exp Toxicol Pathol* 2005;56(4-5):273-80.
- Tanaka Y, Chen C, Maher JM, Klaassen CD. Kupffer cell-mediated downregulation of hepatic transporter expression in rat hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation* 2006; 82 (2): 258-66.
- Tanaka A, Tsuneyama K, Mikami M, Uegaki S, Aiso M, Takikawa H. Gene expression profiling in whole liver of bile duct ligated rats: VEGF-A expression is up-regulated in hepatocytes adjacent to the portal tracts. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 (11): 1993-2000.
- Tang S, Lo CY, Lo WK, Chan TM. Resolution of eosinophilic peritonitis with ketotifen. *Am J Kidney Dis* 1997;30(3):433-6.
- Thabut D, Tazi KA, Bonnefont-Rousselot D, Aller M, Farges O, Guimont MC, Tellier Z, Guichard C, Ogier-Denis E, Poynard T, Moreau R, Lebrec D. High-density lipoprotein administration attenuates liver proinflammatory response, restores liver endothelial nitric oxide synthase activity, and lowers portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007;46(6):1893-906.
- The FO, Buist MR, Lei A, Bennink RJ, Hofland J, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ, Boeckxstaens GE. The role of mast cell stabilization in treatment of postoperative ileus: a pilot study. *Am J Gastroenterol* 2009;104(9):2257-66.
- Theoharides TC, Bondy PK, Tsakalos ND, Askenase PW. Differential release of serotonin and histamine from mast cells. *Nature* 1982;297(5863):229-31.

- Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822(1):21-33.
- Tietz NW, Rinker AD, Shaw LM. International Federation of Clinical Chemistry. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). IFCC Document Stage 2, Draft 1, 1983-03 with a view to an IFCC Recommendation. *Clin Chim Acta*. 1983;135(3):339F-367F.
- Toki F, Takahashi A, Suzuki M, Ootake S, Hirato J, Kuwano H. Development of an experimental model of cholestasis induced by hypoxic/ischemic damage to the bile duct and liver tissues in infantile rats. *J Gastroenterol* 2011;46(5):639-47.
- Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* 1998;339(17):1217-27.
- Traver E, Torres R, de Mora F, Vergara P. Mucosal mast cells mediate motor response induced by chronic oral exposure to ovalbumin in the rat gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22(1):e34-43.
- Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis* 1990;10(1):56-65.
- Valent P, Sillaber C, Baghestanian M, Bankl HC, Kiener HP, Lechner K, Binder BR. What have mast cells to do with edema formation, the consecutive repair and fibrinolysis? *Int Arch Allergy Immunol* 1998;115(1):2-8.
- Van den Heuvel MC, Gouw AS, Boot M, Slooff MJ, Poppema S, de Jong KP. The finest branches of the biliary tree might induce biliary vascularization necessary for biliary regeneration. *J Hepatol* 2006;44(5):947-55.
- Van Diest SA, Stanisor OI, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ, van den Wijngaard RM. Relevance of mast cell-nerve interactions in intestinal nociception. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822(1):74-84.
- Van Nassauw L, Adriaensen D, Timmermans JP. The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci* 2007;133(1):91-103.
- Van Steenkiste C, Trachet B, Casteleyn C, van Loo D, Van Hoorebeke L, Segers P, Geerts A, Van Vlierberghe H, Colle I. Vascular corrosion casting: analyzing wall shear stress in the portal vein and vascular abnormalities in portal hypertensive and cirrhotic rodents. *Lab Invest* 2010;90(11):1558-72.
- Vega De Céniga M, Valdés F, Aller MA, Nava MP, Chivato T, Arias J. Budesonide ameliorates early portal hypertension in the rat: possible antiexudative splanchnic action. *Inflammopharmacology* 2003;11(3):211-22.
- Vítek L, Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem* 2007;43:1-57.
- Vliagoftis H, Befus AD. Rapidly changing perspectives about mast cells at mucosal surfaces. *Immunol Rev* 2005;206:190-203.

- Vliagoftis H, Befus AD. Mast cells at mucosal frontiers. *Curr Mol Med* 2005;5(6):573-89.
- Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1983;244(1):G52-7.
- Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1984;87(5):1120-6.
- Wagner M, Zollner G, Trauner M. New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *J Hepatol* 2009;51(3):565-80.
- Wakabayashi Y, Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M. Mechanism of neutrophil accumulation in sinusoids after extrahepatic biliary obstruction. *Hepatogastroenterology* 2008;55(85):1179-83.
- Walker M, Harley R, LeRoy EC. Ketotifen prevents skin fibrosis in the tight skin mouse. *J Rheumatol* 1990;17: 57-9.
- Wang G, Shen H, Rajaraman G, Roberts MS, Gong Y, Jiang P, Burczynski F. Expression and antioxidant function of liver fatty acid binding protein in normal and bile-duct ligated rats. *Eur J Pharmacol* 2007;560 (1): 61-8.
- Wang CC, Lin JW, Lee LM, Lin CM, Chiu WT, Pai HT, Hung KS. Alpha-melanocyte-stimulating hormone gene transfer attenuates inflammation after bile duct ligation in the rat. *Dig Dis Sci* 2008; 53 (2): 556-63.
- Wang J, Shi GP. Mast cell stabilization: novel medication for obesity and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2011;27(8):919-24.
- Wasmuth HE, Tacke F, Trautwein C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* 2010;30(3):215-25.
- Wasmuth HE, Weiskirchen R. Pathogenesis of liver fibrosis: modulation of stellate cells by chemokines. *Z Gastroenterol* 2010;48(1):38-45.
- Waynforth HB, Flecknell PA. Anaesthesia and postoperative care. In: Waynforth HB, Flecknell PA, editors. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. London. Elsevier Academic Press. 2004;pp 100-152.
- Webster D, Bignell AH, Attwood EC. An assessment of the suitability of bromocresol green for the determination of serum albumin. *Clin Chim Acta* 1974;53(1):101-8.
- Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* 1997;61(3):233-45.
- White JR, Ishizaka T, Ishizaka K, Sha'afi R. Direct demonstration of increased intracellular concentration of free calcium as measured by quin-2 in stimulated rat peritoneal mast cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81(13):3978-82.
- Wiest R, Rath HC. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17(3):397-425.

- Wiest R, Weigert J, Wanninger J, Neumeier M, Bauer S, Schmidhofer S, Farkas S, Scherer MN, Schäffler A, Schölmerich J, Buechler C. Impaired hepatic removal of interleukin-6 in patients with liver cirrhosis. *Cytokine* 2011;53(2):178-83.
- Winau F, Quack C, Darmoise A, Kaufmann SH. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol* 2008;20(1):68-74.
- Woerly G, Loiseau S, Loyens M, Schoch C, Capron M. Inhibitory effects of ketotifen on eotaxin-dependent activation of eosinophils: consequences for allergic eye diseases. *Allergy* 2003;58(5):397-406.
- Woolf GM, Vierling JM. Disappearing intrahepatic bile ducts: the syndromes and their mechanisms. *Semin Liver Dis* 1993;13(3):261-75.
- Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 2011;208(7):1339-50.
- Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, LeSage G. Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J Gastroenterol* 2006;12(22):3553-63.
- Xia X, Demorrow S, Francis H, Glaser S, Alpini G, Marzoni M, Fava G, Lesage G. Cholangiocyte injury and ductopenic syndromes. *Semin Liver Dis* 2007;27(4):401-12.
- Xu JM, Shi GP. Emerging role of mast cells and macrophages in cardiovascular and metabolic diseases. *Endocr Rev* 2012;33(1):71-108.
- Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta* 2010;411(21-22):1570-9.
- Yagi R, Zhu J, Paul WE. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int Immunol* 2011;23(7):415-20.
- Yamashiro M, Kouda W, Kono N, Tsuneyama K, Matsui O, Nakanuma Y. Distribution of intrahepatic mast cells in various hepatobiliary disorders. An immunohistochemical study. *Virchows Arch* 1998;433(5):471-9.
- Yang W, Benjamin IS, Moore K, Portmann B, Alexander B. The action of nitric oxide on hepatic haemodynamics during secondary biliary cirrhosis in the rat. *Eur J Pharmacol* 2003;461(1):41-8.
- Yang H, Li TW, Peng J, Tang X, Ko KS, Xia M, Aller MA. A mouse model of cholestasis-associated cholangiocarcinoma and transcription factors involved in progression. *Gastroenterology* 2011;141(1):378-88.
- Yönetçi N, Oruç N, Ozütemiz AO, Celik HA, Yüce G. Effects of mast-cell stabilization in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 2001;29(3):163-71.
- Yukselen V, Karaoglu AO, Ozutemiz O, Yenisey C, Tuncyurek M. Ketotifen ameliorates development of fibrosis in alkali burns of the esophagus. *Pediatr Surg Int* 2004;20(6):429-33.
- Yung S, Chan TM. Glycosaminoglycans and proteoglycans: overlooked entities? *Perit Dial Int* 2007;27 (Suppl 2):S104-9.

- Zandieh A, Payabvash S, Pasalar P, Morteza A, Zandieh B, Tavangar SM, Dehpour AR. Gadolinium chloride, a Kupffer cell inhibitor, attenuates hepatic injury in a rat model of chronic cholestasis. *Hum Exp Toxicol* 2011;30(11):1804-10.
- Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005;24(37):5764-74.
- Zhang H, Lin L, Yang H, Zhang Z, Yang X, Zhang L, He S. Induction of IL-13 production and upregulation of gene expression of protease activated receptors in P815 cells by IL-6. *Cytokine* 2010;50(2):138-45.
- Zhang L, Oh SY, Wu X, Oh MH, Wu F, Schroeder JT, Takemoto CM, Zheng T, Zhu Z. SHP-1 deficient mast cells are hyperresponsive to stimulation and critical in initiating allergic inflammation in the lung. *J Immunol* 2010;184(3):1180-90.
- Zhang J, Shi GP. Mast cells and metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822(1):14-20.
- Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol* 2010; 28: 445-89.
- Zimmermann A, Zhao D, Reichen J. Myofibroblasts in the cirrhotic rat liver reflect hepatic remodeling and correlate with fibrosis and sinusoidal capillarization. *J Hepatol* 1999;30(4):646-52.
- Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M, Prusa R, Kizek R. Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem* 2010;17(31):3751-68.
- Zollner G, Wagner M, Fickert P, Geier A, Fuchsbichler A, Silbert D, Gumhold J, Zatloukal K, Kaser A, Tilg H, Denk H, Trauner M. Role of nuclear receptors and hepatocyte-enriched transcription factors for Ntcp repression in biliary obstruction in mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289(5):G798-805.
- Zollner G, Trauner M. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis* 2008;12(1):1-26.