



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

***INFLUENCIA DEL USO DE QUIMIOTERAPIA
ANTIANGIOGENICA
EN LA REGENERACION HEPATICA***

Doctorando: ***Amparo Valverde Martínez***

Directores: ***Dr. Javier Briceño Delgado / Dr. Pedro López Cillero***

Córdoba, 2012

TÍTULO: *Influencia del uso de quimioterapia antiangiogénica en la regeneración hepática*

AUTOR: *Amparo Valverde Martínez*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



D. Francisco Javier Briceño Delgado, médico especialista de la Unidad de Gestión Clínica de Cirugía General y del Aparato Digestivo, Jefe de Sección de Docencia e Investigación del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba y Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Córdoba

Y

D. Pedro López Cillero, médico especialista de la Unidad de Gestión Clínica de Cirugía General y del Aparato Digestivo, Jefe de Sección de Cirugía Hepatobiliar y Trasplante Hepático del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba y Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Córdoba

Certifican:

Que la tesis titulada ***“Influencia del uso de quimioterapia antiangiogénica en la regeneración hepática”*** ha sido realizada por **Dña. Amparo Valverde Martínez** bajo nuestra supervisión y dirección.

Para que así conste a todos los efectos, se expide el presente certificado en Córdoba, a treinta de enero de dos mil doce

Dr. D. Francisco Javier Briceño Delgado

Dr. D. Pedro López Cillero

I. INTRODUCCION

17

A. ETAPAS DE LA REGENERACION HEPATICA.....	19
INICIACION DE LA REGENERACION TRAS LESION HEPATICA.....	19
<i>a.- Fase precoz.....</i>	<i>19</i>
<i>b.- Fase tardía.....</i>	<i>19</i>
<i>c.- Citoquinas en el inicio de la regeneración hepática.....</i>	<i>20</i>
<i>c.1. TNF.....</i>	<i>22</i>
<i>c.2. IL6.....</i>	<i>22</i>
<i>c.3. Señales intracelulares de la fase de priming.....</i>	<i>23</i>
<i>c.4. Oxido nítrico.....</i>	<i>24</i>
FASE DE PROGRESION EN LA REGENERACION HEPATICA.....	25
<i>a.- Mitógenos completos.....</i>	<i>26</i>
<i>a.1. EGF.....</i>	<i>26</i>
<i>a.2. VEGF.....</i>	<i>26</i>
<i>a.3. TGF-alfa.....</i>	<i>28</i>
<i>a.4. HSS.....</i>	<i>28</i>
<i>a.5. HGF.....</i>	<i>28</i>
<i>b.- Comitógenos.....</i>	<i>29</i>
<i>c.- Factores inhibidores de la fase de progresión.....</i>	<i>29</i>
<i>c.1. TGF-beta.....</i>	<i>29</i>
<i>c.2. Chalonas.....</i>	<i>30</i>
<i>c.3. Inhibidor de la proliferación hepática.....</i>	<i>30</i>
<i>c.4. IL1-beta.....</i>	<i>30</i>
<i>d.- Señales intracelulares de la fase de progresión.....</i>	<i>30</i>
<i>d. 1. Receptores acoplados a la proteína G.....</i>	<i>30</i>
<i>d.2. Receptores tirosín-kinasa.....</i>	<i>32</i>
<i>d.3. Receptores janus-kinasa.....</i>	<i>33</i>
<i>d.4. Receptores esteroides y hormonas tiroideas.....</i>	<i>34</i>
FASE DE REMODELADO.....	34
TERMINACION.....	35
RESTAURACIÓN SINUSOIDE Y ESPACIO PRESINUSOIDAL.....	36
APOPTOSIS DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA.....	38
CRONOLOGÍA DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA.....	39
B. FACTORES CONDICIONANTES EN CIRUGÍA HEPÁTICA.....	41
ESTEATOSIS.....	41
ISQUEMIA-REPERFUSION.....	41
EXTENSION DE LA HEPATECTOMIA.....	42
CIRROSIS.....	42
PREACONDICIONAMIENTO ISQUEMICO.....	43
EDAD.....	43

C. LA ANGIOGENESIS Y EL CRECIMIENTO TUMORAL.....	45
<i>ROL DEL “VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR”.....</i>	<i>45</i>
<i>a.- Funciones del VEGF en las células endoteliales.....</i>	<i>45</i>
<i>b.- Reguladores de la expresión del VEGF y sus receptores.....</i>	<i>46</i>
<i>IMPORTANCIA DE LA ANGIOGENESIS EN LA TERAPIA CONTRA EL CANCER.....</i>	<i>48</i>
<i>a.- Cirugía y angiogénesis.....</i>	<i>48</i>
<i>b.- Oportunidades terapéuticas.....</i>	<i>49</i>
D. TERAPIA SISTEMICA Y METASTASIS HEPATICAS DE CANCER COLORRECTAL.....	49
E. EVIDENCIA DEL USO DE ANTIANGIOGENICOS COMO AGENTES QUIMIOTERAPICOS EN LAS METASTASIS HEPATICAS DE ORIGEN COLORRECTAL.....	51
F. CONTROVERSIAS DE LA INFLUENCIA DEL BEVACIZUMAB COMO TERAPIA NEOADYUVANTE EN LA REGENERACION HEPATICA TRAS CIRUGIA DE RESECCION.....	53
II. JUSTIFICACION	57
III. HIPOTESIS	61
IV. OBJETIVOS	65
V. METODOLOGIA	69
VI. RESULTADOS	107
A. DESCRIPCIÓN BASAL DEL ESTUDIO.....	109
B. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL BEVACIZUMAB EN LOS GRUPOS DE ANIMALES NO SOMETIDOS A CIRUGÍA DE RESECCIÓN.....	123

<i>b.1. Comparación estadística variables cuantitativas entre grupos no sometidos a hepatectomía y a los que no se les administra Bevacizumab, con aquellos a los que se les administra el antiangiogénico.....</i>	126
<i>b.2. Comparación estadística variables cuantitativas entre grupos no sometidos a hepatectomía y a los que se les administra Bevacizumab (dosis basal) con aquellos a los que se les administra la mitad y el doble de la dosis del antiangiogénico.....</i>	146
<i>b.3. Representación mediante diagramas de sectores de las variable cualitativas.....</i>	166
C. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL BEVACIZUMAB EN LOS GRUPOS DE ANIMALES SOMETIDOS A CIRUGÍA DE RESECCIÓN.....	169
<i>c.1. Comparación estadística variables cuantitativas entre grupos sometidos a hepatectomía y a los que no les administra Bevacizumab, con aquellos a los que se les administra el antiangiogénico.....</i>	170
<i>c.2. Comparación estadística variables cuantitativas entre grupos sometidos a hepatectomía y a los que se les administra Bevacizumab (dosis basal), con aquellos a los que se les administra la mitad y el doble de la dosis del antiangiogénico.....</i>	191
<i>c.3. Representación mediante diagramas de sectores de las variables cualitativas.....</i>	212
VII. DISCUSION	217
<i>a.- Metodológica y Bibliográfica.....</i>	217
<i>b.- De Resultados.....</i>	228
VIII. CONCLUSIONES	239
IX. APLICABILIDAD CLINICA	243
X. BIBLIOGRAFIA	247

* <i>índice de abreviaturas</i>	263
** <i>índice de tablas</i>	271
*** <i>índice de figuras</i>	277
**** <i>anexo tablas</i>	285

I.-INTRODUCCION

La regeneración hepática es uno de los fenómenos fisiológicos que más interés ha despertado en científicos y médicos en el último siglo. La primera referencia que se tiene de este complejo proceso data del año 750-700 A.C. En la Teogonía de Hesíodo, obra literaria griega donde se describe el origen del hombre, un Titán, Prometeo, era castigado por Zeus por robar el fuego a los Dioses del Olimpo y entregárselo a los hombres primitivos. El castigo consistía en que, encadenado durante 30000 años a una roca en el Monte Cáucaso, su hígado era devorado cada día por un águila. Al día siguiente, el hígado de Prometeo se había regenerado y estaba dispuesto para un nuevo ataque del águila (*Figura 1*).

Sin embargo, no es hasta el año 1890 cuando se tiene suficiente constancia científica para hablar del fenómeno de regeneración hepática en el humano¹.



Figura 1. Mito de Prometeo

Hoy día, podemos hablar con más propiedad del fenómeno de regeneración hepática, como un proceso de hiperplasia compensadora. Tras una hepatectomía parcial, el hígado reseca no vuelve a crecer, sino que a partir de la hiperplasia del tejido residual se restaura el volumen original. Cuando se alcanza el volumen original, el proceso se detiene de forma brusca². El hígado, es capaz de restablecer su volumen óptimo en relación con el tamaño corporal después de una agresión que conlleve pérdida celular mediante fenómenos de síntesis de ADN y de mitosis.

Por tanto, el proceso de regeneración hepática debemos definirlo como la capacidad para restaurar no sólo la masa y sino también la función tisular hepática tras una lesión o resección parcial. El proceso mediante el cual el hígado acomete este fenómeno es complejo, no depende exclusivamente de un factor y se ve afectado por el mecanismo lesional.

La restauración de la arquitectura normal del hígado ocurre generalmente tras eliminar el factor causante del daño hepático. Sin embargo, ante la presencia continuada del mecanismo lesional, puede producirse una alteración en la replicación de los hepatocitos, fibrosis, anomalías vasculares, cirrosis y cáncer.

La evidencia científica actual nos sugiere que el mecanismo de regeneración hepática quizá varíe en función del tipo de mecanismo lesional que actúa sobre el hígado³.

A. ETAPAS DE LA REGENERACION HEPATICA

INICIACION DE LA REGENERACION TRAS LESION HEPATICA

Podemos afirmar que el proceso de regeneración hepática está dividido en varias fases, que dependen de la presencia o ausencia de múltiples factores, que actúan a modo de cascada. Tras la hepatectomía o una lesión hepatotóxica, la respuesta regenerativa está dirigida por la liberación de citoquinas y factores de crecimiento y regulada por un incremento de actividad de los genes responsables del crecimiento y por los telómeros³. Los telómeros son secuencias repetidas de ADN al final de los cromosomas que los protegen de la digestión, de tal forma que evitan la pérdida de información genética contenida en el ADN, al estar implicados en el cese del fenómeno replicativo. La fabricación de telómeros depende de la enzima telomerasa, que no es normalmente expresada por células hepáticas maduras, salvo durante el proceso de replicación. Sin embargo, esta enzima es expresada por el 80% de las células malignas y es utilizada como marcador de cambios precoces de malignidad⁴.

La mayoría de los hepatocitos está en estado quiescente y requiere de cebadores (*priming factor*) antes de iniciar la replicación. Un número importante de factores implicados en la regeneración circulan por la sangre, incluso cuando no se está produciendo el fenómeno replicativo, sugiriendo así que el

hepatocito no reacciona ante estos factores a menos que previamente haya sido cebado (*primed*). El cebado o la iniciación son controlados por una serie de genes, que actúan minutos después de la hepatectomía, o bien tras ser expuestos a mitógenos completos. Esta fase de cebado o iniciación puede ser a su vez dividida en precoz y tardía.

a.- Fase precoz

La fase precoz de la iniciación es estimulada por proto-oncogenes como c-fos, c-myc y c-jun, que son reguladores de la transcripción y por los factores de transcripción NFκB, STAT3, AP-1 y CEBPβ, aunque análisis recientes revelan que podrían estar implicados en torno a 185 genes. Globalmente, estos estudios revelan un patrón entrelazado de expresión génica coordinado, desde el mismo momento de la hepatectomía parcial hasta la replicación de DNA. De esta forma, la célula es cebada para la replicación, aunque esta fase puede ser fácilmente revertida y su progresión hacia la división celular dependerá de la presencia de otros factores señal. Si estos factores están ausentes, la célula simplemente retorna a la fase quiescente⁵.

b.- Fase tardía

La fase tardía de la iniciación ocurre algunas horas después de la hepatectomía o lesión hepatotóxica, y es controlada por la inducción de genes que requieren la síntesis proteica como p53.

Factores como la ornitina decarboxilasa, envuelta en la estabilización del ARN mensajero (ARNm), también ejerce influencia en la fase tardía de la iniciación, comenzando su liberación una hora tras la hepatectomía y teniendo un pico máximo de liberación a las cuatro horas. Estos factores son, con frecuencia, sensibles a inhibidores de la traslación⁶.

Sin embargo, la señal exacta implicada en la inducción de la activación del proceso de regeneración está por determinar. Se piensa que la pérdida de la masa funcional hepática estimula la liberación de citoquinas, que cada una en su turno inician la síntesis de ADN y la regeneración hepática por inducción de los

genes apropiados, de tal forma que la ausencia de alguna de ellas conlleva el retraso de la regeneración hepática, aunque no la abolición definitiva de este fenómeno.

c.- Citoquinas en el inicio de la regeneración hepática

La **fase de iniciación** o *Priming phase* corresponde al período de tiempo en el cual los hepatocitos en fase G0 o quiescente pasan a fase G1. Durante esta fase, existe un incremento sérico y hepático de determinadas citoquinas como la IL6 y el TNF α (*Figura 2*). Asimismo, se produce una activación precoz de determinados genes (respuesta génica inmediata precoz).

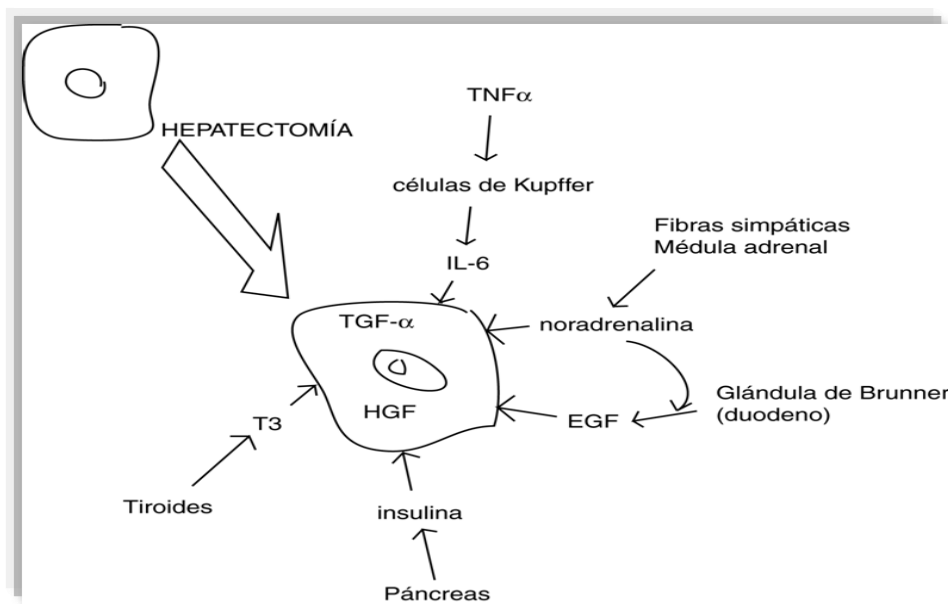


Figura 2. *Iniciación-regulación multifactorial de la regeneración hepática*

La expresión de estos genes no conlleva síntesis proteica, sino que adquieren funciones fisiológicas y rasgos estructurales no comunes. Los protooncogenes *c-fos*, *c-myc* y *c-jun* presentan elevación del fenómeno de transcripción de forma rápida pero transitoria durante la mencionada respuesta génica inmediata precoz^{6,7}.

c.1. TNF-alfa

TNF es una citoquina con efectos pleiotróficos que además presenta múltiples roles en el fenómeno de autodefensa. Esta citoquina se requiere para la regeneración hepática normal. La carencia de señal inducida por TNF en el proceso de regeneración hepática puede ser sustituida por la inyección de IL-6 recombinante, lo que sugiere que la función del TNF es, exclusivamente, facilitar la liberación de IL-6. La inyección de TNF-alfa a relativamente altas dosis, conlleva un proceso limitado de proliferación del hepatocito, tras un período inicial de proliferación de células no parenquimatosas. Este efecto sin embargo no se muestra a dosis más bajas. Estos resultados tomados conjuntamente con los cambios bioquímicos producidos en el hígado en respuesta al TNF (incluyendo la activación de NF-kB y la expresión de genes inmediatos precoces), sugieren que el TNF sea quizás un factor cebador o priming factor que facilita al hepatocito responder a factores de crecimiento⁸.

El factor kB de transcripción nuclear (NF-kB), el factor transductor de señal y activador

de transcripción 3 (STAT3), la Proteína-1 activadora y el catalizador de proteína obligatoria β (C/EBP β), también se encuentran incrementados durante las fases iniciales de la regeneración hepática⁹⁻¹².

De la actuación del NF-kB, se genera como resultado la liberación de IL-6, que es capaz por sí misma de activar STAT3, estableciéndose una cascada de transducción de señal con la secuencia TNF α -TNF α receptor 1 (TNF α R-1)-NF-kB-IL-6-STAT3.

NF-kB y STAT3 pueden transactivar gran cantidad de genes diana y la IL-6 tiene así mismo múltiples genes diana además de STAT3, sirviendo de esta forma de activador de la proliferación de agentes antiapoptóticos^{13,14}.

Ahora bien, la secuencia molecular dependiente de TNF tras la hepatectomía es un complejo circuito capaz de desencadenar el fenómeno regenerativo, pero en el que actúan otras citoquinas, óxido nítrico y endotoxinas (LPS) liberados desde el torrente sanguíneo¹⁵.

c.2. IL-6

La IL-6 es una citoquina proinflamatoria multifuncional envuelta en múltiples procesos patológicos e inmunes¹⁶. Su función varía con el órgano diana sobre el que actúa, es decir dependiendo del tipo celular con el que interacciona puede ejercer una función estimuladora del crecimiento o inhibidora del crecimiento, protectora respecto al fenómeno apoptótico inducido por TGF- β o promotora de la diferenciación celular (células B,

células T, osteoclastos y hepatocitos). Es producida de forma local formando parte de la respuesta en fase aguda tras una amplia variedad de factores lesionales como pueden ser una infección aguda o un traumatismo. El ligando en la célula de la IL-6 es conocido como gp80 (cadena α del receptor para IL-6) (Figura 3). La interacción entre IL-6 y su receptor conlleva la dimerización del receptor gp130 y la activación consiguiente de un proceso de señalización intracelular¹⁷. La IL-6 se expresa en hígado e intestino tras una resección hepática y ha sido identificada como un mediador esencial de la regeneración hepática en modelos de experimentación animal¹⁸⁻²⁰. La expresión de IL-6 parece por tanto ser esencial para el cebado del hepatocito²¹.

c.3. Señales intracelulares de la fase de priming

Por proceso de transducción de señal celular entendemos aquel mecanismo mediante el cual el medio extracelular se comunica con el intracelular induciendo una respuesta celular. En la fase de priming o cebado del hepatocito, tras una lesión hepática, el TNF vuelve al hepatocito competente para responder a estímulos de crecimiento. Asimismo, el TNF está implicado en fenómenos hepatotóxicos tanto en animales como humanos. El TNF interactúa contra dos receptores de la membrana del hepatocito, los TNF-R1 y R2. La mayoría de las actividades biológicas del TNF se producen tras su interacción con el TNF-R1. Dicha interacción conlleva a nivel del hepatocito, la liberación

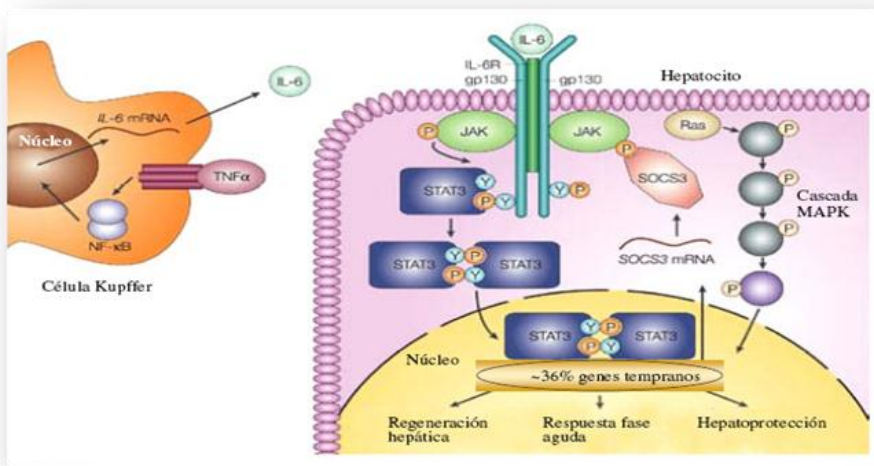


Figura 3. Señalización IL6-STAT3. (Cortesía Taub R. 2004 modificado¹¹) TNF- α se une a su receptor en células de Kupffer aumentando la expresión de IL-6 y éste se une de a su receptor activo JAK. Esto pone en marcha dos vías de señales: activación de la vía de las MAPK y fosforilación de Stat-3. Fosfo-Stat-3 dimeriza y se trasloca al núcleo donde media la activación de genes tempranos que participan en regeneración hepática, fase de respuesta aguda y hepatoprotección frente al daño mediado por Fas y tóxicos hepáticos.

de la proteína inhibitoria silenciadora de dominios de muerte y la formación de un complejo proteico de elevado peso molecular receptor-citosólico, que incluye a las proteínas de adaptación del TNF-R asociadas al dominio de muerte, TNF-R-factor 2 asociado, proteína de interacción-receptor y el dominio de muerte asociado a FAS. Este gran complejo proteico recluta enzimas clave específicas de esta fase envueltas en los fenómenos de señalización subsecuente como son la caspasa 8 y la kinasa I κ B, la cual en última instancia conduce a la apoptosis, activación de NF- κ B y activación de JNK – kinasa Terminal c-jun NH₂.

El resultado final de las múltiples interferencias es la modulación de los efectos del TNF, cambiando el balance entre vida y muerte del hepatocito, apoptosis y proliferación.

La disregulación del sistema de transducción de señal dependiente del TNF ha sido implicado en la patogénesis de múltiples enfermedades crónicas del hígado como hepatitis virales, cirrosis alcohólica y fallo hepático fulminante. Un sistema de transducción de señal dependiente del TNF que se encuentre alterado y activación aumentada de apoptosis mediada por TNF se ha asociado con esteatohepatitis y otras anomalías hepatocelulares. Los radicales libres de oxígeno y glutatión contenidos en el hígado serían responsables de dirigir el efecto del TNF en el hepatocito hacia mitógeno o apoptótico^{22,23}.

c.4. Óxido nítrico

El óxido nítrico –NO- es una molécula sintetizada a partir de la arginina por la enzima óxido nítrico sintetasa –NOS-, y su característica principal es su alta reactividad.

Existen dos isoformas diferentes de NOS (*Figura 4*):

a. cNOS. Óxido nítrico sintetasa constitutiva –NOSbc. Óxido nítrico sintetasa constitutiva de origen cerebral

–NOSec. Óxido nítrico sintetasa constitutiva de origen endotelial

b. iNOS. Óxido nítrico sintetasa inducible.

El comportamiento biológico de cada una de ellas coincide en la síntesis de NO, aunque cNOS conlleva una rápida liberación de NO tras su estimulación y es de vida media corta, mientras que iNOS requiere de la previa síntesis de ella misma y el resultado es una liberación prolongada y sostenida de NO. En el caso de la hiperplasia compensadora que supone la regeneración hepática, ambas isoformas juegan un rol crítico en una satisfactoria regeneración hepática posthepatectomía. La activación de cNOS en las células del endotelio hepático puede ocurrir después de que el ligando ocupe el receptor –activación de receptores colinérgicos- o cambie la presión en vasos sanguíneos. Aunque la actividad de cNOS podría ser importante en el mantenimiento del tono vascular en el hígado normal, se cree que los cambios en la presión sanguínea del endotelio vascular es un factor crítico en el proceso regenerativo²⁴.

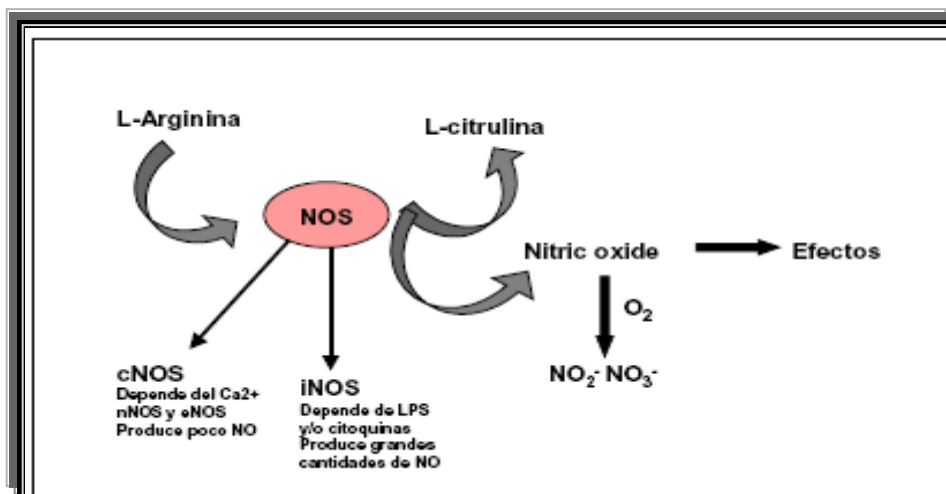


Figura 4. Reacción canalizada por la NOSintetasa

Tras la hepatectomía parcial, el hígado restante todavía recibe el volumen de sangre total prehepatectomía, lo que conlleva un aumento de la presión vascular que a su vez da lugar a un aumento de la síntesis de NO generado vía c-NOS. Este aumento inicial de actividad de c-NOS y liberación de NO es esencial en disparar los eventos y mecanismos de transducción de señal intracelulares requeridos para que el hepatocito entre en fase G1 y que la regeneración hepática comience.

Por el contrario, los efectos de síntesis de NO debidos a i-NOS, quedan por detrás de los generados por c-NOS, puesto que la enzima i-NOS debe ser sintetizada previamente. También parece ser que la inducción de iNOS, ocurre predominantemente en los hepatocitos y coincide con la fase

prerreplicativa celular -6 a 8 horas posthepatectomía-. La inducción de iNOS es citokín-dependiente y se ha demostrado que coincide con la inducción de los factores de transcripción IL-6 dependientes. Una combinación de IL-6 y TNF es requerida para la inducción de la actividad de iNOS, la cual es, en sí misma, necesaria para un proceso regenerativo hepático normal posthepatectomía²⁵. El NO juega un papel fundamental en la repoblación hepatocitaria del hígado y, como hemos visto, su síntesis inmediata posthepatectomía es dependiente de cNOS y la tardía dependiente de iNOS, ejerciendo a partir de ese momento el papel de protector celular frente a la muerte celular una vez que las células han entrado en un nuevo ciclo celular.

FASE DE PROGRESION EN LA
REGENERACION HEPATICA

fase S, está condenada a iniciar la replicación celular. En estudios sobre

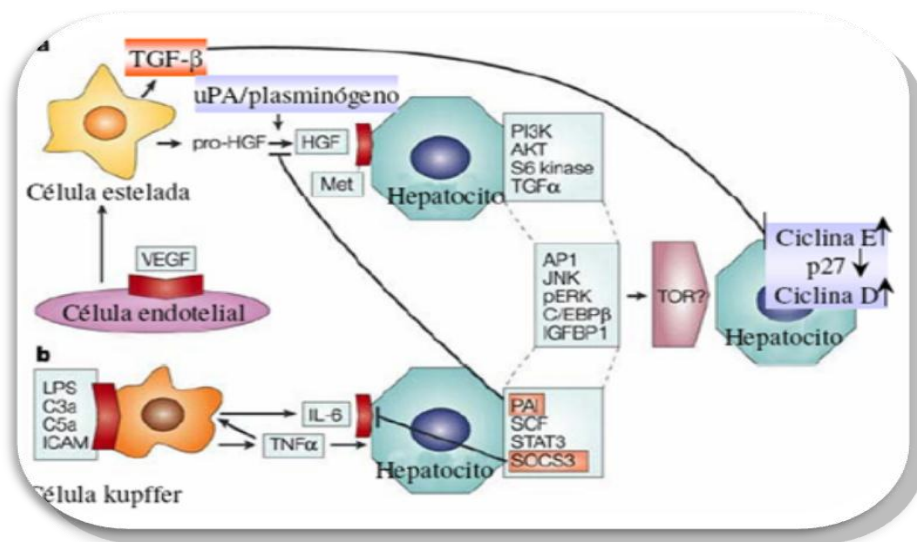


Figura 5. Vías que se activan durante la regeneración hepática por citoquinas y factores de crecimiento. (Cortesía Taub R. 2004 modificado¹¹)

TNF- α e IL-6 activan Stat-3 (entre otras señales) y varias proteínas que también participan en la señalización por factores de crecimiento. El VEGF es un miembro de la familia de genes de factores del crecimiento de células endoteliales y plaquetas, y estimula la producción de TGF-B y HGF por parte de la célula estelada. El factor de crecimiento HGF se une al receptor Met, activando la vía de PI3K y AKT y la liberación de TGF-α y otras señales compartidas con la señalización por citoquinas como API, JNK, ERKs, C/EBP-β e IGFBP1. Esta señalización lleva al aumento de la expresión de ciclinas D1 y E y a una disminución de los niveles de p27 en el hepatocito

Una vez que la célula ha sido cebada (primed), la progresión a fase G1 depende de la presencia continua de sustancias estimulantes conocidas como mitógenos. El efecto de los factores de crecimiento se cree es de rango corto y su modo de acción puede ser dependiente del estado metabólico del hepatocito y de la presencia o ausencia de otros efectores. Cuando la progresión ocurre, la célula procede a la síntesis de ADN, de tal forma que cuando la célula se encuentra en

animales, el pico de máxima síntesis de ADN y, por tanto, de mitosis ocurre entre las 24 y 48 horas en ratas y a los 4 días en perros después de una hepatectomía del 70%²⁶. Sin embargo, existen muy pocos datos acerca de este fenómeno en humanos dada la dificultad desde el punto de vista ético, de realización de biopsias repetidas en el postoperatorio en pacientes sometidos a una hepatectomía.

a.- Mitógenos completos

Se definen como tales, las sustancias capaces de estimular la síntesis de DNA de hepatocitos en cultivo (*in vitro*). Entre ellos podemos encontrar:

1. EGF (factor de crecimiento epidérmico).
2. VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular).
3. TGF- α (factor transformador del crecimiento alfa).
4. HSS (Sustancia estimuladora del hepatocito).
5. HGF (factor de crecimiento hepatocitario)

Los niveles de todos estos factores están considerablemente elevados tras la hepatectomía 2/3 (*Figura 5*).

Así mismo la administración endovenosa de suero de ratas hepatectomizadas a ratas normales induce la síntesis de DNA en estas últimas. El efecto sobre la síntesis de DNA que estos factores tienen puede a su vez verse incrementado por sustancias conocidas como **mitógenos incompletos** (co-mitógenos), como son la insulina, glucagón, adrenalina o noradrenalina²⁶.

a.1. EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGF es una glicoproteína estimuladora del crecimiento de tejidos epidérmico y epitelial tanto *in vivo* como *in vitro* vía tirosín-kinasa, así como del crecimiento de algunos fibroblastos en cultivo celular. Tanto en ratones como ratas, el lugar donde se concentra la producción de EGF son las glándulas salivares, La sialoadenectomía en el ratón resulta en un descenso en las

cantidades de EGF circulante en suero y en un retraso de la síntesis de DNA tras hepatectomía parcial. La extirpación completa de las glándulas salivares bloquea la regeneración hepática en la rata. La administración exógena de EGF corrige el problema en estos animales.

La activación por distintas vías del factor de crecimiento epidérmico, se ha relacionado con muchos procesos cruciales en la progresión tumoral, incluyendo las metástasis y supervivencia celular, proliferación, adhesión, diferenciación, migración, transformación y motilidad²⁷.

a.2. VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

El VEGF es uno de los más potentes reguladores positivos de la angiogénesis.

Se trata de una glicoproteína homodimérica con varias isoformas generada por RNAm derivado de una familia de genes de factores de crecimiento angiogénicos y linfangiogénicos.

La isoforma VEGF-A (comúnmente conocida como VEGF) fue la primera en ser identificada por Dvorak et al²⁸ como un factor inductor de la permeabilidad vascular secretado por células tumorales.

Posteriormente, Ferrara et al²⁹ consiguió aislar y clonar el VEGF-A como un mitógeno específico endotelial.

A su vez el gen VEGF-A es capaz de producir varias isoformas maduras (*Figura 6*) de las que la VEGF₁₆₅ es la isoforma predominante y es expresada habitualmente

en los tumores sólidos humanos.

La expresión del VEGF-A in vivo ha demostrado estar temporal y espacialmente asociada con los eventos clave de la vasculogénesis y angiogénesis. En ratones, la supresión homocigota o heterocigoto del gen VEGF es embriológicamente letal, dando lugar a defectos importantes en el sistema cardiovascular y en la vasculogénesis periférica por lo que ha demostrado ser fundamental en su desarrollo. A su vez, el

VEGF-A es esencial para un gran número de procesos angiogénicos incluyendo la cicatrización de las heridas, la ovulación y menstruación, regulación de la presión sanguínea y en el embarazo.

El papel exacto de las demás isoformas del VEGF son menos conocidas, aunque cabe destacar el rol fundamental en la linfangiogénesis postnatal de VEGF-C y VEGF-D.

Los ligandos VEGF median sus efectos angiogénicos a través de varios receptores

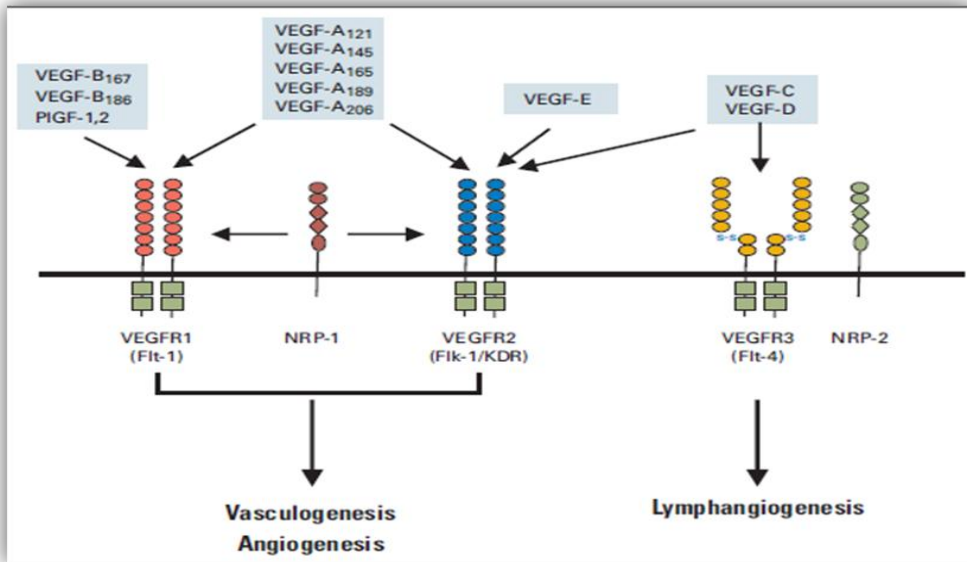


Figura 6. Isoformas del VEGF y sus receptores. (Cortesía Daniel J.^o)

La familia de genes de factores de crecimiento angiogénico y linfangiogénico relacionados con el VEGF, comprende seis isoformas (VEGF-A, B, C, D y E, placenta growth factor 1 y 2 : PlGF) que presentan uniones específicas a los distintos receptores VEGF tirosín-kinasa (VEGFR-1, 2 y 3) presentes en la superficie de las células endoteliales. Por otro lado la neuropilina (NRP-1) y NRP-2 son co-receptores para isoformas específicas de la familia VEGF incrementando la afinidad de unión a sus receptores.

diferentes. Dos de ellos fueron originalmente identificados en las células endoteliales y caracterizados como receptores específicos tirosín-kinasa (VEGFR-1 y VEGFR-2).

Ambos receptores son también expresados en distintas líneas hematopoyéticas celulares en el adulto. Recientemente ha sido identificado el VEGFR-3 más implicado en procesos de linfangiogénesis.

Los miembros de la familia VEGF presentan distintas afinidades de unión específica para dichos receptores. Las isoformas del VEGF-A se unen de forma selectiva a los receptores VEGFR-1 y 2 y VEGF-B junto con PlGF-1 y 2 (placenta growth factor) que son específicos para VEGFR-1. VEGF-E interactúa específicamente con VEGFR-2, mientras que VEGF-C y VEGF-D lo hacen con VEGFR-2 y 3³⁰.

Aunque el VEGF no estimula la síntesis del ADN en el hepatocito de forma directa, es necesaria su mención dentro del grupo de los mitógenos completos, por presentar un papel esencial en la angiogénesis y por tanto en la regeneración hepática.

a.3. TGF- α : factor transformador del crecimiento alfa

Se trata de una glicoproteína de la familia de EGF, incluso comparte con este factor el receptor. Aparentemente no es esencial para el proceso regenerativo; de hecho, ratas modificadas genéticamente para no expresar esta glicoproteína, presentan un fenómeno regenerativo de características normales, posiblemente compensado por un aumento de

EGF³¹. La sobreexpresión por ratas transgénicas de TGF- α , conduce a los hepatocitos a un alto índice de proliferación celular, que durante la infancia presentan hepatomegalia considerable, pero que paradójicamente no se acompaña de un aumento de la masa hepática en ratas adultas y ancianas, debido fundamentalmente a un ratio incrementado de muerte celular y a que posiblemente el efecto de TGF- α sea exclusivamente postnatal y de carácter transitorio.

Es producida por células no parenquimatosas del hígado, principalmente las células de Kupffer. Es capaz de estimular la síntesis de ADN del hepatocito *in vitro*. El incremento de TGF mRNA acontece 4 horas tras la hepatectomía, siendo el pico entre las 18 y 24 horas³².

a.4. HSS: sustancia estimuladora del hepatocito

Es capaz de estimular la síntesis de DNA sólo en aquellas células previamente cebadas. Sin embargo es un potente mitógeno para hepatocitos malignizados. Parece ser específica del hígado, puesto que no tiene efecto sobre otros órganos tanto *in vivo* como *in vitro* y es secretada exclusivamente por el hígado. Estudios *in vitro* han demostrado un efecto sinérgico con EGF^{33,34}

a.5. HGF: factor de crecimiento hepatocitario

HGF parece ser el mitógeno más importante de todos, capaz de estimular la síntesis de

DNA en hepatocitos de cultivo. Sin embargo, *in vivo*, el efecto proliferante sobre el hepatocito es algo más débil.

Hoy en día se sabe que tiene efectos pleiotróficos sobre otros muchos tejidos, siendo capaz de estimular diferentes clases de células epiteliales, como son del túbulo renal y melanocitos. Su acción se ve incrementada en presencia de insulina, glucagón y EGF^{35,36}. Se produce en diversos tejidos, que poseen mRNA de HGF, pero principalmente en células no parenquimatosas hepáticas. Particularmente interesantes en este aspecto son las células de Kupffer. No se encuentra en el interior del hepatocito, lo que sugiere que actúa de forma paracrina. Actúa sobre el receptor del hepatocito c-met tirosina kinasa³⁶. Los niveles de HGF se encuentran muy elevados en caso de fallo hepático agudo y especialmente alto en aquellos que no sobreviven. La explicación a este hecho radica en que el mayor índice de estimulación regenerativa se da en aquellos casos en que el daño hepático es letal. Es debido a que las células hepáticas dañadas liberan el HGF originando falsos niveles circulantes. También se dan niveles elevados en pacientes con insuficiencia renal crónica, que aunque no presentan daño hepático o fenómeno regenerativo, sí han sido sometidos a hemodiálisis durante mucho tiempo³⁷.

b.- Comitógenos

Los co-mitógenos no tienen efecto estimulante directo sobre la proliferación hepatocitaria, pero sí son capaces de mejorar

el efecto de los mitógenos completos y reducir el efecto de sustancias inhibitoras. Dentro de este grupo encontramos: Insulina, glucagón, adrenalina y noradrenalina, hormona tiroidea (mejora el status metabólico basal, no siendo específica del metabolismo hepático) y paratiroidea (efecto en fases tardías de la regeneración), calcio y vitamina D₂.

Los factores de crecimiento derivados de la insulina, también denominados somatomedinas, están implicados en la progresión de la regeneración hepática una vez que ésta se ha iniciado²⁶.

Por otro lado, el estado nutricional también ejerce influencia en el fenómeno regenerativo, pues éste presenta un ritmo circadiano y depende del comportamiento alimenticio. Así el fenómeno regenerativo se inhibe por la privación alimentaria y se reactiva con la realimentación, especialmente con algunos aminoácidos. Tras cuatro horas posthepatectomía se encuentran elevados ciertos aminoácidos, lo que sugiere que estén implicados en la síntesis de pirimidinas durante la regeneración³⁸.

c.- Factores inhibidores de la fase de progresión

c.1. TGF-β

Se trata de una citoquina, que en función del tejido sobre el que actúe y las condiciones que le rodeen, ejerce una función estimulante o inhibitoria. Se produce por células parenquimatosas y no parenquimatosas.

Administrado conjuntamente a TGF- α ejerce un efecto supresor de éste en el hígado en la regeneración. Sin embargo, este mismo efecto no se ve con otros mitógenos como HGF o insulina.

La administración de TGF- β sobre ratas hepatectomizadas inhibe durante unas 20 horas el fenómeno regenerativo, pasado este tiempo se reactiva de nuevo el fenómeno regenerativo. Ratas transgénicas que sobreexpresan TGF- β presentan regeneración hepática retrasada y ocasionalmente desarrollan carcinoma hepatocelular^{39,40}.

Los hepatocitos normales no son capaces de activar la producción de TGF- β , pero sí lo son aquellos hepatocitos que han iniciado el fenómeno regenerativo. Los niveles de TGF- β se encuentran elevados 4 horas posthepatectomía, con un pico a las 72 horas, sugiriendo que tiene efecto en las fases tardías de la regeneración, estimulando quizá el fenómeno de apoptosis⁴.

c.2.Chalonas, Inhibidor de proliferación hepática y la IL-1 β

Inhiben la proliferación hepatocitaria in vitro.

d.- Señales intracelulares de la fase de progresión

Las vías de señalización intracelular implicadas en la fase de progresión o crecimiento durante la regeneración hepática, pueden ser divididas a grosso modo en cuatro grupos basándose en sus receptores:

1. receptores acoplados a la proteína G

2. receptores con actividad tirosina-kinasa intrínseca

3. receptores que reclutan kinasas en el citosol

4. receptores nucleares hormonales.

Cuando son activados los 4 subtipos de receptores, el resultado es una respuesta de crecimiento mediada por los siguientes genes y proteínas:

~ complejo génico AP-1

~ myc

~ fos

~ jun

~ ciclinas, que resultan esenciales para la proliferación celular

La finalización de la respuesta proliferante es probablemente mediada por la regulación negativa de las señales proliferativas así como la activación de una quinta clase de receptores, los receptores con actividad serina-treonina kinasa que pertenece a la superfamilia del TGF- β ⁴¹.

d.1. Receptores acoplados a la proteína G³⁵

Proteínas G son una familia de proteínas compuestas por dímeros heterogéneos compuestos todas por 3 subunidades: α , β y γ . Esta familia de proteínas está asociada con unos receptores específicos para ellas en la membrana del hepatocito. Este tipo de receptor de membrana incluye todos aquellos activados por múltiples comitógenos hepáticos.

Durante la fase de latencia o reposo celular, la subunidad α de cada receptor está ocupada por GDP. Cuando el ligando, comitógeno,

interactúa con el receptor, el GTP desplaza al GDP en su unión con la subunidad α , lo que

producción de inositol trifosfato, al estimular la proteinkinasa C mediante diacilglicerol, a

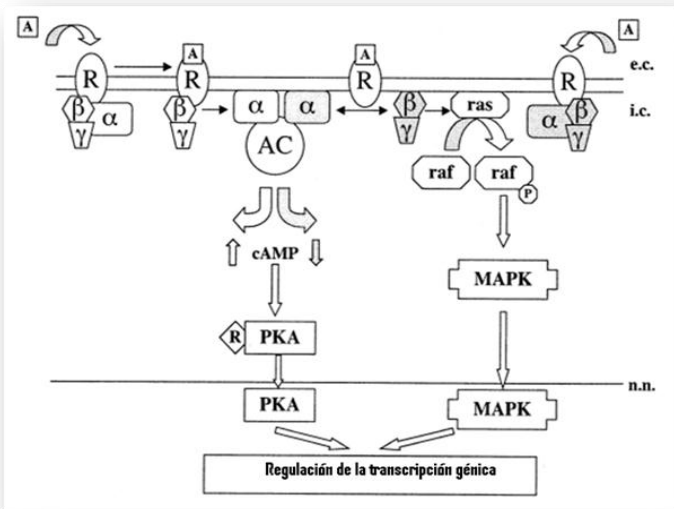


Figura 7. Sistema de señalización intracelular acoplado a proteína G

genera la liberación de esta subunidad respecto de β y γ . El tipo específico de subunidad α liberada en respuesta a un comitógeno determina la especificidad del efecto intracelular. La subunidad α incluye un dominio S o estimulador y un dominio I o inhibitorio, que regulan positiva o negativa, respectivamente, la producción vía adenilciclasa de AMPc y la activación o inhibición de la familia de proteínas con actividad quinasa-A. La liberación de AMPc sigue un patrón bifásico dependiente del equilibrio del dominio S o I.

Tras su activación, la proteína quinasa-A atraviesa la membrana nuclear actuando sobre los factores elementales reguladores del AMPc que pueden bien estimular o inhibir la transcripción nuclear.

Existen otros dominios dentro de la subunidad α como el q, que estimula la liberación de Calcio intracelular, vía

su vez generado por activación de la fosfolipasa C. Otro dominio conocido de la subunidad α es α_{12} , que cuando actúa el ligando adecuado al receptor de membrana estimula a través de este dominio el intercambio celular Na/K.

Tras la activación de la subunidad α , su inactivación ocurre mediante la inherente actividad GTP-asa asociada a la subunidad α , que convierte el GTP en GDP. Así la subunidad α , vuelve a su lugar de origen en la membrana asociada al receptor libre de ligando e inactivada al re asociarse con la subunidad β y γ . Se ha demostrado que el dímero β y γ liberado del dominio inhibitorio de la subunidad α , puede ejercer el mismo efecto que vía exclusiva subunidad α , aunque a su propia manera, es decir interactuando con un monómero de proteína G llamada p21ras (Figura 7).

Los modelos in vivo de hepatectomía parcial han demostrado el rol fundamental de esta vía de señalización intracelular durante el proceso regenerativo. Inmediatamente después de la hepatectomía parcial numerosos elementos de respuesta al stress o bien genes de activación precoz son activados, muchos de los cuales están vinculados a los receptores acoplados a proteínas G. Estos genes incluyen reguladores de la neoglucogénesis, críticos para una normal regeneración hepática⁴².

d.2. Receptores tirosín-kinasa (TK)

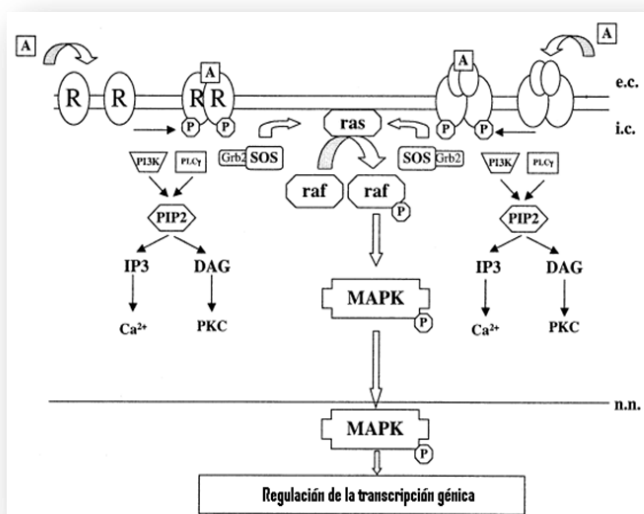
Los receptores con actividad intrínseca tirosina-kinasa son importantes en la regulación del efecto de los factores de crecimiento como EGF, HGF y TGF- α .. La ocupación por ligandos de estos receptores conlleva la dimerización del mismo y a la autofosforilación de los restos intracelulares ricos en tirosina. Estos restos ricos en tirosina

fosforilados se unen a las proteínas citosólicas ricas en homólogos -Src -SH2 Y SH3- conformando lo que se conoce como estado de activación. La agregación de SH2 o SH3 al receptor TK permite la activación de un complejo Grb2-SOS que actúa transformando la proteína G p21ras-GDP inactiva a la isoforma GTP, que es activa. La activación de p21ras permite el reclutamiento y fosforilación o activación del raf proteínico citosólico (Figura 8).

La activación del raf inicia las cascadas de fosforilación secuencial, llamadas APK, existiendo 3 isoformas de las mismas:

- ERKs o p42/44 MAPKS. Isoforma kinasa de regulación extracelular. Implicada en el crecimiento celular. Su inhibición aislada no altera el proceso de proliferación del hepatocito durante la regeneración.
- p38 MAPK o p38-RK o p38SAPK. Isoforma 1 kinasa activada por estrés. Su inhibición disminuye la síntesis de ADN en

Figura 8. Sistema de señalización intracelular que activa receptores con actividad tirosina- kinasa mediadores de la transcripción génica



el hepatocito durante la regeneración hepática. Su activación es prerequisite para el crecimiento celular.

- c-jun-NH2-kinasa Terminal o JNK o p46/p54 SAPK. Isoforma 2 kinasa activada por estrés. La ausencia de expresión de esta proteína en ratas modificadas genéticamente conlleva fallo en el desarrollo hepático.

De forma colectiva, estas kinasas han demostrado un papel esencial en el crecimiento celular, transformación, diferenciación y apoptosis⁴³.

La translocación de MAPKs activadas o fosforiladas al núcleo parece ser crítica en la regulación de la transcripción de factores nucleares específicos implicados en la regulación del ciclo celular, progresión de fase celular y crecimiento.

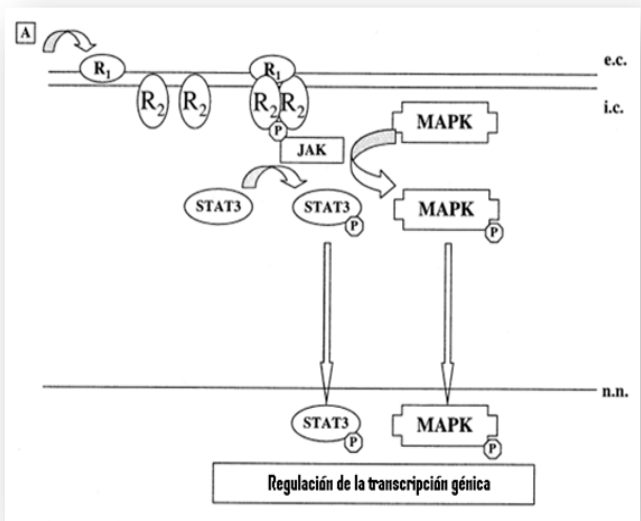
La amplia variedad de receptores que utiliza esta vía de señalización intracelular y el rol que ésta vía representa en el crecimiento celular, diferenciación, transformación y

apoptosis, son claves en el proceso regenerativo hepático.

d.3. Receptores que actúan vía Janus-Kinasa

Este tipo de receptores tiene como ligandos la IL-6, la prl y el IFN- α y γ . Cuando se produce la interacción ligando-receptor ocurre la multimerización, lo que permite el reclutamiento al medio intracelular de tirosina-kinasas citosólicas, entre ellas la familia Janus Kinasa -JAK-. La vía de señalización intracelular mediada por JAK conduce a la activación de la familia de proteínas activadoras de transcripción STAT. Este tipo de proteínas en condiciones normales residen en el citoplasma. La tirosin-fosforilación de STAT por JAK supone el traslado de los multímeros degradados de la primera al medio intranuclear induciendo la transcripción de DNA. Las diferentes isoformas de STAT-3 varían en función del tejido. Si se suma la activación por JAK de

Figura 9. Sistema de señalización intracelular que activa receptores Janus-Kinasa, mediadores de la transcripción génica



STAT a la activación independiente de STAT por IL-6, el resultado es la estimulación de una cascada de señalización ras-MAPK.

El papel más importante que realiza en la regeneración hepática la vía JAK/STAT es la siguiente: IL-6 una vez que ésta ha interactuado en la membrana del hepatocito conformando un dímero IL-6/IL-6R, gracias a la actuación del gp130, conduce a la fosforilación y activación de JAK cuya acción es la de fosforilar los 4 residuos distales de tirosina de la proteína STAT3. El resultado de la fosforilación de STAT3 es la de translocarse al núcleo celular e inducción de transcripción de genes con actividad promitogénica y antiapoptótica. La activación de STAT puede realizarse también mediada por EGF o TGF- α , demostrando la convergencia en las vías de señalización intracelular durante la regeneración hepática (*Figura 9*).

d.4. Receptores para esteroides y hormonas tiroideas

Lo componen una superfamilia de receptores nucleares ligando dependientes de factores de transcripción para:

- Esteroides
- Hormonas Tiroideas
- Ácido retinoico
- Ácidos biliares
- Vitamina D3
- Otros receptores sin ligando conocido

Su vía de señalización celular es doble:

-Activación rápida de MAPK, AC, PKC y proteínas G.

-Activación lenta de genes de transcripción modificando su expresión vía translocación al núcleo de receptores intracelulares.

La modificación genética en la rata de las diferentes subunidades que componen estos receptores supone un proceso anómalo de regeneración hepática y una esperanza de vida más corta.

FASE DE REMODELADO DEL LOBULO REGENERADO

¿Cuál es el mecanismo envuelto en la restauración del volumen hepático respecto del peso y volumen corporal?

Parece ser que los hepatocitos más superficiales se eliminan mediante un fenómeno apoptótico. TNF- α no sólo es capaz de inducir el fenómeno regenerativo, sino que está a su vez implicado en la inducción del fenómeno apoptótico. El balance entre apoptosis y supervivencia del hepatocito es crítico para que el remodelado completo de los lóbulos hepáticos regenerados sea adecuado. Se ha visto, mediante estudios experimentales, que ratas deficientes en IGFBP-1 no culminaban el fenómeno regenerativo hepático con un adecuado remodelado. La función de esta molécula como factor de supervivencia del hepatocito es la de contrarrestar la señal propapoptótica del TGF- β 1. La protección frente a la apoptosis del hepatocito mediada por la caspasa-8 viene dada por SMP-30. Asimismo, un agente antiapoptótico contra la pérdida celular mediada por TNF- α es la

superfamilia TNF, cuyos miembros actúan sobre el receptor de la linfotoxina- β , inhibiendo el proceso apoptótico en cascada dependiente de la caspasa-3.

Además, el sistema de las citokeratinas hepáticas K8/K18 juega un papel importante en la supervivencia celular, otorgando protección al hepatocito frente al estrés y la apoptosis, preservando de esta forma la integridad del hepatocito⁴⁴.

FASE DE TERMINACION

Posteriormente a la fase expansiva o de crecimiento y remodelado, la respuesta de crecimiento finaliza. Los factores más importantes implicados en la finalización son TGF- β s y las activinas, miembros ambos de la superfamilia del TGF- β . TGF- β y las activinas son responsables de la regulación de la masa orgánica hepática, inhibiendo la síntesis de ADN del hepatocito.

El receptor CIMPR-cation independiente manosa 6 fosfato receptor- se sobreexpresa en el hepatocito durante el proceso regenerativo. La activación de su transcripción ocurre durante la fase G1, actuando como mediador latente pro activación del TGF- β , al interactuar con éste en la membrana del hepatocito, durante la fase de respuesta de terminación en el proceso regenerativo. El TGF- β actúa mediado por smads, generando una señal intracelular una vez que interactúa con los receptores serina-treonina kinasa, en esta fase, que contribuye a la terminación del

proceso regenerativo al inhibir la transcripción de determinados genes. Además de inhibir la proliferación del hepatocito, TGF- β es apoptótico por una vía c-Jun independiente, lo que podría contribuir aun más a la fase de terminación.

Activina A y Folistatina inhiben y promueven, respectivamente, la proliferación hepatocitaria. La primera es un inhibidor autocrino de la iniciación de la síntesis de ADN del hepatocito. Es capaz de inducir una reducción de la masa hepática, y de estimular la apoptosis en el hepatocito. Su acción es bloqueada por la folistatina. Esta respuesta es dependiente de los receptores de las activinas y del traslado al núcleo del hepatocito de la proteína Smad 2. Activinas y sus receptores junto a la folistatina, exhiben un patrón distintivo temporal durante la regeneración. Tras una hepatectomía en la rata, los receptores para Activina A en el hepatocito disminuyen en las primeras 24 horas, normalizándose a las 72 horas, un fenómeno posiblemente debido a la respuesta del hepatocito a los estimulantes mitógenos. Aunque el sistema implicado en la terminación de la regeneración hepática – TGF- β /Smads- se secreta tras la hepatectomía, los hepatocitos en la primera fase de la regeneración son refractarios a los efectos apoptóticos de estos ligandos gracias a dos represores, SnoN y Ski, al ocupar e inhibir la vía de las proteínas smad, que dejan de ejercer su función durante la fase de terminación y que al final de la misma vuelven a actuar⁴⁵.

RESTAURACIÓN DEL SINUSOIDE Y ESPACIO PERISINUSOIDAL

De forma paralela a las fases más tardías del proceso regenerativo del hepatocito y la fase de terminación, se insinúan canales vasculares, se forma el espacio perisinusoidal de Disse, y se integran las células hepáticas estrelladas, regenerándose de esta forma la matriz extracelular (*Figura 10*). Estos fenómenos son cruciales no sólo para la reconstrucción del lóbulo regenerado, sino que junto a las células litorales (histiocitos) son la principal fuente de señales de terminación del proceso regenerativo.

La restauración del sinusoides requiere de la proliferación de células endoteliales, ejerciendo una función importante dentro del fenómeno regenerativo. El papel de las células endoteliales se justifica porque los mediadores autocrinos de la regeneración, como son IL-6 y HGF y por otro lado el VEGF, son los responsables del crecimiento de células endoteliales y por tanto reguladores esenciales en la angiogénesis. La formación definitiva del lóbulo regenerado depende de la interacción crítica entre hepatocitos y células endoteliales⁴⁶.

La repoblación del lóbulo hepático regenerado por células hepáticas estrelladas y sus descendientes celulares más diferenciados, y en particular su apostamiento en el nuevo espacio de Disse en la fase de resinusoidalización depende de la proliferación y migración de estas células. Las células hepáticas estrelladas -HSC-

muestran una respuesta migratoria a PDGF- β , a EGF y a TGF- β 1 (*Figura 11*), lo que resulta en clave molecular de la fase de terminación, puesto que aumenta la respuesta quimioinvasiva de la célula hepática estrellada a PDGF y a bFGF. El número apropiado de células estrelladas, tras una oleada proliferativa es controlado por apoptosis. TGF- β 1 e IFN- α disminuyen la apoptosis en células estrelladas, mientras que CD95/CD95L y p53 estimulan la apoptosis, ambos fenómenos mediados por el receptor de las HSC TRAIL-2/death-5.

Para una completa regeneración, es necesaria una nueva síntesis de la matriz extracelular, llevada a cabo por HSC diferenciada transitoriamente a miofibroblastos. La reconstitución de la matriz extracelular es necesaria para la estabilización de la nueva población de células parenquimatosas y no parenquimatosas del nuevo lóbulo. La construcción final del lóbulo hepático también va a depender de las células estrelladas y miofibroblastos ductales y periductales biliares, que actúan a modo de marcapasos de la regeneración.

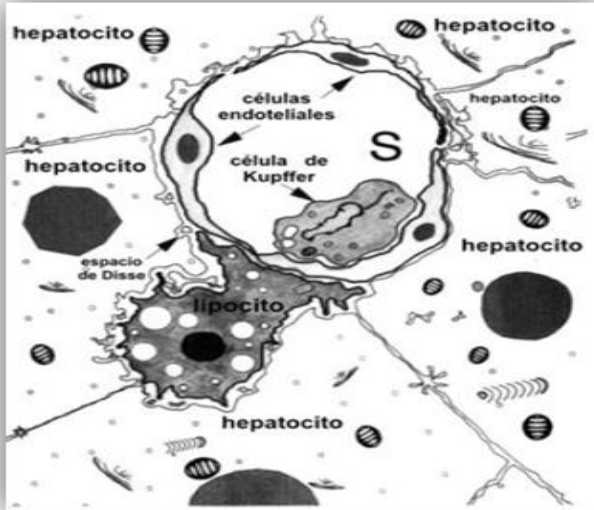


Figura 10. Modelo de sinusoides hepático. (Cortesía Cascales M.¹³¹) Se observan las células endoteliales tapizando el sinusoides, una célula de Kupffer en el sinusoides, un lipocito en el espacio Disse y los hepatocitos en íntimo contacto con el espacio de Disse

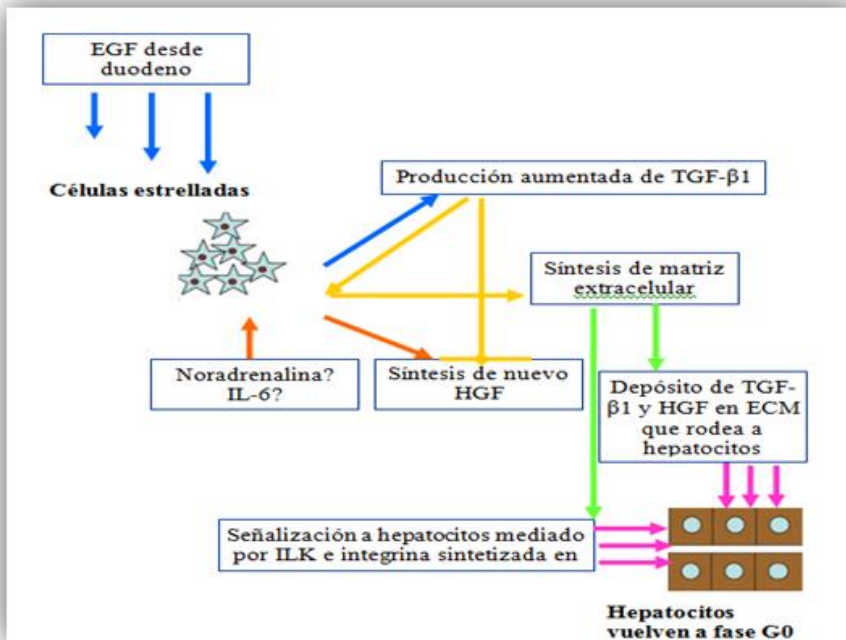


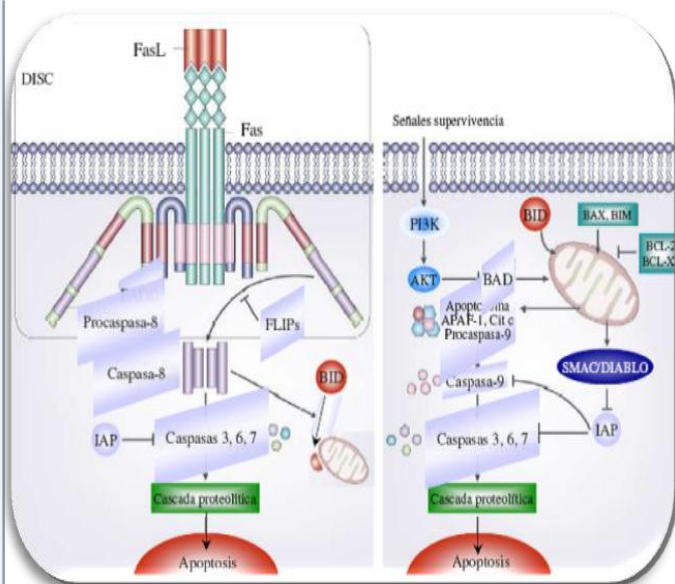
Figura 11. Feed-back mediado por citoquinas en el inicio-terminación de la regeneración hepática. TGF-β1 y la matriz extracelular controlan la fase precoz y tardía de la regeneración. Los mitógenos EGF y HGF estimulan la producción de TGF-β1 por las células estrelladas, el cual bloquea a su vez la síntesis de nuevo HGF, que se produce simultáneamente al estímulo tardío de síntesis de matriz extracelular (ECM), donde se acumulan TGF-β1 y HGF, que favorecen el retorno de los hepatocitos a fase quiescente (G0)

APOPTOSIS DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

La iniciación de la fase proliferativa de algunos hepatocitos disfuncionales por la lesión previa puede ser dificultosa o incluso

Cualquiera que sea la vía de iniciación del fenómeno apoptótico, se produce la activación de la vía de las caspasas y de señales intracelulares de la familia bcl2 [Bad, Bak, Bax]. Esto conlleva la digestión del núcleo y la destrucción del DNA celular,

Figura 12. Señalización apoptótica.
(Cortesía Cascales M.¹³¹)
La apoptosis presenta dos vías, una extrínseca, a través de receptores de muerte, o por un daño a la mitocondria, vía intrínseca. La unión de un ligando a su receptor (CD95/Fas en la imagen) lleva a la formación del DISC que activa a la caspasa 8. Un daño a la mitocondria lleva a la liberación de citocromo c al citosol donde se une a Apaf-1 y procaspasa 9 formando el apoptosoma. Ambas vías convergen en la activación de caspasas ejecutoras llevando finalmente a la muerte celular por apoptosis



imposible. Estos hepatocitos inician un fenómeno de muerte celular preprogramada conocida como apoptosis celular. El fenómeno de apoptosis *in vivo* puede ser activado por la ocupación de los receptores [death receptors] de superficie celular por sus ligandos, como son ligando-Fas, o por activación de los receptores serina-treonina-kinasa llevada a cabo por miembros de la superfamilia TGF- β , como son activina y TGF- β 1. Un fenómeno alternativo apoptótico podría ser activado de forma secundaria por la liberación mitocondrial de citocromo C tras lesión hepática inducida por drogas (Figura 12).

primariamente a través de la acción directa de caspasa 3. Durante el fenómeno regenerativo hepático, si éste es satisfactorio, la expresión y activación de las vías proapoptóticas es inhibido a través de la expresión aumentada de miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 y Bcl-XL. Numerosos factores han sido implicados en la activación de señales intracelulares antiapoptóticas. Se ha demostrado que ratas transgénicas que no expresan IL-6 o Sintetasa inducible de Óxido Nítrico presentan una expresión aumentada de señales proapoptóticas, aumentando de esta forma la muerte hepatocitaria y disminuyendo la supervivencia de estos animales²².

CRONOLOGÍA DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

En el hígado sano, tan sólo 1:1000 hepatocitos están en fase celular M o de mitosis en un momento dado⁴⁷, mientras que en fase quiescente o G₀, se encuentran el resto. Tras hepatectomía parcial, casi inmediatamente, toda la reserva de hepatocitos pasa a fase celular G₁ (Figura 13). Transcurridas 12 a 15 horas tras la

forma que si todos los pasos son similares, el período de latencia entre los mismos varía en función de la especie.

El hígado de la rata duplica su tamaño aproximadamente a las 48 horas de la hepatectomía parcial. La replicación hepatocítica desciende en intensidad hacia el 4º día tras la hepatectomía parcial. Es a partir de este momento, aunque ya presente desde las 48 horas con menor intensidad, cuando las células no parenquimatosas empiezan a

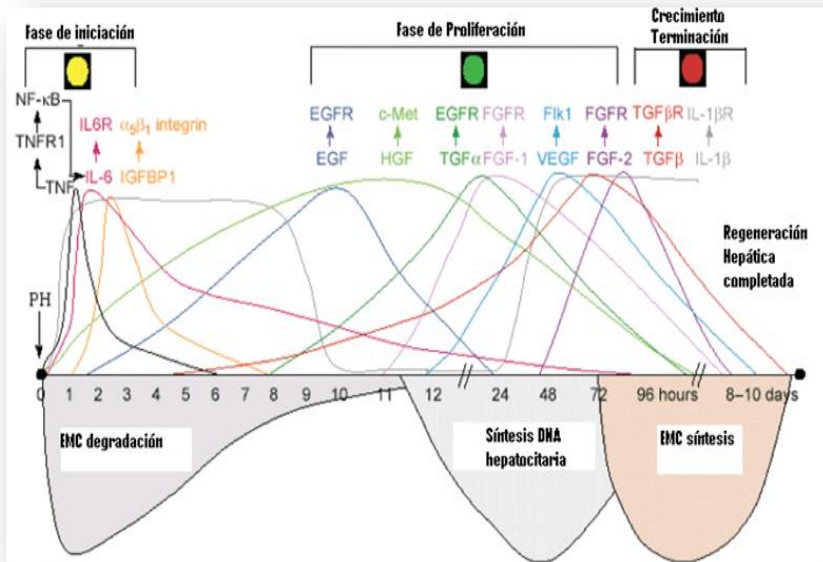


Figura 13. Resumen cronológico de la interacción molecular, celular y tisular que acontece en un hígado tras la hepatectomía.

hepatectomía parcial, la reserva de hepatocitos ha iniciado la fase S o de síntesis de ADN del ciclo celular. Veinticuatro horas tras la hepatectomía parcial los hepatocitos ya se encuentran en fase G₂ y M del ciclo celular. La mayoría de los hepatocitos se replica al menos una vez en esta fase inicial de regeneración hepática.

La cronología de este fenómeno, es dependiente de la especie animal, de tal

recrear la arquitectura lobar hepática normal (Figura 14) (invasión vascular de los hepatocitos replicados inmaduros).

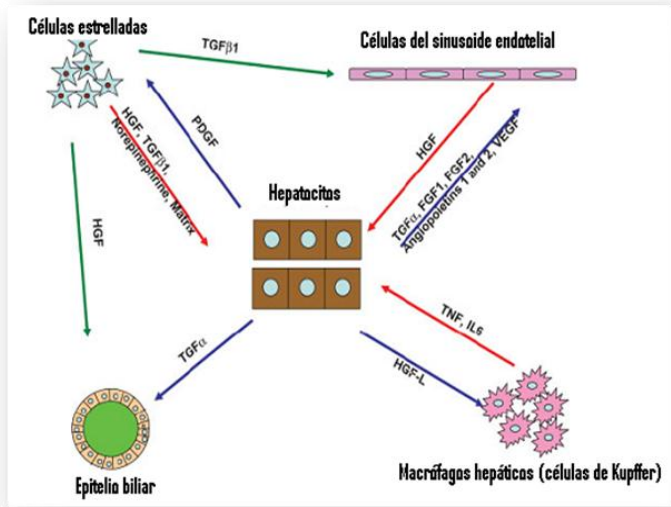


Figura 14. Interacción celular durante el fenómeno de regeneración hepática (Cortesía Fausto N.¹⁵)

La restauración de esta compleja microarquitectura funcional probablemente juegue un factor importante en la detención de la regeneración hepática. Cuando se ha alcanzado el ratio óptimo entre volumen hepático y corporal, en la rata aproximadamente a los 7 días tras la

hepatectomía parcial, el proceso de regeneración hepática se detiene de forma abrupta y los hepatocitos pasan a la fase quiescente G0 de nuevo, aunque posteriormente se produce un fenómeno de remodelación de los lóbulos hepáticos restaurados⁴⁸ (Tabla 1).

PROMOTORES E INHIBIDORES DE LA REGENERACION HEPÁTICA		
Etapas de la regeneración	Factores	Función
Iniciación	TNF-α	↑ susceptibilidad hepatocitos a facts. Crecimiento
	IL-6	↑ susceptibilidad hepatocitos a HGF
	LT-β	↑ susceptibilidad células. ovals a facts. crecimiento
	NO	↓ activ. Apoptótica de TNF-α y viacaspasa-3
	IFN-γ	Interactúa con TNF-α y LPS
Proliferación	HGF	↑ síntesis proteica y DNA---mitosis
	Insulina	↑ exposición de hepatocitos a factores de crecimiento
	TGF-α	↑ síntesis proteica y DNA---mitosis
	EGF	↑ síntesis proteica y DNA---mitosis
	HSS	Autofosforilación y restauración de EGFR
	Noradrenalina	↑ exposición de hepatocitos a factores de crecimiento
	Somatostatina	↑ exposición de hepatocitos a factores de crecimiento
Inhibición	Glucagón	↑ exposición de hepatocitos a factores de crecimiento
	TGF-β	↓ síntesis DNA contrarrestando a TGF-α

Tabla 1. Promotores e inhibidores de la regeneración hepática

B. FACTORES CONDICIONANTES EN CIRUGÍA HEPÁTICA

El desarrollo progresivo de técnicas quirúrgicas más seguras y la mejoría de los cuidados postoperatorios, ha permitido un aumento en el porcentaje de pacientes que pueden ser sometidos a resecciones hepáticas anatómicas y no anatómicas. Aun así, resecciones especialmente amplias, pueden generar fallo hepático postoperatorio. Este fallo puede ser transitorio, si el hígado residual es sano, o bien puede ser prolongado, cuando la capacidad regenerativa del hígado residual esté comprometida, de tal forma que se dispara la morbilidad y la mortalidad de estos pacientes. De hecho, la mortalidad tras el fallo hepático posthepatectomía se sitúa en torno al 60-90%.

ESTEATOSIS

La esteatosis se ha relacionado gradualmente con un mayor índice de morbimortalidad tras la resección hepática⁴⁹.

Se define como una acumulación de lípidos a nivel hepático, y múltiples son sus causas, destacando el consumo excesivo de alcohol, la obesidad, diabetes, y determinadas drogas. La influencia de la esteatosis en la morbimortalidad de la cirugía hepática puede resumirse en los siguientes puntos⁵⁰:

- aumento de la morbilidad y mortalidad postoperatoria
- aumento del número de concentrados de hematíes transfundidos durante la cirugía

- aumento del tiempo operatorio
- aumento en los niveles de AST/ALT y bilirrubina, que traduce una mayor tendencia al fallo hepático
- correlación entre grado de esteatosis, gravedad y número de complicaciones.

ISQUEMIA-REPERFUSION

La maniobra de Pringle (clampaje del pedículo hepático) junto a una presión venosa central baja mantenida son técnicas ampliamente utilizadas durante las hepatectomías extensas para conseguir una menor pérdida sanguínea durante la transección del parénquima. El proceso de desclampaje, conlleva una lesión hepática asociada por reperfusión cuando la sangre vuelve a circular por el hígado isquémico residual posthepatectomía. Esto se traduce en un aumento en la producción de radicales libres de oxígeno intrahepáticos, cambios en el pH celular, respuesta inflamatoria aumentada y vasoconstricción sinusoidal con el consiguiente descenso en la microcirculación hepática⁵¹.

La resección hepática conlleva un riesgo de morbilidad y mortalidad directamente relacionado con el volumen y función del hígado residual. La tolerancia a la isquemia-reperfusión hepática y una adecuada capacidad regenerativa posthepatectomía son cruciales para una pronta recuperación postoperatoria, tanto del volumen hepático como de la funcionalidad del mismo. De hecho, la lesión por isquemia-reperfusión es

posiblemente el principal factor causal de daño hepatocelular posthepatectomía y es más que probable que el fallo hepático postoperatorio esté relacionado con una lesión por isquemia-reperfusión acentuada, a la que contribuyen otros factores como la esteatosis o la cirrosis que suponen un sustrato celular hepatocítico previo deficiente⁵⁰.

EXTENSION DE LA HEPATECTOMIA Y DISFUNCION HEPATICA POSTOPERATORIA

En primer lugar debemos definir el concepto de disfunción hepática sin equívoco, para ello tomaremos como base la siguiente fórmula⁵²:

1. Actividad de Protrombina < 50% durante más de 3 días y
2. Bilirrubina sérica > 5mg/100ml durante más de 3 días

La disfunción hepática postoperatoria se asocia con un mayor número de complicaciones postoperatorias y una estancia hospitalaria prolongada. Se correlaciona con el volumen funcional del parénquima hepático que queda tras la resección hepática. Cuando existe enfermedad crónica hepática, quimioterapia neoadyuvante o ictericia preoperatoria, el hígado residual debe suponer al menos un 40% del volumen hepático total inicial.

Las principales variables de interés que se correlacionan con el volumen de hígado residual posthepatectomía son los niveles de bilirrubina y la actividad de Protrombina. En

pacientes sin trastorno funcional hepático, posiblemente la actividad de Protrombina se correlacione mejor que los niveles de bilirrubina.

A nivel celular, la capacidad fagocítica del sistema reticuloendotelial tras una resección mayor hepática está disminuida, lo que conlleva un mayor riesgo de infección postoperatoria. Es, por tanto, mandatorio preservar la cantidad suficiente de parénquima hepático que permita la doble capacidad del hígado, es decir la síntesis y la fagocitosis⁴⁸

ENFERMEDAD CRONICA HEPATICA (CIRROSIS)

La resección mayor hepática se limita casi exclusivamente al grado A de Child-Pugh. El hepatocarcinoma es así mismo, la primera causa de resección hepática en pacientes con enfermedad crónica hepática, puesto que la cirrosis es el principal factor de riesgo para el desarrollo de dicho tumor⁵³.

La fibrosis es la característica anatomopatológica con mayor influencia en los resultados a corto y largo plazo de la resección hepática en hígados con trastorno funcional crónico. De esta forma, la severidad de la fibrosis se correlaciona con el desarrollo de ascitis postoperatoria y con la duración del fallo hepático en el postoperatorio.

Otros factores de riesgo que deben ser reseñados son la edad >60 años y los niveles preoperatorios de AST mayor de 2 veces el

valor normal (marcador necrótico-inflamatorio).

PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

El preconditionamiento isquémico (PC) es una estrategia quirúrgica que protege los tejidos frente a la lesión por I/R. Este fenómeno fue descrito por primera vez en corazón por Murry et al. en 1986⁵⁴ y posteriormente ha demostrado ser un mecanismo eficaz en diferentes órganos como intestino, cerebro, músculo e hígado⁵⁵. El PC consiste en la aplicación de periodos cortos de isquemia reperusión antes de que el órgano sea sometido a una I/R prolongada. A nivel hepático, el estudio del PC se ha centrado principalmente en modelos de I/R normotérmica y algunos en trasplante hepático total, sin embargo no existen estudios sobre la aplicación del PC en modelo de trasplante hepático con injerto de tamaño reducido. A pesar de que se han postulado diferentes hipótesis, los mecanismos protectores por los que actúa el PC no se conocen con seguridad. La efectividad del PC en modelos experimentales de I/R hepática han sido la base para que esta estrategia quirúrgica pueda ser aplicada en la clínica para reducir la lesión de I/R asociada a las resecciones hepáticas de tumores. Pese a que todavía no se tienen datos de la aplicación del PC en el trasplante hepático en humanos, hay estudios que respaldan su posible aplicación clínica en un futuro.

EFFECTO DE LA SENESCENCIA EN EL HÍGADO

Aproximadamente entre el 10 y el 15% de la población occidental se sitúa en torno a los 65 años. Se asume que la edad facilita el inicio y/o progresión de múltiples patologías, incluidas las que afectan al hígado. No es por tanto ilógico pensar que la senescencia predispone a enfermedades hepáticas, y por tanto preguntarse por qué la población anciana es más susceptible a estas enfermedades que la población joven.

**Efecto de la edad en la respuesta adaptativa y regeneración*

El efecto principal de la edad en la célula es una disminución en su capacidad para responder a estímulos o cambios en el medio ambiente, disminuyendo así su capacidad-respuesta adaptativa.

Sawada⁵⁶ demostró una marcada disminución de la respuesta proliferativa de hepatocitos de la rata a factores de crecimiento relacionada con la edad. A pesar de que la respuesta regenerativa hepática es más lenta en ratas añosas, éstas suelen alcanzar un volumen hepático normal tras la hepatectomía.

Se postula que:

- La represión génica en animales añosos bloquea la inducción de c-myc y el proceso consecutivo de proliferación tras hepatectomía parcial.
- Expresión disminuida de Fox M1b, que se correlaciona con una actividad proliferativa

reducida de hepatocitos y fibroblastos de ratas y seres humanos añosos.

- Acortamiento progresivo de la longitud de los telómeros, hasta alcanzar una longitud mínima. De esta forma, se ha objetivado que la longitud normal de telómeros en hígados sanos a los 80 años es de 10 pares de Kilobases, sin embargo en hígados enfermos a los 80 años, la longitud de los telómeros es la considerada como límite de Hayflick para la proliferación (5-6 pares de kilobases). De esta forma, debemos reseñar como marcador pronóstico negativo de regeneración hepática en hígados enfermos la longitud corta de los telómeros⁵⁷.

****Edad, estrés oxidativo y lesión hepática***

Zhang y colaboradores demostraron en 2003, que las ratas añosas tenían una protección menos efectiva frente a los radicales libres oxidativos que las ratas más jóvenes⁵⁸.

Hamilton demuestra, además, que con el paso de los años existe una mayor sensibilidad celular y del DNA al estrés oxidativo⁵⁹.

≈ *Efecto de la edad sobre la fase I del metabolismo hepático de fármacos*

Existen 2 índices que permiten el estudio de esta fase metabólica, que se lleva a cabo en los microsomas hepáticos, y que disminuyen con el paso de los años⁵⁷:

- Contenido microsomal de citocromo P-450
- Actividad de NADPH citocromo P-450 reductasa.

Estos datos sugieren que la edad afecta negativamente a la fase I del metabolismo hepático de fármacos.

≈ *Efecto de la edad en las funciones hepatobiliares*

Son pocos los estudios que correlacionan edad y test funcionales hepáticos. Tan sólo se ha encontrado como relevante la correlación entre edad y niveles de bilirrubina sérica, indicativo de un déficit hepatobiliar.

Sánchez-Hidalgo et al⁶⁰, llevan a cabo un estudio de experimentación animal, en el que se evalúa el impacto de la edad en cada uno de los pasos del fenómeno de regeneración hepática. Los parámetros se estudiaron en dos períodos diferentes tras la resección hepática del 70% (6 y 48h). Los resultados demostraron que la mortalidad postoperatoria precoz era mayor en las ratas de más edad. Diferentes parámetros de daño hepático, tanto analíticos (ALT y AST), de inmunohistoquímica (TUNEL) así como de daño histopatológico (hematoxilina-eosina), se encontraron incrementados en los animales de mayor edad. A su vez, también se observó, una disminución del ratio GSH/GSSG (glutación reducido/glutación oxidado) y un incremento de los productos derivados del óxido nítrico, en las ratas añosas en comparación con las jóvenes. El grado de proliferación hepatocitaria, medido por la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU), el índice de regeneración hepática y el peso del tejido del volumen total regenerado fue mayor en las ratas jóvenes versus añosas.

Todo ello apunta a una disminución de la regeneración hepática en las ratas añosas en comparación con las jóvenes.

C. LA ANGIOGENESIS Y EL CRECIMIENTO TUMORAL

La formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) es un evento fundamental en el proceso de crecimiento tumoral y diseminación metastásica.

De este modo, la base molecular de la angiogénesis tumoral es un punto clave en el amplio campo de la investigación contra el cáncer⁶¹.

ROL DEL "VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR"

La angiogénesis es un proceso a través del cual se desarrollan nuevos vasos a partir de otros preexistentes como los capilares y vénulas postcapilares.

Se trata de un proceso altamente complejo y dinámico regulado por un gran número de moléculas pro-angiogénicas, antiangiogénicas y señales autocrinas y paracrinas.

El VEGF es el más importante estimulador de la angiogénesis y su expresión bajo condiciones fisiológicas normales es uno de los principales mecanismos para el desarrollo de tejido vascular normal en fenómenos como la cicatrización y desarrollo embrionario. Bajo condiciones patológicas, es secretado por las células tumorales acelerando la angiogénesis en el tumor primario y produciéndose la diseminación de las mismas en distintos sitios del organismo. Así pues, la sobreexpresión del VEGF ha sido asociada con la progresión tumoral y un

pobre pronóstico en el carcinoma colorrectal, gástrico, pancreático, cáncer de mama, pulmón y en el melanoma^{62,63,64}.

a.- Funciones del VEGF en las células endoteliales

a.1. Proliferación

El VEGF es un mitógeno fundamental para las células endoteliales. La proliferación de éstas células se lleva a cabo a través de la activación del receptor de membrana VEGFR2 vía tirosín-kinasa extracelular ErK1/2 en adición con otros miembros de la familia kinasa JNK/SAPK^{65,66}.

La actividad mitógena del VEGF también está mediada por la proteína-kinasa C, quizás en parte regulada por el NO (Tabla 2).

a.2. Permeabilidad

El VEGF es un factor de crecimiento pleiotropo que actúa desarrollando múltiples funciones mediante la estimulación de sus receptores situados en las células endoteliales. Es uno de los más potentes inductores de la permeabilidad vascular conocidos (50.000 veces más potente que la histamina).

El mecanismo preciso por el cual incrementa la permeabilidad vascular no está del todo claro.

Los trabajos de Dvorak et al⁶² han demostrado que macromoléculas cruzan el endotelio por medio de una vía celular transendotelial con la participación de organelas vesiculovasculares inducidas por VEGF.

Otros investigadores han propuesto que el VEGF induce fenestraciones endoteliales que proporciona una vía transcelular adicional para la extravasación de macromoléculas.

La evidencia más reciente sugiere que la permeabilidad inducida por el VEGF está mediada por una vía calcio dependiente en la que se encuentra involucrado el óxido nítrico (NO) y la prostaglandina PGI₂⁶⁷.

a.3. Invasión y migración

La degradación de la membrana basal es necesaria para la migración e invasión de las células endoteliales.

El VEGF induce la estimulación de una gran variedad de enzimas y proteínas esenciales en este proceso de degradación, como las metaloproteinasas (que degradan la matriz celular) y serín-proteasas (urokinasa activador del plasminógeno uPA y activador del plasminógeno tisular TTPA).

Asimismo, el NO ha sido implicado en esta fase, jugando un role importante en la migración de las células endoteliales mediante un fenómeno de podokinesis y regulación de la integridad de adhesión focal.

a.4. Activación de la célula endotelial y supervivencia

El VEGF ejerce diferentes efectos en el endotelio vascular y en las células endoteliales. Estos efectos incluyen cambios en la morfología celular, alteraciones en el citoesqueleto y estimulación, crecimiento y migración de las células endoteliales.

Por otro lado es capaz de incrementar la expresión de una gran variedad de genes de las células endoteliales, incluyendo el factor procoagulante tisular, proteínas fibrinolíticas como el activador del plasminógeno tisular, transportadores de glucosa (GLUT-1), integrinas, óxido nítrico sintetasa y varios mitógenos más.

Por otro lado, el VEGF, tanto in vivo como in vitro, mantiene las señales de supervivencia de la célula endotelial inhibiendo la apoptosis mediante la activación de la vía PI3K-Akt.

b.- Reguladores de la expresión del VEGF y sus receptores

b.1 Hipoxia

Se ha demostrado que la hipoxia posee un papel fundamental en la regulación de la expresión del RNAm VEGF. El factor inducible por hipoxia (HIF-1) es la llave que regula dicha respuesta. Bajo condiciones de hipoxia el HIF-1 α dimeriza con HIF-1 β y éste complejo se transloca al núcleo y se une al promotor del VEGF dando lugar al incremento de su transcripción⁶⁸.

b.2. Citoquinas y factores de crecimiento

Diversos estudios han demostrado que factores de crecimiento y citoquinas pueden regular la expresión del factor angiogénico en líneas de células tumorales e inducir la angiogénesis indirectamente.

La importancia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; ErbB1) y del sistema HER-2/neu (Erb2) en la regulación

FACTORES PRO-ANGIOGENICOS	FACTORES ANTIANGIOGENICOS
VEGF (vascular endothelial growth factor)	Trombospondina
FGF-2 (basic fibroblast growth factor)	Angiostatina
Factor de crecimiento derivado plaquetas	Endostatina
Factor de crecimiento derivado Insulina	Interferón α y β
EGF (epidermal growth factor)	Interleukina 12
Interleukina 1,4,6,8,15	Captopril
Integrinas vasculares	Factor plaquetario 4
Fibronectina	Anticuerpos antiVEGF e inhibidores receptor tirosin-Kinasa VEGF
TNF α (tumor necrosis factor α)	TNF α (in vitro)
Endotoxina (lipopolisacárido)	Dexametasona
Metaloproteinasas matriz celular	Indometacina
Prostaglandinas E ₁ , E ₂	Diclofenaco
NO (óxido nítrico)	Tamoxifeno

Tabla 2. Principales sustancias proangiogénicas y antiangiogénicas

del VEGF ha sido validada en distintos tipos tumorales incluyendo el cáncer de colon.

El receptor del factor de crecimiento “insulin-like” (IGF-IR) es a menudo sobreexpresado en muchos tumores humanos asociándose con el grado de agresividad y formación de metástasis⁶⁹.

El factor de crecimiento del hepatocito (HGF) puede inducir la expresión del VEGF en células normales y tumorales a través de la activación de c-MET.

La familia de los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGFs) modula la angiogénesis in vivo por la regulación de la supervivencia de las células endoteliales y el reclutamiento de células del músculo liso vascular, pericitos y fibroblastos estromales.

Las prostaglandinas juegan un papel crítico en numerosos procesos biológicos y recientemente han sido implicadas en la angiogénesis tumoral regulando la expresión del VEGF. La prostaglandina endoperoxidasa, también conocida como ciclooxigenasa (COX), está involucrada en la transformación oxidativa del ácido araquidónico. En la década pasada, numerosos estudios confirmaron la asociación entre la sobreexpresión de COX-2 y progresión tumoral y el incremento de la angiogénesis (expresión del VEGF) en tumores malignos sólidos como el de colon. Estudios in vivo han demostrado que COX-2 media la expresión del VEGF en distintas líneas celulares^{70,71}.

IMPORTANCIA DE LA ANGIOGENESIS EN LA TERAPIA CONTRA EL CANCER

La angiogénesis es un proceso fisiológico sujeto a una regulación autocrina y paracrina que tiene a su vez el potencial para transformarse en anormal y formar parte de un gran número de procesos patológicos entre los que se encuentra el cáncer.

La densidad de la microvasculatura ha sido usada como un indicador de agresividad biológica y potencial metastásico en diversos tumores sólidos, como el de mama, próstata y colorrectal⁶⁹.

El desarrollo de agentes antiangiogénicos ofrece nuevas estrategias para el control del crecimiento del tumor primario y su potencial metastásico^{70,71}.

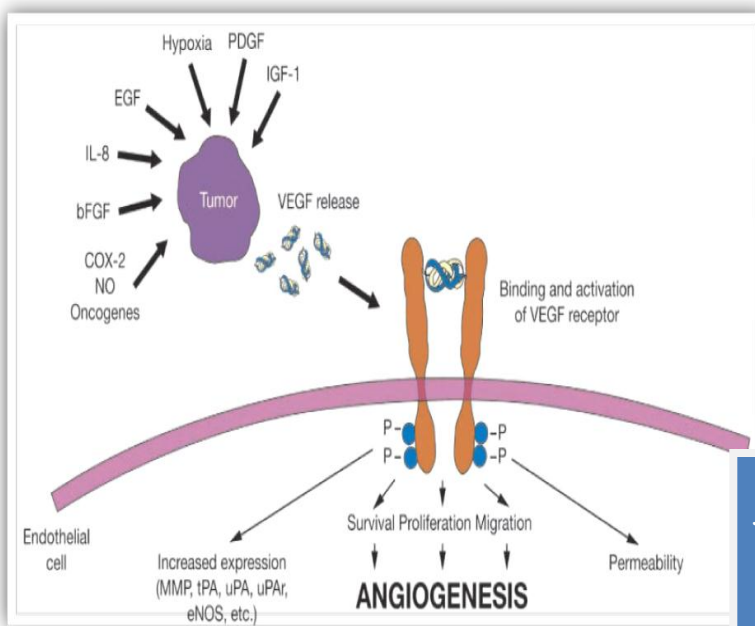


Figura 15. Modelo de las funciones del VEGF en la célula endotelial y angiogénesis tumoral (Cortesía Taberero J. ⁷¹)

El papel de la angiogénesis en el crecimiento del tumor primario y la diseminación metastásica es conocido desde hace muchos años, y los mecanismos exactos mediante los cuales actúa son necesarios para el entendimiento de la biología tumoral (Figura 15).

El crecimiento de un tumor más de 2-3mm³ requiere el desarrollo de nuevos microvasos para facilitar el aporte de nutrientes y oxígeno y la eliminación de los catabolitos.

a.- Cirugía y angiogénesis

Tanto la experiencia clínica como la evidencia experimental apoyan el concepto de que el lecho de cicatrización de una herida es un sitio privilegiado para el desarrollo de micrometástasis^{72,73,74}.

Las citoquinas que se producen en las primeras 24horas tras un trauma quirúrgico, contribuyen al proceso de cicatrización en las siguientes tres semanas. Se ha demostrado que cuando las células tumorales alcanzan la

zona de anastomosis colónica o la cicatriz de una laparotomía dentro de las 2h primeras de cicatrización, la probabilidad de que una célula tumoral conduzca a una metástasis se incrementa unas 1000 veces más comparado con el tejido normal.

La cirugía y la posterior cicatrización promueven el clima proangiogénico con aumento de la secreción de VEGF por parte de los macrófagos permitiendo el crecimiento y la circulación de células tumorales latentes. Por otro lado, el tumor primario segrega a la circulación factores inhibidores de la angiogénesis como la angiostatina y endostatina que actúan específicamente regulando la proliferación de las células endoteliales. Dentro de los primeros cinco días tras la resección del tumor primario, los niveles de dichas sustancias disminuyen y es posible un aumento de la angiogénesis dentro de los focos de micrometástasis latentes⁷⁴.

b.- Oportunidades terapéuticas

El crecimiento tumoral está asociado con el incremento de la presión intersticial que produce compresión vascular y necrosis central debido a la ausencia de un adecuado drenaje linfático.

La terapia antiangiogénica, reduce esta presión intersticial permitiendo así la actuación de agentes quimioterápicos en el tumor y manteniendo los nidos de células tumorales en estado latente.

Los antiangiogénicos actúan de forma directa, mediante la inhibición de la proliferación de las células endoteliales, o

bien indirectamente modificando el microambiente necesario para la producción de citoquinas que actúan en la neoformación de microvasos.

Las inhibición de la proliferación de las células endoteliales, reduce la producción de factores crecimiento, alteración de la vascularización y por lo tanto aumento de la tasa de apoptosis y finalmente reducción tumoral.

La mayor parte de los agentes antiangiogénicos identificados actualmente, pertenecen el grupo de los antiangiogénicos indirectos y su combinación con otros quimioterápicos o radioterapia se ha demostrado que es más efectiva que la monoterapia porque permite una mejor distribución de éstos últimos en los “compartimentos vasculares” del tumor⁷⁵.

D. TERAPIA SISTEMICA Y METASTASIS HEPATICAS DE CANCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los tumores malignos más frecuentes y supone la segunda causa de muerte en Europa y América del Norte. Dependiendo del estadio del tumor primario, las metástasis hepáticas ocurren entre un 20% a un 70% de los pacientes y representa la mayor causa de muerte en esta enfermedad.

Durante más de tres décadas, las opciones terapéuticas para los pacientes con CCR se ha basado casi exclusivamente en el 5-fluorouracilo (5-FU).

La aparición de nuevos agentes citotóxicos y biológicos, ha mejorado de forma considerable las tasas de respuesta y la supervivencia en pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal.

Aunque existe una clara evidencia de que la terapia sistémica de primera línea mejora el control de la enfermedad, la supervivencia y la calidad de vida, el resultado general de los tratamientos ha sido insatisfactorio.

La necesidad del progreso terapéutico ha llevado al desarrollo de nuevos agentes citotóxicos activos, incluyendo el irinotecán, oxaliplatino, las fluoropirimidinas y los inhibidores directos de la enzima timidilato sintetasa (TS).

A su vez, con la mejora del entendimiento de la biología de la célula tumoral, han surgido nuevas terapias moleculares dirigidas contra el VEGF como el bevacizumab, y el EGFR como el cetuximab y panitumumab⁷⁶.

La mejora de la actividad observada con estos regímenes de poliquimioterapia combinada con la resección hepática, puede explicar el incremento de las tasas de supervivencia en series recientes de casi un 65% a los cinco años⁷⁷. El número de candidatos para la hepatectomía de metástasis irresecables también ha aumentado de forma considerable.

El bevacizumab, derivado de un anticuerpo monoclonal recombinante murino que se une y neutraliza el VEGF, ha sido rápidamente incorporado en la rutina de tratamiento quimioterápico de los pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal.

Hurwitz et al⁷⁸ han demostrado que la adición de este anticuerpo monoclonal con irinotecan, leucovorín (LV) y 5-FU (FOLFIRI) aumenta la supervivencia media de 15.6 meses hasta 20.3 meses en pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Asimismo se ha comprobado que la adición de bevacizumab a un régimen de 5-FU, LV y oxaliplatino (FOLFOX) mejora significativamente la supervivencia en pacientes previamente tratados con irinotecan 5-FU y LV⁷⁹.

Estos resultados han generado gran entusiasmo incluyendo el bevacizumab en regímenes de quimioterapia como tratamiento neoadyuvante para metástasis hepáticas tanto resecables como irresecables, aunque los estudios randomizados sobre el uso de este agente biológico en el tratamiento de la enfermedad metastásica resecable son escasos.

Existen importantes ventajas teóricas hacia una aproximación a la neoadyuvancia en el tratamiento de la metástasis del cáncer colorrectal.

En primer lugar, una dosis alta de quimioterapia se puede administrar antes del potencial debilitamiento que causa la cirugía y que podría disminuir la tolerancia de la quimioterapia cuando las micrometástasis son más pequeñas. En segundo lugar permite que tanto los radiólogos como los patólogos puedan seleccionar un régimen de quimioterapia adecuado y eficaz para el enfermo. Tercero, reduce la carga tumoral y permite una resección completa con los

márgenes negativos.

Todo esto es apoyado por un reciente estudio prospectivo aleatorizado llevado a cabo por la “European Organisation for Research and Treatment of Cancer Intergroup” (EORTC 40983 en fase III)⁷⁹ el cual sostiene que el uso combinado de 5-FU y oxaliplatino tres meses antes y después de la cirugía de resección mejora el periodo libre de enfermedad en comparación con la cirugía sola. El aspecto negativo de los tratamientos perioperatorios son las posibilidades de mayores complicaciones con la resección hepática.

Agentes citotóxicos como las fluoropirimidinas, irinotecán y oxaliplatino, pueden causar esteatohepatitis y otras alteraciones en el hígado, que pueden dificultar la resección hepática y aumentar las complicaciones.

Los agentes biológicos pueden presentar también toxicidad específica interfiriendo en la resección hepática. En los estudios actuales en los que se incluye el bevacizumab como régimen de poliquimioterapia se ha observado un aumento de la incidencia de sangrado de herida quirúrgica, hipertensión, y perforación gastrointestinal. Además en modelos animales, la inhibición de la angiogénesis, afecta a la cicatrización de la herida quirúrgica y se ha sugerido que la inhibición de los receptores de VEGF en las células endoteliales puede interferir en la regeneración hepática⁸⁰.

La prolongada vida media de estos anticuerpos hace que sea recomendable el

retraso en la cirugía electiva de al menos unas seis semanas tras la finalización del tratamiento con bevacizumab y antes de la reinstauración del mismo tras cirugía hepática, aunque aún continúa habiendo poca evidencia.

E. EVIDENCIA DEL USO DE ANTIANGIOGENICOS COMO AGENTES QUIMIOTERICOS EN LAS METASTASIS HEPATICAS DE ORIGEN COLORRECTAL

Los pacientes con cáncer colorrectal y metástasis hepáticas tienen un pobre pronóstico, pero pueden beneficiarse de quimioterapia perioperatoria y resección de la enfermedad. El uso de agentes antiangiogénicos como el Bevacizumab (BV) juegan un rol importante en la mejora de los resultados de dichos pacientes, sin embargo su impacto en las complicaciones de la cirugía y la regeneración hepática están aún por determinar.

El nivel de angiogénesis en los tumores colorrectales ha demostrado ser determinante en la supervivencia. Estudios recientes han demostrado que, tanto en primera como en segunda línea de quimioterapia, la adición de anticuerpos dirigidos contra el VEGF mejora la supervivencia comparada con la quimioterapia sola^{78,79}.

En un estudio randomizado fase II llevado a cabo por Kabbnavar et al⁸¹, los pacientes con cáncer colorrectal metastásico que recibieron BV (5mg/kg i.v.) más 5-FU y LV

presentaron una alta tasa de respuesta (40% vs 17%), mayor tiempo libre de enfermedad (9.0 meses vs 5.3 meses) y una mediana de supervivencia más alta con respecto al grupo que recibió quimioterapia sin antiangiogénico (21.5 meses vs 13.8 meses). Los principales problemas encontrados al asociar BV con LV y 5-FU fueron la hipertensión y la trombosis que se manejaron con tratamiento médico.

Otro estudio en fase II indicó que la combinación de BV con irinotecán y 5-FU era segura y efectiva.

Basado en estos dos estudios, Genentech, una de las principales empresas de biotecnología del mundo (EEUU), inició un estudio en fase III para probar la adición de BV a los agentes citotóxicos 5-FU e irinotecán en pacientes no tratados previamente con enfermedad metastásica. En este estudio se observó un marcado aumento del tiempo de supervivencia asociado a la combinación de BV (20.3 meses vs 15.6 meses) con una diferencia estadísticamente significativa⁸². El otro brazo del estudio demostró la seguridad del régimen combinado y la mayor tasa de respuesta en comparación con el grupo que recibió 5-FU e irinotecán.

Este estudio proporcionó la primera prueba sobre el beneficio terapéutico de los antiangiogénicos.

El Grupo “Eastern Cooperative Oncology”, llevó a cabo un estudio randomizado (E3200) asociando el BV al oxaliplatino y 5-FU versus el mismo régimen sin el antiangiogénico.

Los resultados del estudio (800 pacientes), fueron presentados en 2005 (Reunión de la Sociedad Americana de Oncología Clínica, ASCO) y demostró un mayor tiempo de supervivencia (12.5 meses vs 10.7 meses, $p=0.0024$), tiempo libre de enfermedad y mayor tasa de respuesta con la adición del BV⁷⁹.

A posteriori en el año 2008, se publicaron los resultados del estudio BRIT⁸³ (“Bevacizumab Regimens: Investigation of Treatment Effects and Safety”), un estudio observacional y prospectivo en el que participaron 1445 pacientes no tratados previamente y en los que se observó progresión de la enfermedad documentada mediante pruebas de imagen y criterios clínicos. Los pacientes fueron clasificados en tres grupos: los que no reciben tratamiento ($n=253$), los que reciben tratamiento pero sin BV ($n=531$) y los que reciben BV ($n=642$). Los resultados de este estudio prospectivo sugieren que el tratamiento con BV más allá de la inicial progresión de la enfermedad, juega un papel importante en la supervivencia global de los pacientes que padecen metástasis hepáticas de cáncer colorrectal.

Estos resultados se siguieron de un gran número de interpretaciones.

Primero, el beneficio del tratamiento con BV es expresado en combinación con otros agentes citotóxicos, una conclusión fuertemente apoyada por los resultados obtenidos en el cáncer de mama y de pulmón⁸¹ (no el de células pequeñas).

Segundo, al menos, en el cáncer de colon, la quimioterapia asociada al BV es superior a la terapia sólo con el antiangiogénico. Tercero, el beneficio del anticuerpo no debe estar restringido a la primera línea de tratamiento de la enfermedad⁸⁴.

Finalmente destacar, que los resultados obtenidos en los distintos estudios debe ser usados de forma lógica, y la combinación del BV con el oxaliplatino y 5-FU como primera línea de tratamiento en el cáncer de colon, es una estrategia ya adoptada por la mayor parte de oncólogos.

Sin embargo, son muchas las comunidades científicas que están esperando la confirmación de la evidencia y la evaluación de la combinación del bevacizumab con los regímenes de quimioterapia mejor tolerados.

F. CONTROVERSIAS DE LA INFLUENCIA DEL BEVACIZUMAB COMO TERAPIA NEOADYUVANTE EN LA REGENERACION HEPATICA TRAS CIRUGIA DE RESECCION

En los últimos 10 años, se ha observado una mejora en la supervivencia de los pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal, directamente relacionada con la adición de nuevos agentes terapéuticos activos y a una extensión de los criterios de resección quirúrgica.

La combinación del BV como anticuerpo monoclonal específico del VEGF, a otros agentes citotóxicos, ha mejorado las tasas de respuesta, y ciertamente es posible que haya

aumentado la tasa de resección.

Sin embargo existen numerosos puntos no aclarados acerca del uso del BV:

1. Aún se desconoce con exactitud si el efecto del anticuerpo sobre el tumor se basa en una actuación directa en la cascada de la angiogénesis o por una normalización de la microvascularización del tumor que facilita la actuación de otros agentes citotóxicos, aunque probablemente sea por ambas.

2. Por otro lado se desconoce cuál debe ser el régimen de neoadyuvancia óptimo, y el intervalo libre necesario entre el cese de la última dosis de bevacizumab antes de la realización de la hepatectomía.

3. Asimismo desconocemos cuáles son los efectos tóxicos de este agente biológico sobre la regeneración hepática cuando se llevan a cabo extensas hepatectomías: qué dosis se debe recomendar en función de la amplitud de la cirugía resectiva.

4. Es posible que la adición del bevacizumab a regímenes de poliquimioterapia tenga un efecto beneficioso ya que reduce así la dosis de quimioterapia adyuvante necesaria para la obtención de una respuesta óptima, aunque aún esto está por determinar. Contrariamente esta adición puede añadir efectos adversos no conocidos.

Son necesarios por tanto la realización de estudios que evalúen la duración óptima de estos agentes antiangiogénicos, el cese de los mismos antes de la cirugía, y si es necesario modificar las dosis en función de la extensión de la hepatectomía. Las actuales recomendaciones acerca del uso del BV,

están basadas en la extrapolación de los conocimientos ya existentes sobre la farmacocinética y farmacodinamia del anticuerpo monoclonal^{85,86,87}.

Por otro lado, un conocimiento adecuado del fenómeno de regeneración hepática en el hígado de sujetos que han recibido quimioterapia neoadyuvante es fundamental para establecer y manipular los límites biológicos de las resecciones hepáticas necesarias para el tratamiento de tumores primarios hepáticos y de metástasis que asienten sobre dicho órgano.

JUSTIFICACION

II.- JUSTIFICACION

En la patogénesis del cáncer, el VEGF tiene una serie de funciones claves.

La estimulación excesiva de este factor de crecimiento endotelial, permite que el tumor se “embarque” en su fase de crecimiento exponencial. La vascularización aporta una ruta hematógica exitosa para la diseminación de micrometástasis y el establecimiento de las mismas en su destino final.

La importancia crítica del VEGF durante la tumorigénesis ha sido ilustrada por numerosas observaciones: la expresión del VEGF está incrementada en los tejidos y en la circulación de muchos tumores sólidos; se ha encontrado una significativa correlación entre los niveles en plasma de dicho factor de crecimiento y el estadio tumoral; experimentos preclínicos han demostrado que los anticuerpos antiVEGF inhiben el crecimiento de células tumorales humanas que han sido previamente implantadas en modelos de experimentación animal.

Dado el papel tan importante que presenta el VEGF, no es sorprendente que se hayan llevado a cabo numerosos esfuerzos para desarrollar agentes que bloqueen sus efectos. El más conocido y estudiado de éstos es el bevacizumab.

El primer estudio en fase I sobre el BV comenzó en el año 1997⁸⁸ y son muchos los que se han realizado desde entonces en cuanto a su eficacia y seguridad.

En la actualidad son aún las numerosas cuestiones que existen acerca de este anticuerpo monoclonal y sus efectos: cuál es

la mejor dosis y la duración más apropiada y si ésta se modifica en función del tipo de cirugía, qué pacientes obtienen mayor beneficio, y sobre todo si se ve mermada la regeneración hepática en pacientes que han recibido BV como neoadyuvancia de su enfermedad.

Por tanto, la finalidad de este proyecto es llevar a cabo un estudio experimental en el que, con numerosas determinaciones sobre volumetría hepática, microscopía óptica, histología y de biología molecular, trataremos de establecer las diferencias que el antiangiogénico genera en cada uno de los pasos del fenómeno de regeneración hepática tras resección mayor hepática, de tal forma que tras conocer los resultados podamos ampliar o bien limitar las indicaciones de su uso y valorar si son extrapolables a la práctica clínica diaria.

III.- HIPOTESIS

La restauración de la arquitectura normal hepática ocurre generalmente tras la eliminación del factor o factores lesionales que generan el daño hepático. Así mismo, ante la presencia continuada de dichos factores, puede alterarse el proceso normal de replicación del hepatocito y aparecer fenómenos de fibrosis, anomalías vasculares y cirrosis o cáncer.

Existe evidencia científica que sugiere que el proceso de regeneración hepática varía dependiendo del tipo de agresión que sufre el hígado.

En nuestro modelo experimental de hepatectomía, el proceso de regeneración hepática acontece sobre un hígado residual que ha sido sometido a la actuación de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor de crecimiento del endotelio vascular, necesario para la adecuada replicación del hepatocito.

La adición de BV junto con otros agentes citotóxicos en las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal, como se ha demostrado en distintos estudios, mejora las tasas de respuesta y es posible que pueda incrementar la tasa de resección hepática en pacientes previamente irresecables debido a la extensión de su enfermedad. Sin embargo, esto hace que nos planteemos algunas cuestiones acerca de los efectos que estas terapias biológicas dirigidas presentan, con o sin otros agentes quimioterápicos, en la cicatrización de las heridas y sobre todo en el fenómeno de regeneración hepática en

pacientes que son sometidos a cirugía de resección tras recibir terapia neoadyuvante.

Estudios preclínicos han demostrado que la inhibición de la angiogénesis puede inhibir la correcta cicatrización de las heridas^{63,88,89}.

Interesantemente, no se han publicado estudios que analicen el efecto del bevacizumab en la regeneración hepática. Una de las razones por las que no se han llevado a cabo en modelos de experimentación animal es porque es posible que el BV no reconozca la forma murina del VEGF. Los escasos estudios^{80,90,91} publicados hasta ahora, utilizan anticuerpos monoclonales que actúan específicamente en el receptor VEGFR-2 del animal. En el estudio llevado a cabo por Van Buren et al⁹¹ se compara el efecto producido por la terapia antiVEGF y antiEGF (factor de crecimiento epidérmico) sobre la regeneración hepática tras la realización de una hepatectomía parcial en un modelo murino. Como resultado se observó cierta alteración de la regeneración hepática con la terapia antiVEGF en comparación con la antiEGF.

Con este proyecto trataremos de determinar la influencia del BV en el proceso regenerativo hepático no sólo de forma global, sino también en cada uno de sus pasos, desde la iniciación hasta la remodelación hepática.

El conocimiento científico actual orienta la respuesta, pero no queda aclarado en forma de trabajo global, ¿Cuáles son los límites biológicos de la cirugía hepática en el paciente que recibe terapia neoadyuvante con

BV? ¿ cuál es la mejor dosis y la duración más apropiada? ¿qué intervalo de tiempo hay que dejar entre la administración del anticuerpo y la cirugía? ¿ debemos conformarnos con la respuesta.” es probable que afecte a la regeneración”?

Pasamos a definir ahora la hipótesis global del experimento que acometemos:

1. *Hipótesis nula (H_0): la terapia antiangiogénica con Bevacizumab no influye de forma significativa en el fenómeno de regeneración hepática.*
2. *Hipótesis alternativa (H_1): la terapia antiangiogénica con Bevacizumab influye negativamente y de forma estadísticamente significativa en el fenómeno de regeneración hepática.*
3. *Hipótesis alternativa (H_2): la terapia antiangiogénica con Bevacizumab influye positivamente y de forma estadísticamente significativa en el fenómeno de regeneración hepática.*

IV.- OBJETIVOS

El objetivo principal del presente estudio de tesis doctoral fue:

Caracterizar el efecto de la administración de Bevacizumab en la regeneración hepática en un modelo de experimentación animal in vivo.

Los objetivos secundarios del presente estudio de tesis doctoral fueron:

- 1. Caracterizar los cambios morfométricos de la regeneración hepática en el hígado sometido a la influencia de terapia antiangiogénica.**
- 2. Estudiar el ciclo celular de los hepatocitos tras una resección hepática previa administración de Bevacizumab.**
- 3. Estudiar la evolución de factores titulares en el fenómeno de regeneración hepática bajo la influencia del anticuerpo monoclonal.**
- 4. Caracterizar el estrés oxidativo y el proceso catabólico celular (ATP) durante el fenómeno de regeneración.**

V.- METODOLOGIA

a.- Animales de experimentación

Para la realización de este proyecto se requieren ratas Wistar con las siguientes características:

-Peso aproximado entre 210gr-300gr

-Jóvenes: edad entre 5-9 meses

La elección de este animal se basa en que el ratón y la rata son los dos modelos in vivo más utilizados en el estudio de la regeneración hepática tras hepatectomía parcial, debido a:

-Pequeño tamaño

-Disponibilidad de razas seleccionadas manipuladas genéticamente

-Posibilidad de realizar hepatectomías controladas que remedan las que se realizan en el ser humano

-Bajo coste de mantenimiento

La anatomía del hígado de la rata está perfectamente definida: consta de 6 segmentos y 6 sectores agrupados en 4 lóbulos principales y 8 secundarios: el lóbulo lateral izquierdo, el lóbulo lateral derecho (superior e inferior), el lóbulo medio (derecho e izquierdo) y el lóbulo caudado (superior e inferior). Una descripción más exhaustiva de la anatomía hepática de la rata y un esquema de los lóbulos, segmentos y sectores se representan en un capítulo posterior, así como los porcentajes de masa hepática de cada uno de ellos. La oclusión o resección de los lóbulos medio y lateral izquierdo (hígado superior) afecta al 65%-

75%. Los estudios a realizar siguen las normas éticas para animales de experimentación según el Real Decreto 223/1998 sobre Protección de los Animales utilizados para la Experimentación y otros Fines Científicos.

Las ratas fueron mantenidas en jaulas de alojamiento individual en condiciones idénticas de temperatura (21-25°), con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y alimentadas con pienso esterilizado estándar con energía metabolizable de 2375 calorías/kg. La anestesia se llevó a cabo vía inhalatoria mediante un compuesto formado por O₂ (flujo 5l/min) y sevoflurane (flujo 3l/min). Todo ello, según los criterios estandarizados reflejados en la literatura para el estudio de regeneración hepática.

b.- Estandarización del procedimiento experimental

La incidencia de la regeneración hepática debe ser diseñada bajo condiciones experimentales estandarizadas, porque la duración de la fase inicial (estado prerreplicativo), la intensidad y el momento de inicio de la síntesis máxima de ADN y el momento de comienzo de la mitosis que conllevan la inducción de la regeneración hepática varía con la especie animal empleada, la edad, status nutricional y ritmo circadiano de los animales⁹². A causa del ritmo circadiano de la regeneración hepática, ésta debe ser iniciada en un momento estandarizado del día. Si la regeneración es

quirúrgicamente inducida, tanto el régimen anestésico como el analgésico postoperatorio además de ser estandarizados, deben también ser tenidos en cuenta su interacción con el proceso de regeneración en sí. Es preciso evitar drogas como el halotano o el tramadol, por su metabolismo hepático. También deben ser constantes la temperatura corporal durante y tras la intervención quirúrgica.

Los grupos control con operaciones simuladas deben ser siempre incluidos en todos los estudios puesto que el estrés quirúrgico, la manipulación del hígado e incluso la anestesia y drogo-farmacoterapia, pueden iniciar el fenómeno de síntesis de DNA⁹³.

La regeneración hepática puede ser cuantificada:

- Volumen de masa hepática
- Inmunohistoquímica Índice Mitótico: Bromo-desoxy-uridine test (BrdU)
- Radioactividad: hepatocitos marcados con H³

c.- Procedimiento quirúrgico

c.1. Tiempo anestésico (Figura 16)

Para el tiempo anestésico se empleó un sistema vaporizador de isoflurano (Sigma Delta, UNO) con una concentración entre 1,5 y 3% y un flujo de oxígeno de 0,5 L/min.

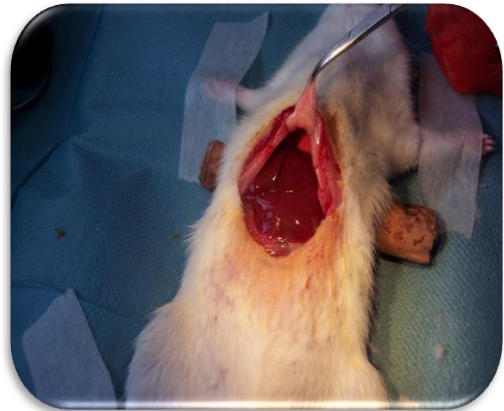


Figura 16. Inducción anestésica y preparación del campo quirúrgico

c.2. Técnica quirúrgica: hepatectomía del 70%

Este tipo de hepatectomía parcial se realizó según los principios de la técnica macroquirúrgica de **Higgins** y **Anderson**⁹⁴, a los que se le unen una serie de modificaciones propias de la microcirugía, que otorgan al procedimiento mayor eficacia y seguridad. Se trata de una trisectorectomía (sectores 4, 5 y 6)⁹⁵. Para ello, han de ser extirpados el lóbulo lateral izquierdo, el lóbulo medio izquierdo y el lóbulo medio derecho, que conforman conjuntamente el hígado superior de la rata Wistar (*Figura 17*).

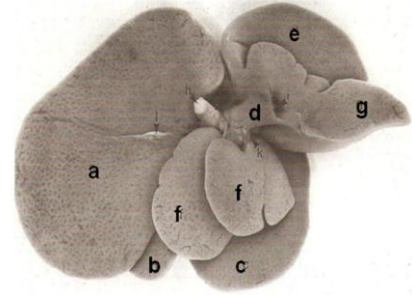
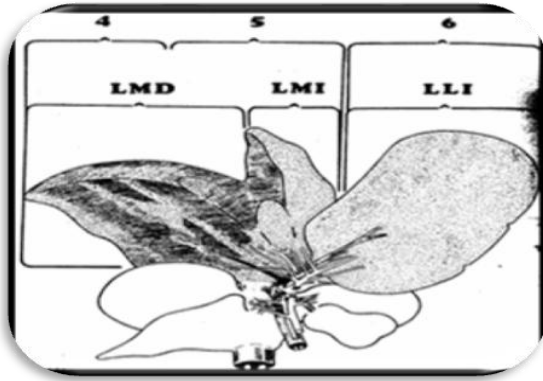


Figura 17. Anatomía del hígado de la rata.

Trisectomía (sectores 4, 5 y 6) (hígado superior) sobre esquema anatómico a la izquierda. (Cortesía Hebel R.⁹⁶)

Hígado disecado ex vivo a la derecha (Cortesía Lorente L⁹⁵)

Hígado superior: LLI (lóbulo lateral izquierdo) (a), LMI (lóbulo medio izquierdo) (b), LMD (lóbulo medio derecho) (c).

Hígado inferior: d: parte supraportal del lóbulo medio, e: lóbulo derecho, f: proceso papilar, g: proceso caudado

Esta técnica consta de 3 tiempos quirúrgicos. El primero es la movilización y liberación del hígado superior, posteriormente se lleva cabo el tiempo hiliar y por último el tiempo venoso.

≈ **Primer tiempo o tiempo de liberación y movilización del hígado superior**

Para conseguir dicha movilización son necesarios la sección del ligamento falciforme, del ligamento que une el lóbulo lateral izquierdo y el lóbulo caudado superior y el ligamento posterior hepático, izquierdo y derecho (Figura 18).

≈ **Segundo tiempo o tiempo hiliar**

Consta de la sección entre ligaduras al microscopio del hilio biliar, arterial y portal del hígado superior. Para ello, la vía biliar hiliar se debe ligar entre la rama que drena el lóbulo caudado y la correspondiente al lóbulo medio. La ligadura de la arteria destinada al hígado superior se sigue de la ligadura de la arteria hepática accesoria. Por último se liga la rama portal hiliar del hígado superior (Figura 19).

≈ **Tercer tiempo o tiempo venoso**

Finalizado el tiempo hiliar, se reclina el lóbulo medio hacia la línea media, permitiendo esta maniobra la exposición de la vena cava inferior intrahepática y de la

vena cava inferior suprahepática. También se aprecian la vena hepática derecha y la vena hepática media que desembocan en la anteriormente mencionada vena cava inferior suprahepática. Primero ha de seccionarse entre ligaduras la vena hepática derecha, lo cual expone con mayor facilidad a su vez la vena hepática media. La vena hepática derecha también se puede disecar desde la cara inferior del lóbulo medio derecho, ya que por disección roma es posible separar el parénquima hepático que cubre a esta vena en el trayecto vecino a la vena cava inferior intrahepática. Por esta vía la citada vena es seccionada entre ligaduras. La vena hepática media puede drenar en la vena cava, en cuyo caso se disecciona y se liga. Sin embargo, la cercanía de su drenaje con la vena hepática izquierda, permite que ambas sean ligadas “en bloque” sin que produzca la ligadura estenosis de la vena cava inferior suprahepática. Si se decide la ligadura y sección individualizada de la vena hepática central o media, a continuación se liga y secciona la vena hepática izquierda. Esta vena drena el lóbulo lateral izquierdo y el lóbulo medio izquierdo. Su disección se realiza desplazando el lóbulo medio y el lóbulo lateral izquierdo hacia la derecha del animal (*Figura 20*).

Por último, es seccionada entre ligaduras evitando la acodadura de la vena cava. Si la vena hepática media drena en la vena hepática izquierda, entonces los sectores 5 y 6 tienen una sola vena para su drenaje, lo que

facilita la trisectorectomía 4, 5 y 6, ya que el tiempo venoso se reduce a la ligadura de la vena hepática derecha e izquierda.

Una vez finalizada la trisectorectomía 4, 5 y 6, que supone la resección del hígado superior, se aprecia que el parénquima residual es el hígado inferior, constituido por el proceso caudado, lóbulo caudado y lóbulo lateral derecho (*Figura 21*).

Los modelos experimentales que se obtienen al realizar una hepatectomía parcial en la rata han servido para el mejor conocimiento de los mecanismos que rigen la regeneración hepática. La técnica de hepatectomía más utilizada con este objeto ha sido la descrita por *Higgins* y *Anderson*. El modelo resultante de la hepatectomía denominada 65 al 75%, ha sido determinante en la investigación de los factores que favorecen o inhiben la regeneración hepática^{92,97-99}, en especial aquellos derivados de la hipótesis de la masa crítica¹⁰⁰.

El lóbulo lateral derecho, el lóbulo caudado y el proceso caudado aumentan de tamaño a lo largo del postoperatorio y a las cuatro semanas de evolución consiguen restaurar el peso hepático inicial⁹⁴, lo que no excluye que así como se ha producido una adaptación morfológica del parénquima residual tras la hepatectomía, exista una adaptación funcional que consiga suplir el órgano original.

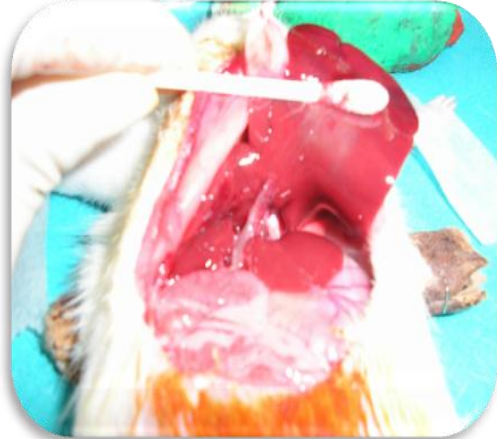
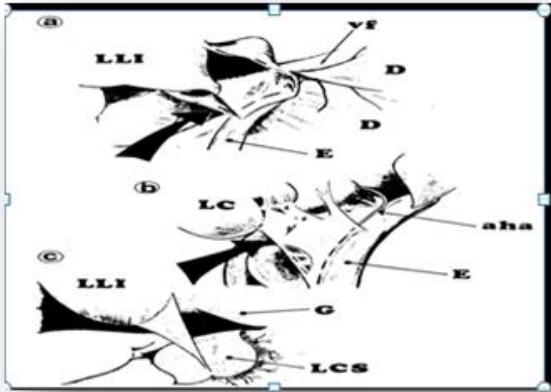
Favorecer la regeneración hepática para reducir en el tiempo los efectos nocivos inherentes a la insuficiencia hepática

posthepatectomía, es un campo de investigación cuyo interés radica en su aplicación a la clínica humana.

c.3. Manejo postoperatorio

Todos los animales recibieron 5 mililitros de glucosa al 10% subcutánea y 0,3 ml de penicilina intramuscular inmediatamente tras la intervención. Para la analgesia postoperatoria se administró vía subcutánea clorhidrato de buprenorfina a dosis de 0,01 mg/kg de peso corporal. Los animales tuvieron acceso libre a suero glucosado al 20% y pienso de rata¹⁰¹.

≈ PRIMER TIEMPO QUIRURGICO



*Figura 18. Liberación y movilización del hígado superior
(Esquema anatómico cortesía Lorente l.⁹⁵)*

*LC: lóbulo caudado
LCS: lóbulo caudado superior
LLI: lóbulo lateral izquierdo
Vf: vena frénica izquierda
D: diafragma
E: esófago
G: estómago
Aha: arteria hepática accesoria*

≈ SEGUNDO TIEMPO QUIRURGICO

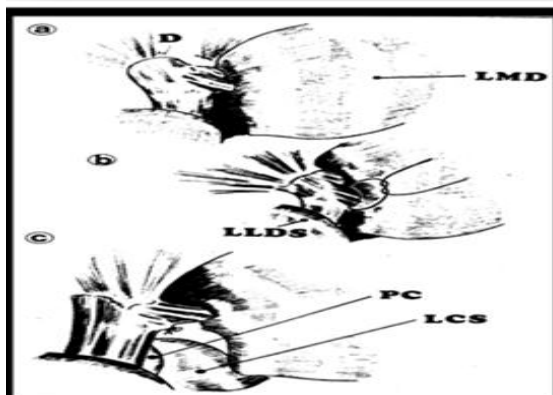


Figura 19. Tiempo hiliar

(Esquema anatómico cortesía Lorente L.⁹⁵)

LMD: lóbulo medio derecho

LLDS: lóbulo lateral derecho superior

PC: proceso caudado

LCS: lóbulo caudado superior

LLI: lóbulo lateral izquierdo

D: diafragma

≈ TERCER TIEMPO QUIRURGICO

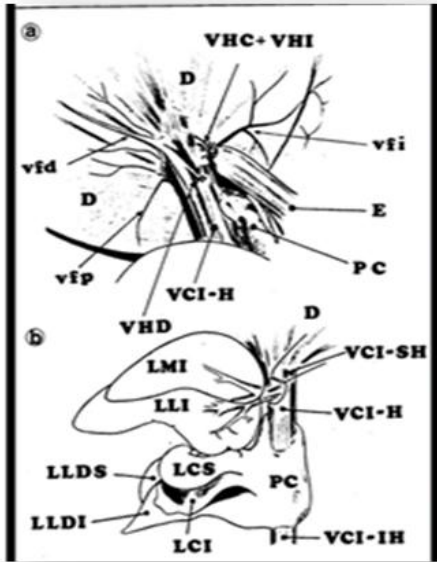


Figura 20. Tiempo venoso
(Esquema anatómico cortesía Lorente L.⁹⁵)

VHC: vena hepática central; VHI: vena hepática izquierda; VHD: vena hepática derecha
 VCI-H: vena cava inferior intrahepática; LC: lóbulo caudado; LCS: lóbulo caudado superior
 LCI: lóbulo caudado inferior; LLI: lóbulo lateral izquierdo; LLDS: lóbulo lateral derecho superior; LLDI: lóbulo lateral derecho inferior; PC: proceso caudado; Vfi: vena frénica izquierda; Vfd: frénica derecha; Vfp: frénica posterior; D: diafragma; E: esófago

≈ FINALIZACION TIEMPO QUIRURGICO

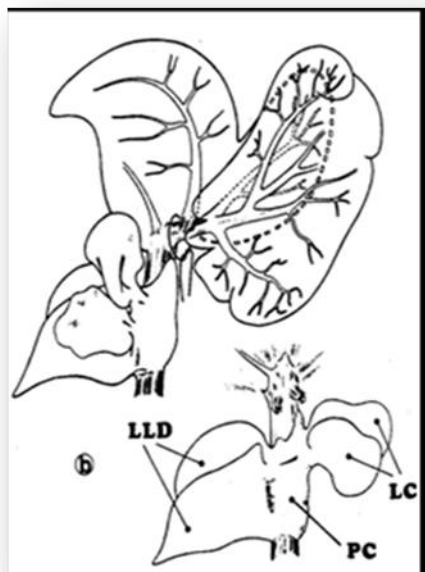


Figura 21. Trisectorectomía. Resultado final
(Esquema anatómico cortesía Lorente L.⁹⁵)

LLD: lóbulo lateral derecho
PC: proceso caudado; **LC:** lóbulo caudado

d.- Grupos de animales

≈ GRUPOS CONTROL SIN BEVACIZUMAB

1. Control operación simulada

Ratas a las que se interviene realizando disección hilar, suprahepática y adherencial, sin realizar hepatectomía y posterior estudio de parámetros a las 6h y a las 24h de la cirugía (Figura 22).

2. Control hepatectomía parcial

Ratas a las que se interviene realizando hepatectomía del 70% con posterior estudio de parámetros a las 6h y a las 24h de la cirugía (Figura 23).

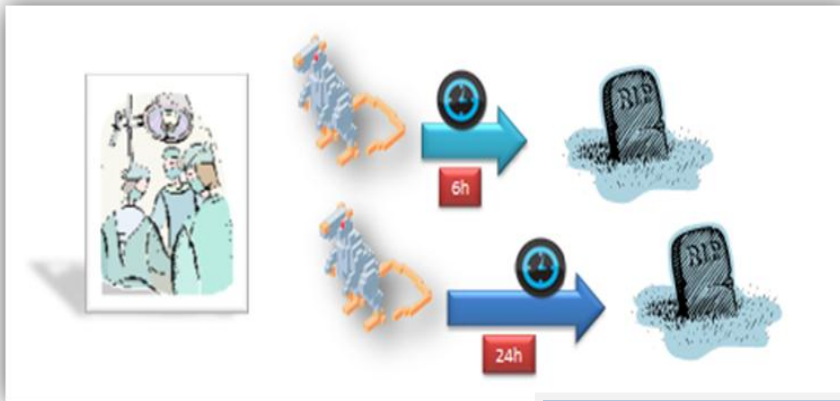


Figura 22. Grupos Operación Simulada

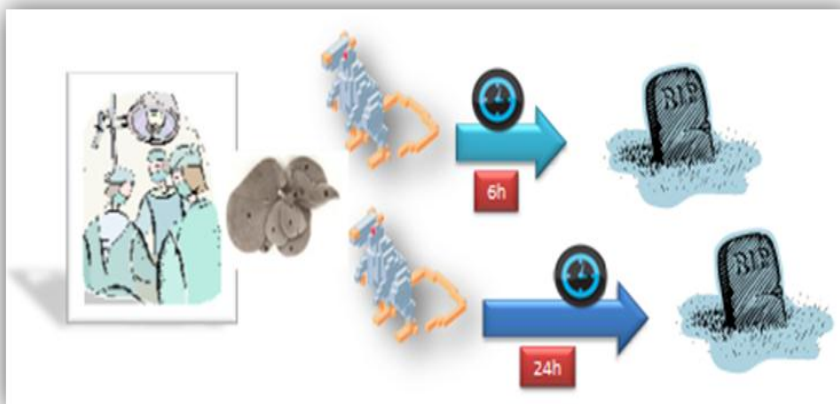


Figura 23. Grupos Hepatectomía Parcial

≈ GRUPOS CONTROL CON BEVACIZUMAB

3. Control basal-BV

Administración de la dosis basal del fármaco (5mg/kg =200ugr, vía intraperitoneal dosis única), la mitad de la misma, y el doble en grupos distintos de animales, a los que no se les realiza ningún tipo de cirugía. El antiangiogénico se administra 7 días antes del sacrificio (Figura 24).

4. Control operación simulada-BV

Administración del anticuerpo 7 días antes de la cirugía, y posterior estudio de parámetros a las 6h y a las 24h tras realización de la misma (Figura 25).

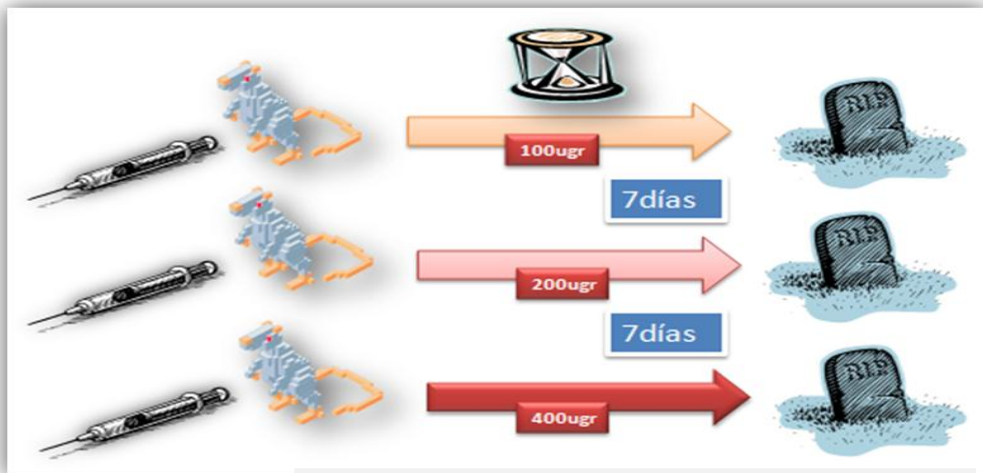


Figura 24. Grupos control basal con Bevacizumab

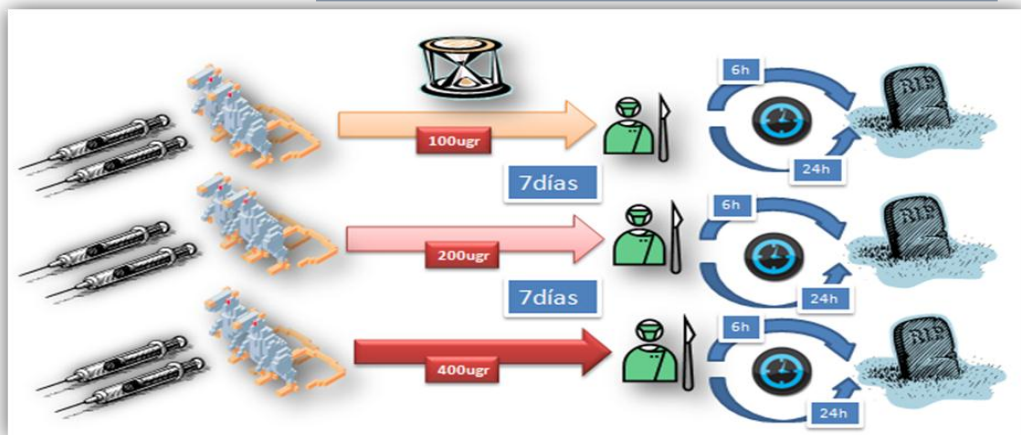


Figura 25. Grupos Operación Simulada con Bevacizumab

≈ GRUPOS DE ESTUDIO

5. Hepatectomía parcial-BV

Administración del anticuerpo 7d antes de la cirugía, y estudio de parámetros a las 6h y 24h tras realización de la misma (Figura 26).

≈ Cada grupo consta de 5 ratas comprendiendo un tamaño muestral de n=100 (cada rata en las figuras anteriores corresponde a un grupo n=5)

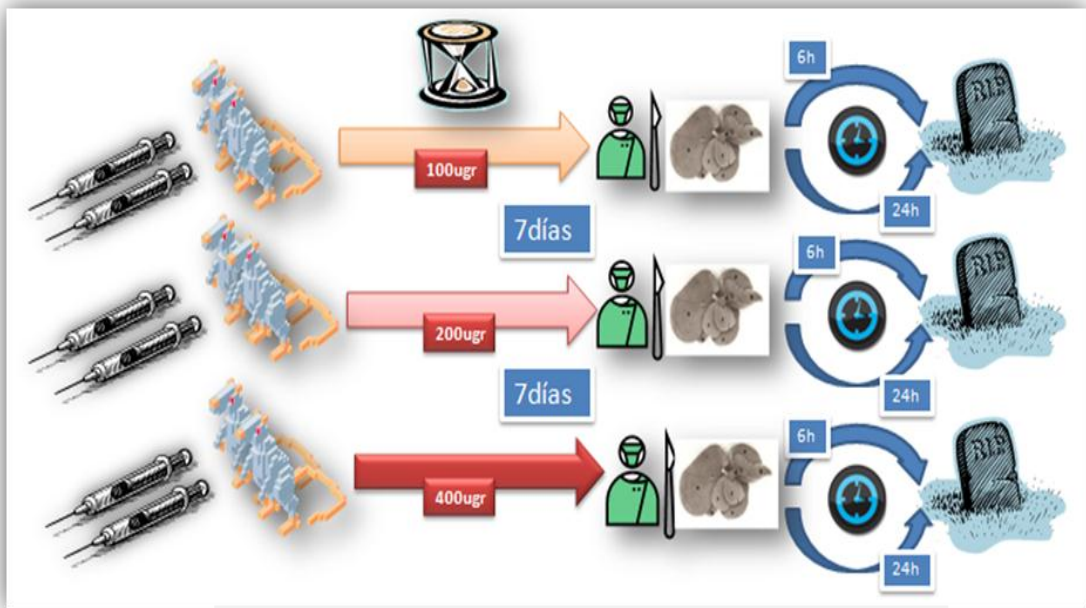


Figura 26. Grupos Hepatectomía Parcial con Bevacizumab

e.- Secuencia de trabajo

- Las ratas de *grupo de Operación Simulada y Hepatectomía sin BV* (grupos 1 y 2) fueron sacrificadas a las 6 y 24 horas de la intervención, obteniendo sangre mediante canulación aórtica y extracción hepática para procesar los estudios morfológicos y las determinaciones analíticas.

- Las ratas del grupo *Control Basal con BV* (grupo 3) fueron sacrificadas al séptimo día de la administración del anticuerpo, obteniendo sangre mediante canulación aórtica y extracción hepática para procesar los estudios morfológicos y las determinaciones analíticas.

- Por último, las ratas del grupo *Operación Simulada y Hepatectomía con BV* (grupos 4 y 5), fueron sacrificadas a las 6 y 24h de la intervención quirúrgica (7días antes se les administró el fármaco intraperitoneal), obteniendo sangre mediante canulación aórtica y extracción hepática para procesar los distintos estudios.

f.- Recogida y procesamiento de las muestras
Se recogieron muestras de hígado en diferentes momentos dependiendo del estudio a realizar.

- Así, con el animal anestesiado se recogieron **muestras del tejido hepático** para los controles basales a los 7días de la administración del BV; a las 6 y 24 horas en las operaciones simuladas y tras la realización de hepatectomía en los grupos sin BV, y de la misma forma en los grupos de animales a los que se les administró el

antiangiogénico 7días antes de la cirugía; una parte se congeló en nieve carbónica (y se mantuvo a -80°C) y otra parte se fijó en paraformaldehído al 4% tamponado, para su posterior procesamiento con el fin de realizar el análisis histológico e inmunohistoquímico.

-Las **muestras de sangre** se recogieron a los 7días de la administración del anticuerpo para los controles basales con el fármaco; a las 6 y 24 horas en las operaciones simuladas y después de la hepatectomía, tanto en los grupos que recibieron el BV como en los que no, en tubos con heparina que se mantuvieron a 4°C hasta que fueron centrifugados a 3500 rpm durante 5 minutos a 4°C para obtener el plasma que se almacenó a -80°C .

g.- Estudio de la regeneración hepática

El proceso de regeneración hepática en la rata se desarrolla de forma rápida como ya hemos comentado anteriormente, de tal forma que se completa en 7-10 días. Comienza prácticamente a continuación del daño o resección hepática, de forma simultánea en todos los hepatocitos, éstos pasan de la fase quiescente G0 a G1 y posteriormente S (síntesis de DNA) en tan sólo 12-15 horas, y finalmente, en mitosis 6-8 horas más tarde. El hígado de rata dobla su tamaño entre las 24 y 48 horas tras la cirugía. Por esta razón los estudios morfométricos, bioquímicos y inmunohistológicos en cada modelo se realizaron a las 6 y a las 24h tras la resección.

≈ ESTUDIO MORFOMETRICO

Masa Hepática regenerada

Dichos cálculos se realizan mediante la fórmula de Kwon¹⁰², la cual nos proporciona la tasa de regeneración hepática basada en el peso.

$$Tasa\ de\ regeneración\ hepática\ en\ \% = D/E \times 100; \text{ donde } E = R/0,7$$

La medición se lleva a cabo a las 6 y 24 horas posthepatectomía para una rata Wistar (peso entre 210-310gr), donde:

D= Peso total de hígado el día del sacrificio por 100gramos de peso corporal

E= Representa el peso estimado por 100gr de peso corporal antes de la hepatectomía, calculado usando el peso del hígado resecado en la hepatectomía

R= Peso del hígado resecado

≈ MICROSCOPIA OPTICA

1. Tinción de hematoxilina-eosina

Se realizaron secciones hepáticas del hígado nativo y del hígado regenerado, y se utilizó tinción estándar con hematoxilina-eosina para microscopía óptica.

Se estudiaron parámetros como la lesión histopatológica, esteatosis y grado de inflamación.

**Protocolo tinción hematoxilina-eosina*

1. Desparafinado rápido: Xilol 15 minutos

2. Hidratación: baño descendente en alcoholes

5 minutos alcohol 100°

5 minutos alcohol 100°

5 minutos alcohol 96°

5 minutos alcohol 70°

5 minutos agua destilada

3. Hematoxilina: 20 minutos

4. Lavar en grifo 5 minutos (hasta que el agua salga clara)

5. HCl 1 N (meter y sacar) (9 ml HCl 37% y 96 ml H₂O)

6. Azuleante 1 minuto

7. Lavar 5 minutos en agua del grifo

8. Eosina 3 minutos

9. Lavar en grifo 5 minutos (hasta que el agua salga clara)

10. Deshidratación: baño ascendente en alcoholes

Alcohol 96° (meter y sacar)

Alcohol 100° 1 minuto

Alcohol 100° 1 minuto

Xilol 1 minuto

Xilol 1 minuto

11. No sacar las muestras del xilol hasta que se vaya a proceder al montado

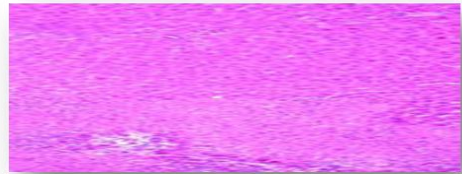
12. Montar el cubre sobre el porta

1.1. Lesión histopatológica

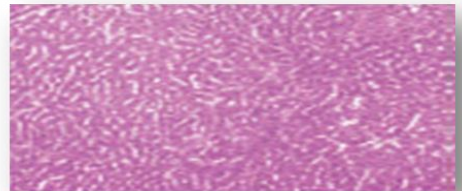
La lesión histopatológica se analizó con una tinción de hematoxilina-eosina sobre 10 campos de gran aumento y con una magnificación de 40x. Mediante una escala ordinal, se procedió a calcular la lesión histopatológica.

Figura 27. Grados de lesión histopatológica

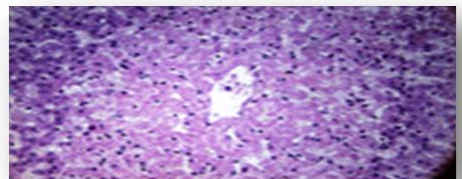
GRADO 0. *No evidencia de lesión o lesión mínima*



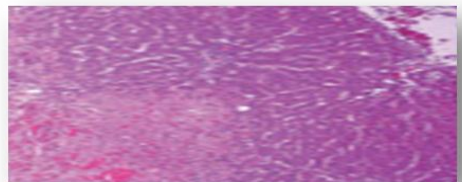
GRADO 1. *Lesión moderada consistente en vacuolización citoplasmática y picnosis nuclear focal*



GRADO 2. *Lesión moderada a severa con picnosis intranuclear extensa, hipereosinofilia citoplasmática y pérdida de límite intracelular*



GRADO 3. *Lesión severa con extensa*



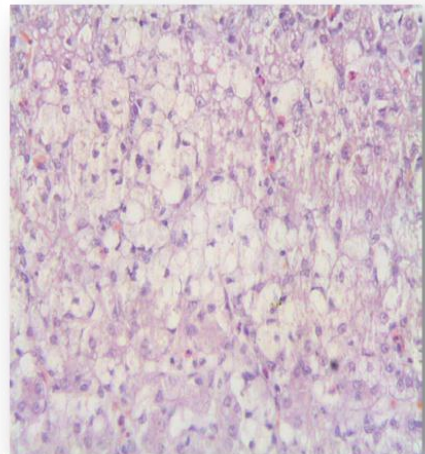
1.2. Esteatosis

El depósito graso se evalúa de forma semicuantitativa valorando el porcentaje del mismo en cada campo por observación directa al microscopio y de forma cuantitativa midiendo este depósito con ayuda de un equipo de análisis de imagen a nivel de la zona centrolobulillar y lobulillar. El tipo de esteatosis predominante se describe contabilizando el número de hepatocitos normales y afectados por macro-microvacuolas.

GRADO 0 <10%

GRADO 1 10-33%

GRADO 2 33-66%



*Figura 28. Grados de esteatosis
Corte de hígado esteatósico grado 3 donde se observan
micro y macrovacuolas*

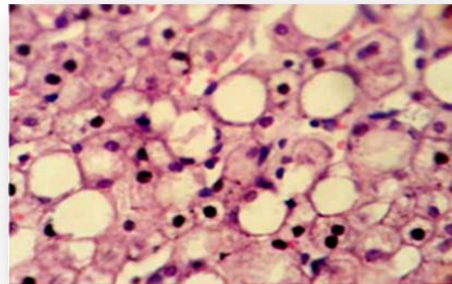
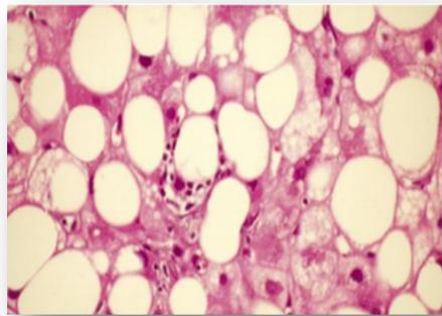
1.3. Grados de inflamación

El grado de inflamación se evalúa de forma cuantitativa contabilizando el número de focos de infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario por 10 campos de gran aumento (200x).

GRADO 0no focos

GRADO 1<2 focos

GRADO 22-4 focos



*Figura 29. Grados de inflamación
Corte representativo de hígado esteatósico donde se muestra discreto infiltrado inflamatorio*

2. Incorporación de Bromodesoxiuridina (BrdU)

La BrdU es un análogo de la timidina que se incorpora al igual que ésta al ADN durante la fase de síntesis. Esta incorporación puede ser detectada por inmunohistoquímica usando citometría de flujo o Anticuerpos Monoclonales. La BrdU, al igual que la timidina puede usarse tanto in vivo como in vitro. El protocolo de administración se basa en una dosis única de BrdU (100mg/Kg) vía intraperitoneal a las 6, 4 y 2 horas antes de

obtener la muestra de tejido hepático. Para estudios in vitro los hepatocitos en cultivo se incuban durante 1-2 horas con BrdU. Previamente los hepatocitos o tejido hepático han sido fijados, desnaturalizados e incubados con anticuerpo monoclonal antiBrdU. Un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa se usa para documentar la presencia del primer anticuerpo, usando técnicas de inmunohistoquímica estándar¹⁰³.

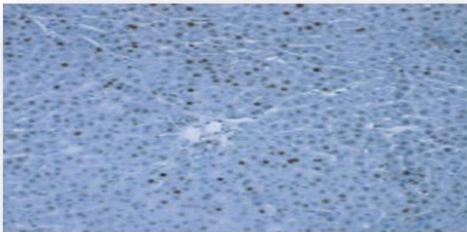


Figura 30. Bromodesoxiuridina

Cálculo de células BrdU positivas por 10 campos de gran aumento (x40). Se observa en la figura de arriba una alta positividad para BrdU

**Protocolo inmunohistoquímico de detección de BrdU*

1. Desparafinado y rehidratado de secciones

-Desparafinar los cortes calentando los cristales a 45°C y posteriormente mantener a 65° durante 10 minutos para licuar la parafina

-Baño de Xilol durante 10 minutos

-Baño de Etanol 100% durante 5 minutos

-Baño de Etanol 96% durante 5 minutos

-Baño de Etanol 70% durante 5 minutos

-Baño de Agua desionizada durante 2 minutos

2. Desproteínización

-Tratar con proteinasa K (10 µg/mL) en PBS, pH 7.4 durante 40 minutos a 37°C.

3. Bloqueo de Peroxidasa endógena

-Sumergir los cortes en una solución de peróxido de hidrógeno H₂O₂ al 3% en metanol durante 30 minutos a temperatura ambiente.

4. Desnaturalización del DNA

-Desnaturalizar con HCl 4 N durante 7 minutos a temperatura ambiente

-Neutralizar las muestras empapando los cristales con 50mM de Tris-base (sin ajustar el pH) durante 5 minutos a temperatura ambiente

-Lavar 2 veces con PBS pH 7.4 (2 minutos cada uno)

5. Bloqueo inespecífico

-Incubar con una solución de Tris-HCl 10 mM pH 7.5 en 10% SFB durante 1 hora a 37°C.

6. Incubación Anticuerpo 1° anti-BrdU

-Cubrir la muestra con 50 µL de anticuerpo 1° en Tri-HCl 10 mM pH 7.5 en 10% de SFB e incubarlo toda la noche a 2-8°C (4°C). Diluir el anticuerpo 1° anti-BrdU 1:200 (5 µL en 1000 µL).

-Lavar 2 veces con PBS (2 minutos cada uno)

7. Incubación Anticuerpo 2°
(Protocolo casa DAKO)

-Disponer 100 µL de la solución Peroxidase Labelled Polymer directamente del bote a las muestras. Mantener en esta solución durante 40 minutos.

-Lavar 2 veces con PBS

-Disponer 100 µL de la solución Sustrato-Cromógeno dilución 1:50 durante 10-20 minutos.

-Contrateñido con Hematoxilina 5 minutos.

-Lavar el exceso de colorante con H₂O₂ destilada

-Deshidratar con Etanol 95% durante 5 minutos

-Deshidratar con Etanol 100% durante 5 minutos

-Clasificar las muestras con 3 cambios de Xilol de 1 minuto

-Montar con Eukitt®

8. Lectura al microscopio óptico

≈ ESTRÉS OXIDATIVO

1. *Glutación total, glutación oxidado e índice de estrés oxidativo*

El glutación total es la suma del glutación oxidado y el glutación reducido (GSSG+GSH).

El glutación (GSH) es un tripeptido no proteínico que deriva de aminoácidos. Contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y del grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato. El glutación como antioxidante, ayuda a proteger a las células de especies reactivas del oxígeno,

como los radicales libres y los peróxidos. En el proceso, el glutación se convierte en su forma oxidada disulfuro de glutación (GSSG).

El glutación se encuentra casi exclusivamente en su forma reducida, ya que la enzima que vuelve de su forma oxidada, la **glutación reductasa**, es constitutivamente activa e inducible al estrés oxidativo. Un aumento de la proporción GSSG y GSH se considera un indicativo de estrés oxidativo.

Por otro lado numerosos estudios^{104,105} han demostrado que las concentraciones de GSH y tioredoxina (proteína antioxidante) se encuentran elevadas durante la fase de proliferación celular.

El potencial redox, definido por el cociente GSH/GSSG (mayor estrés oxidativo cuanto mayor es el denominador), hace referencia a

la oxidación causada por la prolongada pérdida de precursores de energía, aumento de sustancias oxidantes y ciertos iones, que dan lugar a la activación de la muerte celular mediante diversos mecanismos apoptóticos.

Así, mientras los estudios acerca de la concentración de GSH demuestran que la estimulación de la proliferación depende de ésta, la medición del potencial redox apoya la conclusión de que una proliferación celular normal en los tejidos mantiene un cociente GSH/GSSG aumentado y por lo tanto un índice de estrés oxidativo disminuido^{106,107}.

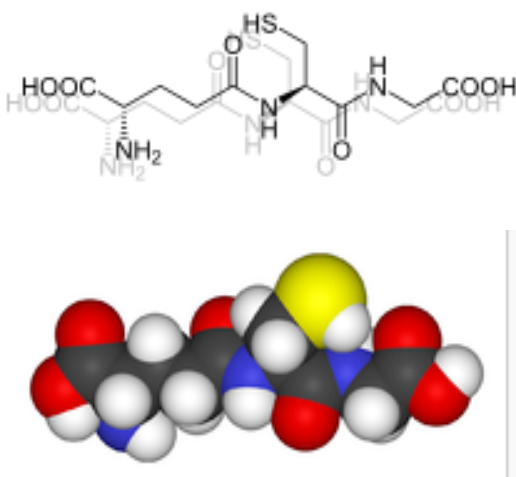


Figura 31. Forma lineal y modelo tridimensional del glutación

**Protocolo de medición del Glutatión*

SOLUCIONES QUE SE NECESITAN

Tampón fosfato 100mM pH 7:

- *Preparamos 0,2M de fosfato de sodio monobásico: 2.78 g /100 ml agua elix.*
- *Preparamos 0.2M de fosfato de sodio dibásico: 2,843 g/100ml de agua elix*
- *Mezclamos 61ml de solución B + 23 ml solución A. Comprobar que el Ph es 7.*
- *Diluimos a la mitad: 50 ml +50 ml de agua destilada*
- *Autoclavamos a 121°C 30 minutos.*

Solución 0.1% NaHCO₃:

0.1 g en 100ml de agua destilada

Tampón fosfato 100mM pH 7+ 1mM EDTA (PM 372,24)

PREPARACION DE EXTRACTOS (TEJIDO)

- Se pesan 300mg de tejido.*
- Se añaden 10 volúmenes de Tampón fosfato 100 mM, pH 7+1mM EDTA a 4°C.*
- Se homogeniza con Ultratúrrax (4°C)*

DESPROTEINIZACIÓN

- Centrifugar a 4°C 15 min a 10000g.*
- Recoger sobrenadante y añadir 1 volumen de una disolución de ácido metafosfórico (MPA, 0.1g/ml de agua bidestilada). Mezclar con vórtex.*
- Incubar la mezcla 5 min a temperatura ambiente.*
- Centrifugar 5 min 4000g*
- Recoger sobrenadante (se puede almacenar a -20°C)*

*** MEDIDA DE GSH TOTAL**

- Preparar estándares para la recta patrón de GSSG en tampón fosfato (μM): 0-0.25-0.5-1-2-4-6-8.

- Preparar una solución 4M de trietanolamina (TEAM) en agua destilada y añadir 50 μl de la solución 4M de TEAM por ml de muestra. Mezclar bien con vórtex. Diluir las muestras 100 veces en tampón fosfato. En suero se tiene que concentrar.

- Preparar reactivo de Ellman (justo antes de usar):

4.76 mg DTNB+ 1.5 mg NaHCO_3 + 1ml tampón fosfato.

- Preparar NADPH (16.7 mg +1ml 0.1% NaHCO_3)

- Mezcla de reacción/pocillo ($V_f=200\mu\text{l}$)

Tampón fosfato 136.8 μl

NADPH 2 μl

DTNB 10 μl

Glutación Reductasa 1.2 μl

GSSG o muestra 50 μl

- Medir absorbancia a 405nm durante 5 minutos.

****Curva estándar**

-Representando la absorbancia de los estándares vs tiempo. Obtenemos las pendientes de las rectas.

-Representamos dichas pendientes vs concentración de GSSG. De aquí se obtiene la recta patrón, que se utiliza para calcular la concentración de GSH total de las muestras.

*** MEDIDA DE GSSG**

-Se procesa la muestra igual que para GSH total pero después de añadir TEAM, se añaden 10nmoles/ml de 2-vinilpiridinio y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente (sirve para derivatizar el GSH reducido y así sólo está disponible el oxidado).

-En paralelo hay que preparar una curva estándar con GSSG

2. TBARS

TBARS son “sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico” como son los productos derivados de la peroxidación lipídica.

Se trata de una medición indirecta para el parámetro de peroxidación y por lo tanto un marcador de riesgo de estrés oxidativo¹⁰⁸.

**Protocolo de medición de tbars*

Como estándar se emplea 1, 1, 3, 3,-tetraethoxypropano

-500 ul de muestra se mezclan con 500 ul de 0,5% BHT (2,6-Ditert-butyl-4methyl-phenol disuelto en metanol) y con 100 ul de 0,66 N H2SO4.

-Aplicar vórtex a la mezcla

-Añadir 75 ul de 0,3 M de Na2WO4

-Agitar la mezcla y centrifugar a 1000g durante 10 minutos a 4⁰C

-El sobrenadante resultante se mezcla con 1 ml 1% ácido tiobarbitúrico (cuyo pH se encuentre entre 2,5 y 4,5).

-Dicha mezcla se incuba en un baño con agua a 100⁰C durante 1 hora.

-Transcurrido dicho tiempo se enfría rápidamente la reacción.

-Posteriormente se añade a cada mezcla 500ul de 5NHCL y 500 ul de n-butanol.

-Centrifugar la mezcla a 1000g durante 10 minutos a 4⁰C

-Recoger una muestra de la fase superior y medir la absorbancia a 532nm

3. ATP

La apoptosis es una forma fisiológica de muerte celular.

El estrés oxidativo, las proteasas, nucleasas, el óxido nítrico y la mitocondria están considerados como mediadores esenciales en el fenómeno de la apoptosis celular. La membrana mitocondrial es fundamental para la eliminación de radicales libres. Durante este proceso se genera un gradiente de energía que es transformado en moléculas de adenosín-trifosfato (ATP)¹⁰⁹.

Bajo los graves niveles de estrés oxidativo se produce un agotamiento del ATP, impidiendo la muerte celular por apoptosis programada y dando lugar a una muerte celular descontrolada¹¹⁰.

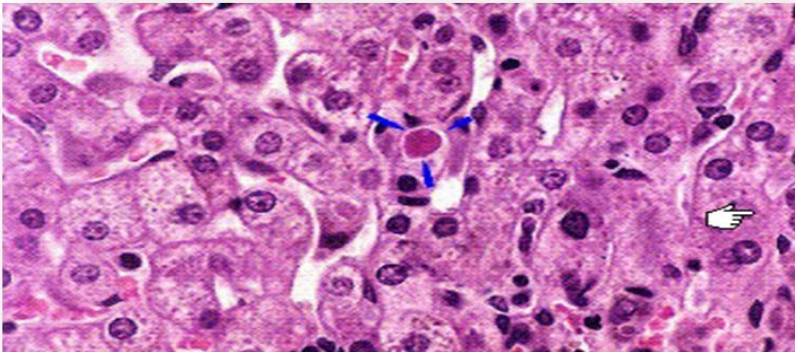


Figura 32. Muerte celular programada. Se observa hepatocito central apotótico sin restos de núcleo y un citoplasma con intensa eosinofilia

***Protocolo de medición de Atp**

-Partimos de 100 mg de tejido (hígado de rata) diluido en 1 mL de tampón fosfato sódico 100mM (pH 7) + EDTA (1mM).

- Homogenizar el tejido en un homogenizador Ultra-turrax T25 a 15000 rpm a 4°C y centrifugar a 10000 x g durante 15 minutos a 4°C.

- Diluir el sobrenadante en una proporción 1:1 (v/v) en ácido perclórico 85 mM, y centrifugar a 18000 x g durante 5 minutos a 4°C.

-Recuperar el sobrenadante y conservar la muestra a -20°C hasta su uso.

-La concentración de ATP en la muestra es proporcional a la quimioluminiscencia emitida.

Ensayo medición ATP: partimos para la recta patrón de ATP estándar (SIGMA, FL-AAS) que se diluirá en ácido perclórico 85 mM hasta una concentración de 400 μ M. La solución luciferasa comercial (ATP Assay Mix (SIGMA, FL-AAM)) se diluye 1:25 en ATP Assay Mix dilution Buffer (SIGMA, FL-AAB). A su vez, se diluye tanto la muestra como el estándar de ATP 1:10 en HEPES 50 mM pH 7,8. En oscuridad se añade 100 μ L muestra o estándar y posteriormente 100 μ L de ATP Assay Mix diluido (previamente se deja 2-5 minutos para atemperar y que se hidrolice el ATP endógeno). Con posterioridad se mide la luminiscencia en un lector de microplacas (TECAN Spectra Fluor, Genios, Salzburg, Austria GES.m.b.H). La cantidad de ATP se obtiene de extrapolar los datos de luminiscencia a la recta patrón.

≈ INTERLEUQUINAS

1. Factor de Necrosis Tumoral alfa

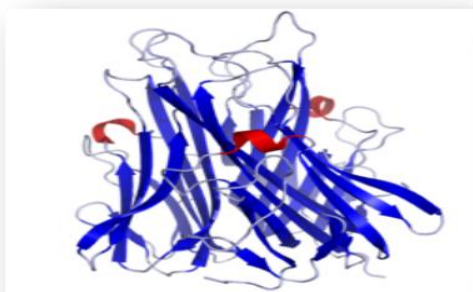


Figura 33. Estructura tridimensional del TNF α

*Protocolo de medición del TNF α

-Las muestras de tejido hepático se homogenizaron en un tampón que constaba de Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, tritón-X100 y un cocktail de inhibidores de proteasas (Complete mini, Roche, Switzerland).

- El homogenado se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos a 4° C (255)

- La detección de TNF- α se llevó a cabo mediante un kit comercial de ELISA (Rat TNF- α

- Para la determinación del TGF- β , las muestras se homogenizaron en un buffer de fosfato, pH=7.4, que contenía PMSF 2 mM y Pepstatin A 100 nM.
- Los homogenados se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos a 4°C.
- Se recogió el sobrenadante del cual se determinó el TGF- β total (activo+latente) las muestras se neutralizaron con NaOH 1M. Se utilizó un kit de ELISA (BMS623 and BMS623TEN Bender Medsystem®)

2. Factor de Necrosis Tumoral beta

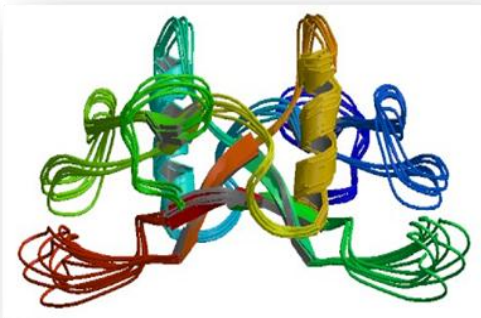


Figura 34. Estructura tridimensional TNF β

*Protocolo de medición del TNF β

-Las muestras de tejido hepático se homogenizaron en un buffer de lisis con HCl 50 mM, NaCl 150 mM, tritón-X100 y un cocktail de inhibidores de proteasas (Complete mini, Roche, Switzerland).

-El homogenado se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos.

- La detección de IL-6 se realizó mediante un kit comercial (BMS625 and BMS625TEN Bender Medsystem®)

3. Interleuquina 6

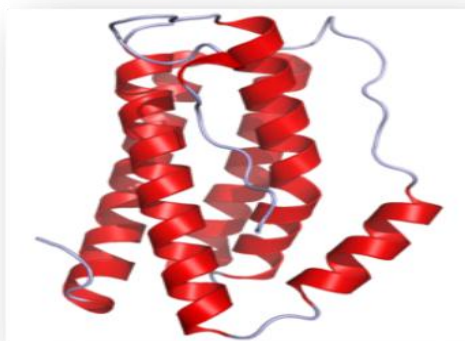


Figura 35. Estructura tridimensional de la IL-6

**Protocolo de medición de la IL-6*

**Protocolo de medición del EGF*

- Este ensayo emplea la técnica de inmunoenzimas de tipo sándwich. Un anticuerpo monoclonal es preincubado con la muestra.
- Las muestras son pipeteadas dentro de los pocillos que están unido por el anticuerpo inmovilizado.
- Después del lavado a distancia de las sustancias no unidas, un anticuerpo policlonal ligado a enzimas se añade a los pocillos.
- La reacción enzimática da lugar a un producto coloreado amarillo al cesar el vertido de la solución.
- La intensidad del color se mide en proporción a la concentración de la etapa inicial. Los valores de la muestras se leen en un lector de placas.

4. Factor de crecimiento del endotelio epidérmico

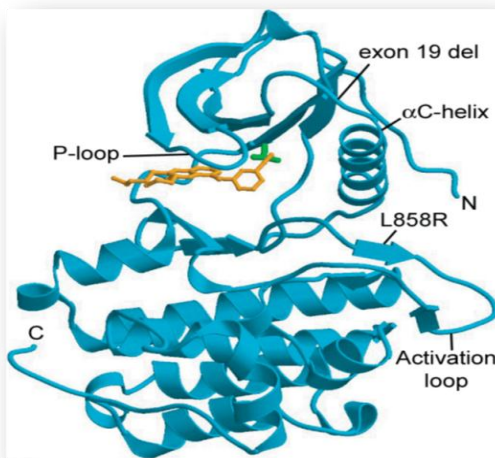


Figura 36. Estructura tridimensional del EGF

**Protocolo de medición del VEGF*

- Este ensayo emplea la técnica de inmunoensayo de tipo sándwich. Un anticuerpo monoclonal es precubierto con un anticuerpo policlonal.
- Las muestras son pipeteadas dentro de los pocillos de un microplaca de 96 pozos unido por el anticuerpo inmovilizado.
- Después del lavado a distancia de las sustancias no unidas, un anticuerpo policlonal ligado a enzimas se añade a los pocillos.
- La reacción enzimática da lugar a un producto azul o rojo dependiendo del sustrato utilizado.
- La intensidad del color se mide en proporción a la longitud de onda de absorción en la etapa inicial. Los valores de las muestras se leen en un lector de placa.

5. Factor de crecimiento del endotelio vascular



Figura 37. Estructura tridimensional del VEGF

≈ *BIOQUIMICA*

Los niveles plasmáticos de aspartataminotransferasa (AST), alaninaaminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina, gamma-glutamyl-transpeptidasa, bilirrubina (total, directa e indirecta), urea, creatinina, y proteínas totales fueron analizados usando métodos de laboratorio comunes en el Departamento de Análisis Clínicos.

h.- Metodología Estadística

El análisis estadístico de los datos de los grupos control (operaciones simuladas y controles basales) y los grupos con hepatectomía, con y sin Bevacizumab, se realizó utilizando el test no paramétrico “U de Mann-Whitney” de dos colas para variables cuantitativas (índice de regeneración mediante la fórmula de Kown, captación de BdrU, índice de estrés oxidativo, catabolismo celular medido en ATP, sustancias TBARS, niveles de transaminasas, proteínas, urea y creatinina, albúmina, bilirrubina y fosfatasa alcalina, citoquinas) y la prueba Chi cuadrado corregida según el test exacto de Fisher para las variables cualitativas que finalmente no pudo ser aplicada dado el numeroso conjunto de grupos de ratas con $n < 5$ y por lo tanto la obtención de casillas igual a 0 (esteatosis, lesión histopatológica, grado de inflamación). Los datos fueron expresados en mediana, rango e intervalo de confianza al 95% para las variables continuas. La esteatosis y el grado de lesión histopatológica y el grado de inflamación fueron expresadas porcentualmente.

El nivel de significación elegido fue $p < 0.05$.

Para llevar a cabo dicho análisis se utilizó el programa estadístico SPSS 15.

RESULTADOS

Descripción basal del estudio

VI.- RESULTADOS

α.- Descripción basal del estudio

α.1. Grupos control: basales y operación simulada

TABLA 3. RESUMEN DESCRIPTIVO BASAL DEL ESTUDIO. PROLIFERACION HEPATOCITARIA Y ESTRES OXIDATIVO

	BrdU		GSH/GSSG		ATP ng/gr		TBARS nm/gr	
	Median	Rang	Median	Rang	Median	Rang	Median	Rang
Os6h	3	1	7,6	2,9	6,2	6,7	101,4	96,0
OS24h	2	1	9,1	5,2	8,8	6,7	28,5	22,0
Os6h 100	6	24	17,5	10,8	4,5	6,9	43,4	30,0
Os24h 100	2	4	18,9	11,2	9,1	3,6	57,4	23,8
Os6h 200	2	2	23,4	15,4	4,9	4,6	11,4	42,4
Os24h 200	3	2	38,2	29,3	5,4	4,9	6,4	79,4
Os6h 400	6	4	16,0	4,8	3,7	7,4	2,4	44,4
Os24h 400	22	86	19,1	10,3	9,9	6,3	35,4	43,1
CBv 400	2	2	8,5	8,2	8,1	2,6	78,4	134,1

Representación mediante mediana y rango de cada una de las variables de proliferación y estrés oxidativo para cada grupo de ratas.
(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

TABLA 4. RESUMEN DESCRIPTIVO BASAL DEL ESTUDIO. PERFIL HEPATICO

	ALT U/L		AST U/L		FA U/L		Bt mg/dl		Bd mg/dl	
	<i>Median</i>	<i>Rang</i>	<i>Median</i>	<i>Rang</i>	<i>Median</i>	<i>Rang</i>	<i>Median</i>	<i>Rang</i>	<i>Median</i>	<i>Rang</i>
<i>Os6h</i>	86,0	68,0	269,0	167,0	16,0	14,0	0,2	0,0	0,1	0,0
<i>OS24h</i>	37,0	16,0	323,0	104,0	14,1	8,2	0,2	0,1	0,1	0,1
<i>Os6h 100</i>	55,0	29,0	277,1	69,0	7,0	5,0	0,2	0,1	0,1	0,1
<i>Os24h 100</i>	46,1	12,0	217,0	179,0	6,0	4,0	0,2	0,1	0,1	0,0
<i>Os6h 200</i>	111,0	61,0	331,0	110,0	6,0	5,0	0,2	0,0	0,1	0,0
<i>Os24h 200</i>	42,0	18,0	241,2	68,0	8,0	3,0	0,2	0,0	0,1	0,1
<i>Os6h 400</i>	93,0	165,0	303,0	116,0	6,0	7,0	0,2	0,0	0,1	0,0
<i>Os24h 400</i>	39,0	26,0	194,0	270,0	7,0	9,0	0,2	0,1	0,1	0,1
<i>CBv 400</i>	36,0	9,0	305,0	280,0	15,0	7,2	0,2	0,1	0,1	0,1

*Representación mediante mediana y rango de cada una de las variables de perfil hepático para cada grupo de ratas.
(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)*

TABLA 5. RESUMEN DESCRIPTIVO BASAL DEL ESTUDIO. INTERLEUQUINAS

	TNF α pg/ml		TGF β pg/ml		IL6 pg/ml		VEGF pg/ml		EGF pg/ml	
	Median	Rang	Median	Rang	Median	Rang	Median	Rang	Median	Rang
Os6h	16,8	17,9	38820,1	45849	56,0	132,0	0,0	0,0	4,5	4,8
Os24h	17,8	26,2	50799,3	42343	0,0	38,0	6,5	13,2	4,3	5,5
Os6h 100	14,7	15,7	30145,5	10561	26,0	116,0	6,0	9,0	3,8	3,9
Os24h 100	13,6	14,0	34391,0	42090	126,0	198,0	13,0	12,0	0,0	4,4
Os6h 200	18,8	26,2	31668,0	37488	31,0	86,0	6,0	17,0	0,0	4,4
Os24h 200	16,8	16,8	18839,0	14050	0,0	40,0	6,0	9,0	0,0	3,9
Os6h 400	15,7	19,9	32999,0	65632	0,0	48,0	10,0	15,0	5,7	8,5
Os24h 400	15,2	12,6	28397,0	46553	0,0	60,0	12,0	11,0	0,0	5,1
CBv 400	15,7	17,8	44744,0	47815	58,0	186,0	1,0	7,1	0,0	3,8

Representación mediante mediana y rango de cada una de las interleuquinas para cada grupo de ratas.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

TABLA 6. RESUMEN DESCRIPTIVO BASAL DEL ESTUDIO. GRADO DE ESTEATOSIS

Esteatosis	<i>Ausente -leve</i>		<i>Moderada-severa</i>	
	N	%	N	%
<i>Os 6h</i>	5	100	0	0
<i>OS 24h</i>	5	100	0	0
<i>Os6h 100</i>	5	100	0	0
<i>Os24h 100</i>	5	100	0	0
<i>Os6h 200</i>	5	100	0	0
<i>Os24h 200</i>	5	100	0	0
<i>Os6h 400</i>	5	100	0	0
<i>Os24h 400</i>	5	100	0	0
<i>CBv 400</i>	5	100	0	0

Representación mediante el recuento (n) y frecuencia del grado de esteatosis hepática para cada grupo de ratas. La variable ha sido recodificada en ausente-leve (<10% y 10-33%), moderada-severa (33-66% y >66%).

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

TABLA 7. RESUMEN DESCRIPTIVO BASAL DEL ESTUDIO. GRADO DE INFLAMACION

Inflamación	<i>Ausente -leve</i>		<i>Moderada-severa</i>	
	N	%	N	%
<i>Os 6h</i>	4	80	1	20
<i>OS 24h</i>	5	100	0	0
<i>Os6h 100</i>	5	100	0	0
<i>Os24h 100</i>	5	100	0	0
<i>Os6h 200</i>	5	100	0	0
<i>Os24h 200</i>	5	100	0	0
<i>Os6h 400</i>	5	100	0	0
<i>Os24h 400</i>	5	100	0	0
<i>CBv 400</i>	5	100	0	0

Representación mediante el recuento (n) y frecuencia del grado de inflamación hepática para cada grupo de ratas. La variable ha sido recodificada en ausente-leve (0focos y <2focos), moderada-severa (2-4focos y >4focos).

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

TABLA 8. RESUMEN DESCRIPTIVO BASAL DEL ESTUDIO. LESION HISTOPATOLOGICA

Lesión Histopatológica	Ausente -leve		Moderada-severa	
	N	%	N	%
Os 6h	5	100	0	0
Os 24h	5	100	0	0
Os6h 100	5	100	0	0
Os24h 100	5	100	0	0
Os6h 200	5	100	0	0
Os24h 200	5	100	0	0
Os6h 400	5	100	0	0
Os24h 400	5	100	0	0
CBv 400	4	80	1	20

Representación mediante el recuento (n) y frecuencia del grado de lesión histopatológica hepática para cada grupo de ratas. La variable ha sido recodificada en ausente-leve, moderada-severa.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

a.2. Grupos a estudio: sometidos a hepatectomía

TABLA 9. RESUMEN DESCRIPTIVO BASAL DEL ESTUDIO. INDICE DE REGENERACION, PROLIFERACION Y ESTRES OXIDATIVO

	LRR		BrdU		GSH/GSSG		ATP ng/gr		TBARS nm/gr	
	Median	Rang	Median	Rang	Median	Rang	Median	Rang	Median	Rang
Ht 6h	53,6	6,4	4	6	12,0	21,9	3,6	2,7	136,4	125,0
Ht24h	61,3	10,7	8	5	13,2	4,6	5,8	7,8	134,4	191,4
Ht 6h 100	42,8	6,3	8	30	11,0	9,3	4,5	3,9	47,9	48,0
Ht24h 100	61,4	9,1	21	15	27,0	27,6	6,9	2,9	97,3	140,7
Ht6h 200	51,2	25,4	6	8	8,0	5,5	3,8	2,5	76,6	26,0
Ht24h 200	66,7	12,3	15	16	7,8	15,5	6,2	3,0	175,4	125,0
Ht6h 400	48,3	38,3	3	6	9,3	7,5	3,6	2,3	111,9	36,0
Ht24h 400	62,1	7,4	36	33	17,4	11,4	4,1	5,1	111,9	41,9

Representación mediante mediana y rango de cada una de las variables del índice de regeneración hepática (LRR), proliferación y estrés oxidativo para cada grupo de ratas. (Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

TABLA 10. RESUMEN DESCRIPTIVO BASAL DEL ESTUDIO. PERFIL HEPATICO

	ALT U/L		AST U/L		FA U/L		Bt mg/dl		Bd mg/dl	
	<i>Median</i>	<i>Rang</i>	<i>Median</i>	<i>Rang</i>	<i>Median</i>	<i>Rang</i>	<i>Median</i>	<i>Rang</i>	<i>Median</i>	<i>Rang</i>
<i>Ht6h</i>	482,0	387,1	517,0	383,0	14,0	23,0	0,2	0,0	0,1	0,0
<i>Ht24h</i>	1013,5	679,1	821,0	541,0	30,0	19,0	0,3	0,3	0,2	0,2
<i>Ht6h 100</i>	790,0	416,2	718,0	396,0	5,0	1,0	0,2	0,1	0,1	0,1
<i>Ht24h 100</i>	683,0	1528	758,0	629,0	12,0	20,0	0,3	0,3	0,2	0,2
<i>Ht6h 200</i>	338,5	519,0	462,0	439,0	15,5	10,0	0,2	0,1	0,1	0,1
<i>Ht24h 200</i>	874,1	960,0	775,0	913,0	24,0	23,0	0,3	4,3	0,2	3,1
<i>Ht6h 400</i>	552,5	2361	562,5	2347	8,0	2,0	0,2	0,0	0,1	0,0
<i>Ht24h 400</i>	962,0	683,2	1044	160,0	14,0	32,0	0,3	0,2	0,2	0,2

Representación mediante mediana y rango de cada una de las variables de perfil hepático para cada grupo de ratas.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

TABLA II. RESUMEN DESCRIPTIVO BASAL DEL ESTUDIO. INTERLEUQUINAS

	TNF α pg/ml		TGF β pg/ml		IL6 pg/ml		VEGF pg/ml		EGF pg/ml	
	Median	Rang	Median	Rang	Median	Rang	Median	Rang	Median	Rang
Ht 6h	14,7	70,2	35784,3	27892,2	78,0	122,0	0,0	0,0	4,4	5,7
Ht 24h	15,7	49,2	34543,3	9204,6	80,0	148,0	0,0	1,0	1,9	4,1
Ht 6h 100	10,5	62,8	24669,2	21619,5	56,0	82,2	2,5	6,0	0,0	4,6
Ht 24h 100	32,5	46,0	29971,5	15320,7	70,0	44,1	3,0	3,0	0,0	4,1
Ht 6h 200	12,6	24,1	24020,7	10657,5	77,0	60,0	0,0	5,0	3,8	4,2
Ht 24h 200	22,0	27,2	21027,9	19227,0	102,0	168,0	0,0	2,0	0,0	5,1
Ht 6h 400	13,6	18,8	36592,9	46893,0	125,0	224,0	0,0	4,0	0,0	4,6
Ht 24h 400	24,1	12,6	35643,9	19392,3	138,0	194,0	0,0	0,0	0,0	5,2

Representación mediante mediana y rango de cada una de las interleuquinas para cada grupo de ratas.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

TABLA 12. RESUMEN DESCRIPTIVO BASAL DEL ESTUDIO. GRADO DE ESTEATOSIS

Esteatosis	<i>Ausente -leve</i>		<i>Moderada-severa</i>	
	N	%	N	%
<i>Ht 6h</i>	5	100	0	0
<i>Ht 24h</i>	2	50	2	50
<i>Ht 6h 100</i>	4	80	1	20
<i>Ht 24h 100</i>	5	100	0	0
<i>Ht 6h 200</i>	3	60	2	40
<i>Ht 24h 200</i>	3	60	2	40
<i>Ht 6h 400</i>	4	80	1	20
<i>Ht24h 400</i>	4	80	1	20

*Representación mediante el recuento (n) y frecuencia del grado de esteatosis hepática para cada grupo de ratas. La variable ha sido recodificada en ausente-leve (<10% y 10-33%), moderada-severa (33-66% y >66%).
(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)*

TABLA 13. RESUMEN DESCRIPTIVO BASAL DEL ESTUDIO. GRADO DE INFLAMACION

Inflamación	<i>Ausente -leve</i>		<i>Moderada-severa</i>	
	N	%	N	%
<i>Ht 6h</i>	5	100	0	0
<i>Ht 24h</i>	2	50	2	50
<i>Ht 6h 100</i>	5	100	0	0
<i>Ht 24h 100</i>	5	100	0	0
<i>Ht 6h 200</i>	5	100	0	0
<i>Ht 24h 200</i>	5	100	0	0
<i>Ht 6h 400</i>	4	80	1	20
<i>Ht 24h 400</i>	5	100	0	0

Representación mediante el recuento (n) y frecuencia del grado de inflamación hepática para cada grupo de ratas. La variable ha sido recodificada en ausente-leve (0focos y <2focos), moderada-severa (2-4focos y >4focos).

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

TABLA 14. RESUMEN DESCRIPTIVO BASAL DEL ESTUDIO. LESION HISTOPATOLOGICA

Lesión Histopatológica	Ausente -leve		Moderada-severa	
	N	%	N	%
Ht 6h	5	100	0	0
Ht 24h	2	50	2	50
Ht 6h 100	5	100	0	0
Ht 24h 100	5	100	0	0
Ht 6h200	5	100	0	0
Ht 24h200	3	60	2	50
Ht 6h400	5	100	0	0
Ht 24h400	5	100	0	0

Representación mediante el recuento (n) y frecuencia del grado de lesión histopatológica hepática para cada grupo de ratas siendo recodificada la variable en ausente-leve, moderada-severa.

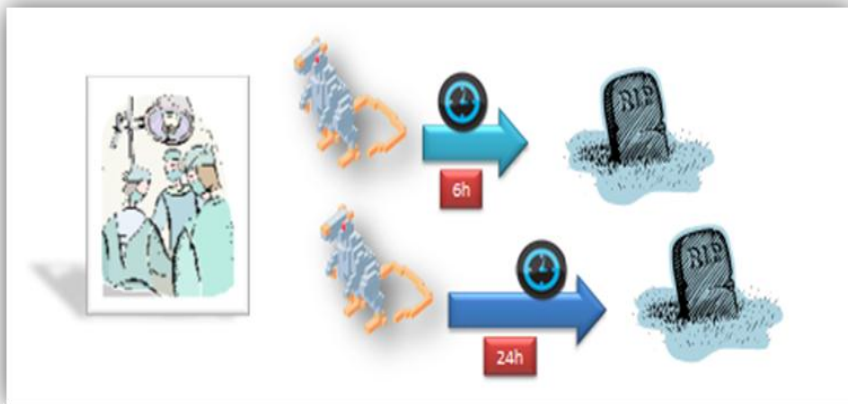
(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

RESULTADOS

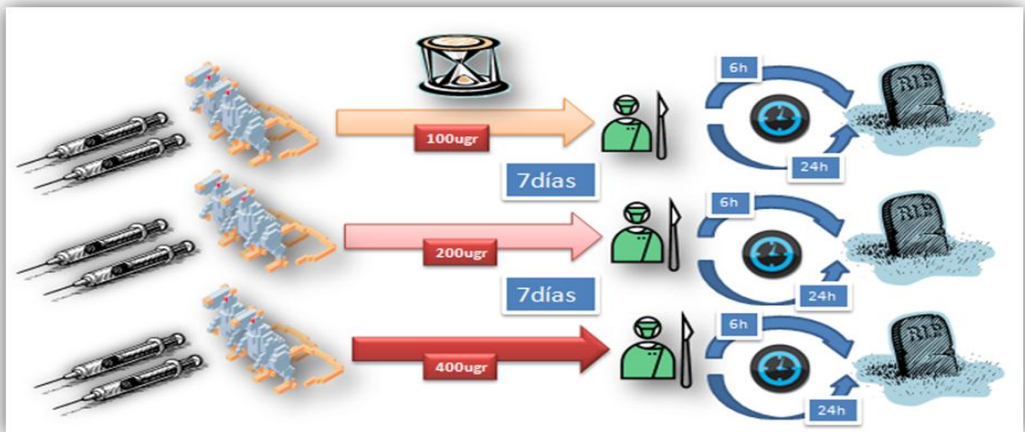
Estudio del efecto del Bevacizumab en el hígado sin hepatectomía

b.- Influencia del Bevacizumab sobre el hígado de los animales no sometidos a hepatectomía (basales y operación simulada)

b.1. Comparación estadística de las variables cuantitativas proliferación hepatocitaria, estrés oxidativo, perfil hepático y citoquinas, de ratas Wistar no sometidas a hepatectomía y a las que no se les administra Bevacizumab, con aquellas a las que se les administra el antiangiogénico



&



• Proliferación hepatocitaria y estrés oxidativo

* Anexo tabla resultados: Tabla 15

Bromodesoxiuridina

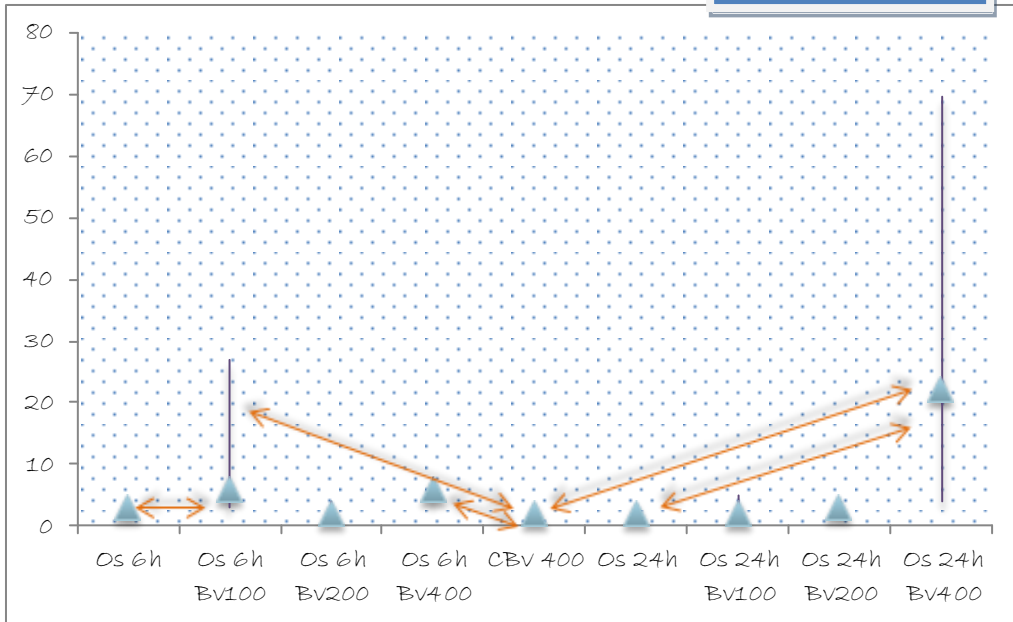


Figura 36. Diagrama comparando la proliferación hepatocitaria entre grupos

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)
 *Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de la proliferación hepatocitaria tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

- ~ El número de célula BrdU positivas es significativamente mayor en el grupo al que se le administra 100µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 6h, respecto al grupo control (Os 6h).
- ~ El número de célula BrdU positivas es significativamente mayor en el grupo al que se le administra 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 24h, respecto al grupo control (Os 24h).
- ~ Así mismo se observa que la proliferación hepatocitaria es significativamente mayor en los grupos Os 6h Bv 100 y 400µgr y Os 24h 400µgr, respecto al grupo control sin cirugía Bv 400µgr.

* Anexo tabla resultados: Tabla 16

Indice de estrés oxidativo
GSH/GSSG

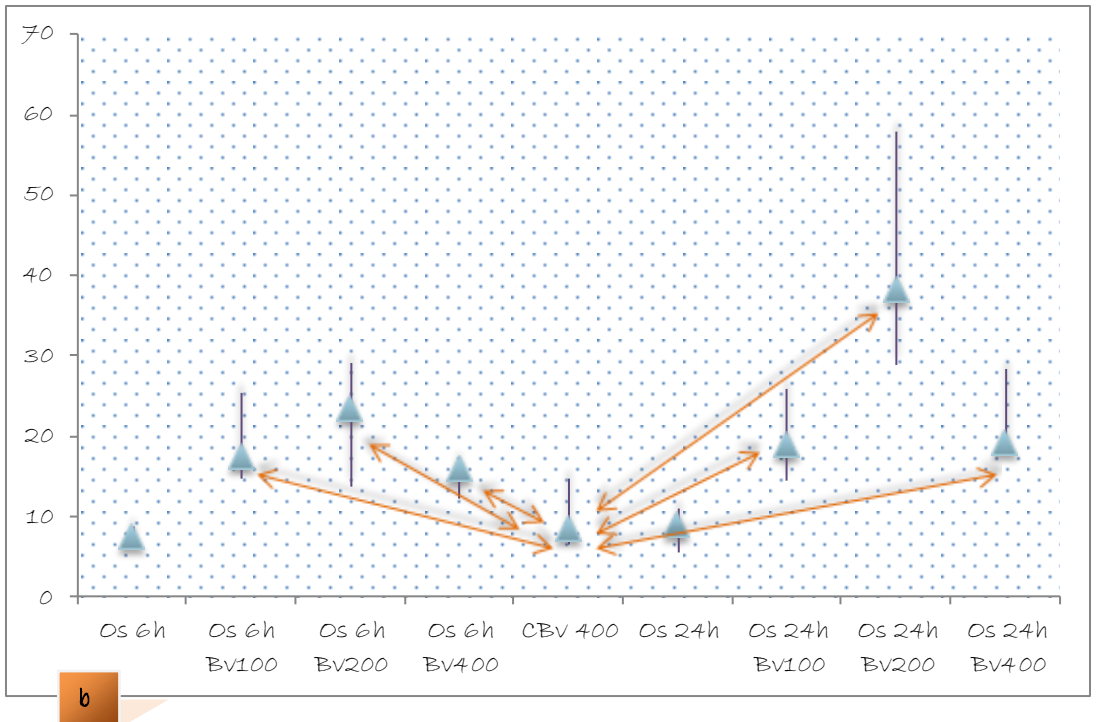
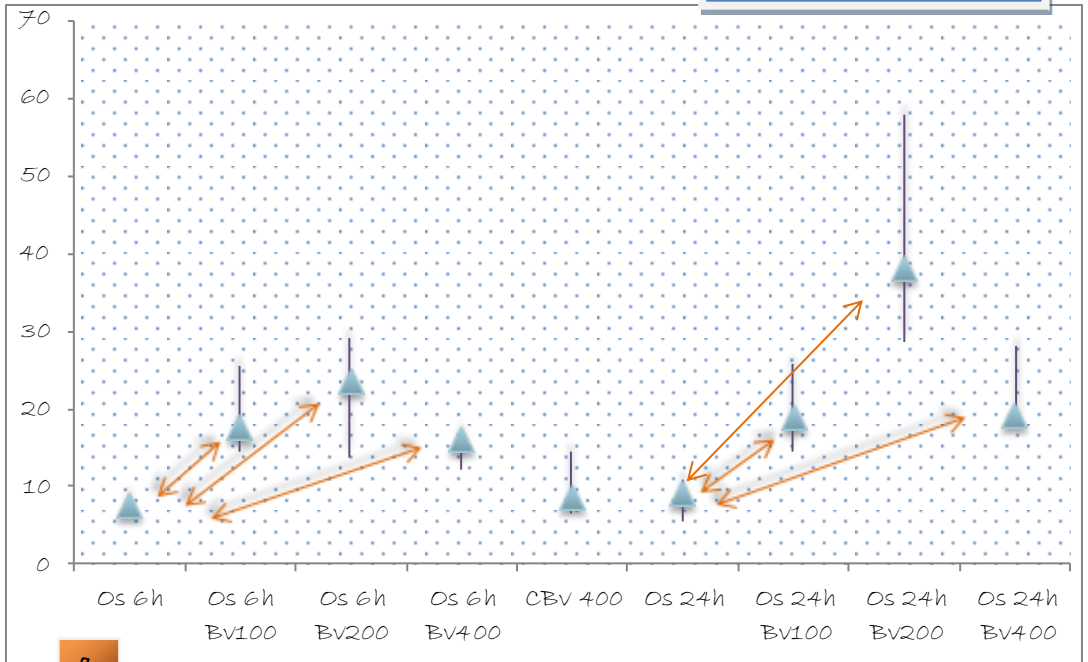


Figura 37. Diagramas comparando el índice de estrés oxidativo entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis del índice de estrés oxidativo tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

Diagrama a...

≈ El índice de estrés oxidativo es significativamente menor (cociente GSH/GSSG aumentado y por lo tanto menor glutatión oxidado) en los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 6h, respecto al grupo control (Os 6h).

≈ El índice de estrés oxidativo es significativamente menor en los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía con posterior sacrificio a las 24h, respecto a su grupo control (Os 24h).

Diagrama b...

≈ Se observa que el cociente GSH/GSSH es significativamente mayor en los grupos Os 6h Bv 100, 200 y 400µgr y por lo tanto menor es el índice de estrés oxidativo, respecto al grupo control sin cirugía Bv 400µgr.

≈ Así mismo se observa que el índice de estrés oxidativo es significativamente menor en los grupos Os 24h 100, 200 y 400µgr respecto al grupo control sin cirugía Bv 400µgr.

* Anexo tabla resultados: Tabla 17

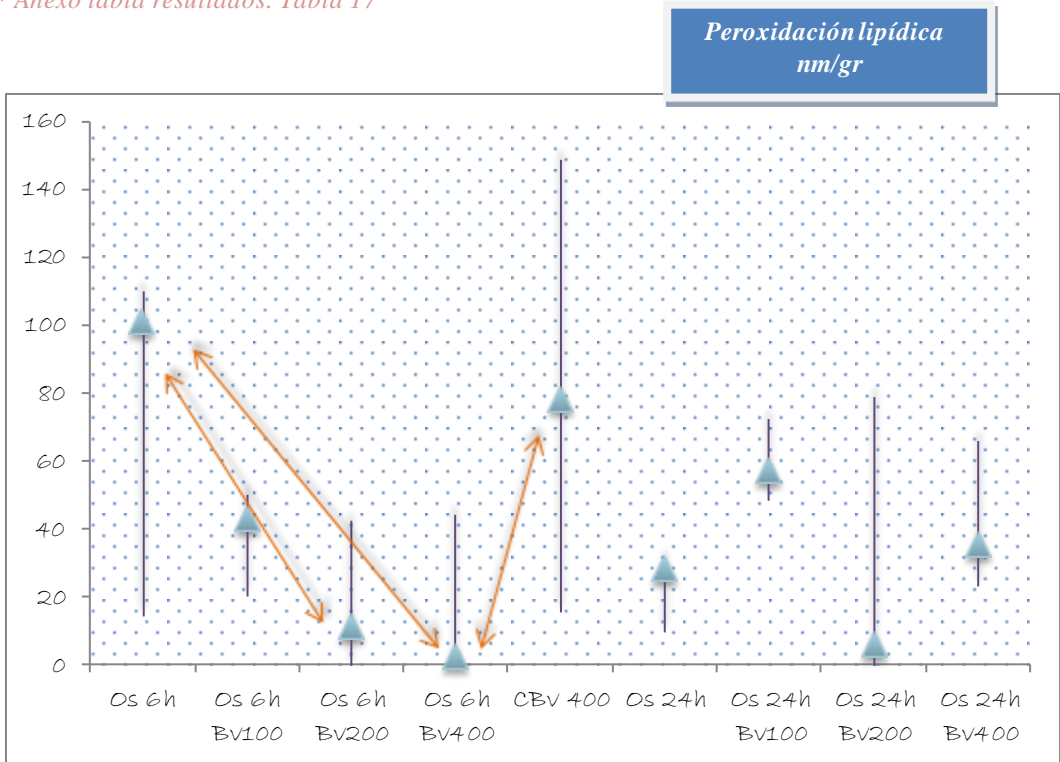


Figura 38. Diagrama comparando TBARS entre grupos (sustancias derivadas de la peroxidación lipídica).
 (Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)
 *Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de los TBARS tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

- ≈ El estrés oxidativo medido de forma indirecta mediante las sustancias derivadas de la peroxidación lipídica, es significativamente menor en los grupos a los que se les administran 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 6h, respecto al grupo control (Os 6h).
- ≈ Se observa un menor estrés oxidativo con una diferencia significativa en el grupo Os 6h Bv 400µgr, respecto al grupo control sin cirugía Bv 400µgr.

* Anexo tabla resultados: Tabla 18

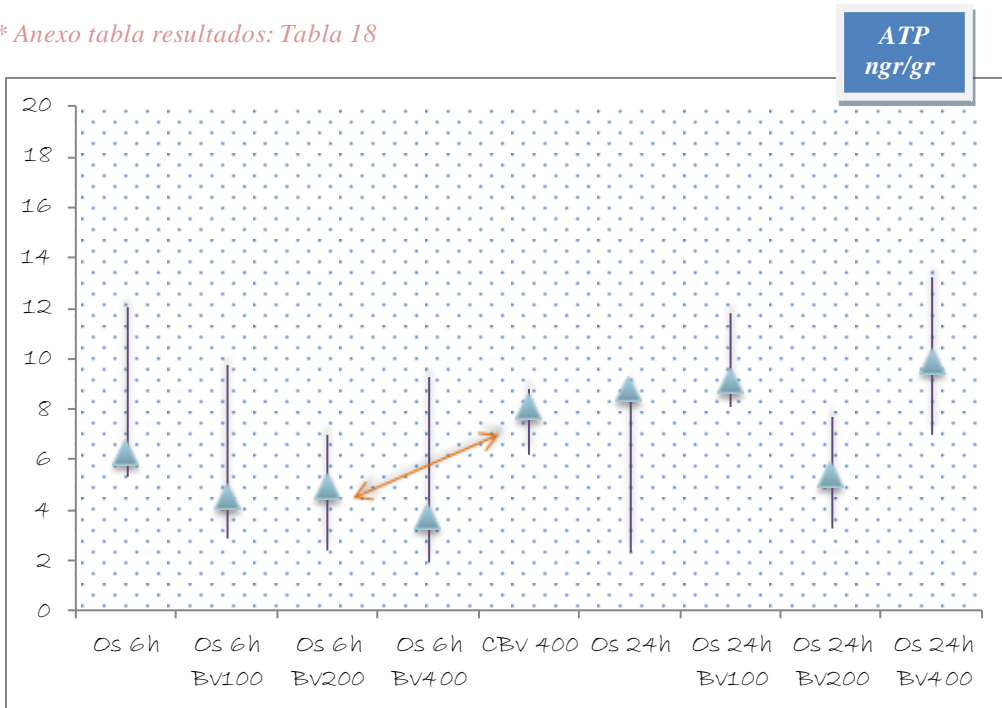


Figura 39. Diagrama comparando ATP entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBV 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de adenosín trifostato tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ El ATP es significativamente menor en el grupo al que se le administra Bv 200µgr siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 6h, respecto al grupo control sin cirugía Bv 400µgr.

• Perfil hepático

* Anexo tabla resultados: Tabla 19

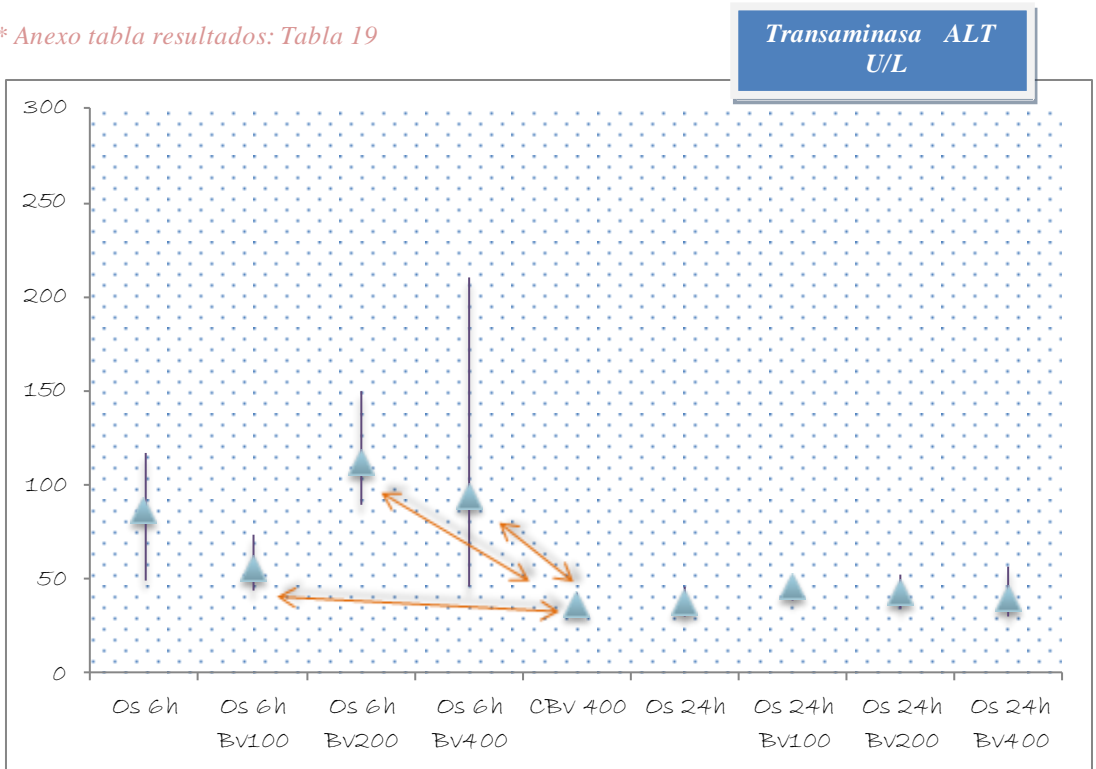


Figura 40. Diagrama comparando la transaminasa ALT entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de la transaminasa ALT tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ ALT es significativamente mayor en los grupos a los que se les administra Bv 100, 200 y 400µgr siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 6h, respecto al grupo control sin cirugía Bv 400µgr.

* Anexo tabla resultados: Tabla 20

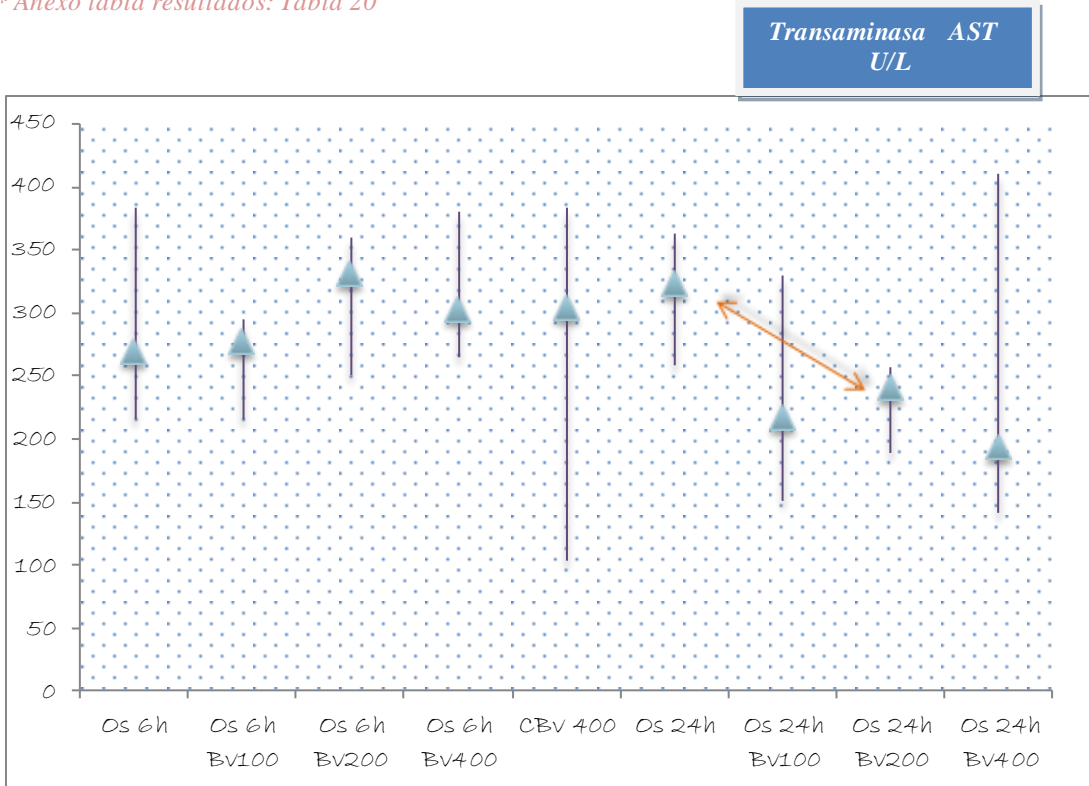


Figura 41. Diagrama comparando la transaminasa AST entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

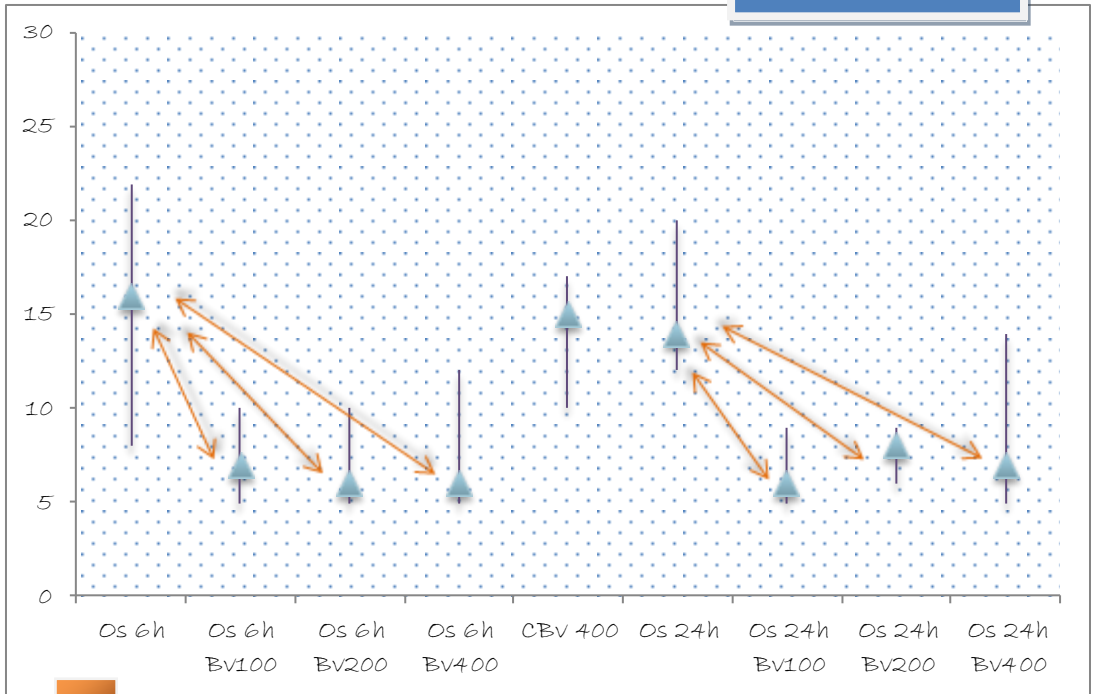
*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de la transaminasa AST tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

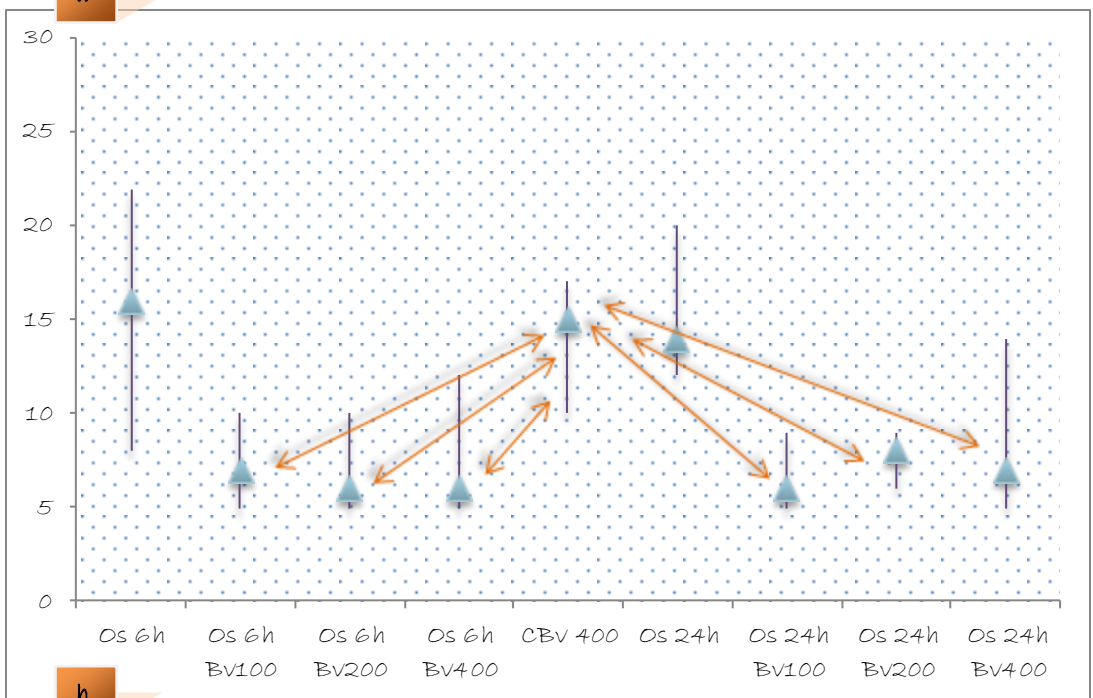
≈ AST es significativamente menor en el grupo al que se le administra 200µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 24h, respecto al grupo control (Os 24h).

* Anexo tabla resultados: Tabla 21

Fosfatasa alcalina
U/L



a



b

Figura 42. Diagramas comparando fosfatasa alcalina entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de la fosfatasa alcalina tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

Diagrama a...

≈ La FA es significativamente menor en los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 6h, respecto al grupo control (Os 6h).

≈ La FA es significativamente menor en los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía con posterior sacrificio a las 24h, respecto a su grupo control (Os 24h).

Diagrama b...

≈ Se observa que la FA es significativamente menor en los grupos Os 6h Bv 100, 200 y 400µgr, respecto al grupo control sin cirugía Bv 400µgr.

≈ Así mismo se observa que la FA es significativamente menor en los grupos Os 24h 100, 200 y 400µgr respecto al grupo control sin cirugía Bv 400µgr.

* Anexo tabla resultados: Tabla 22

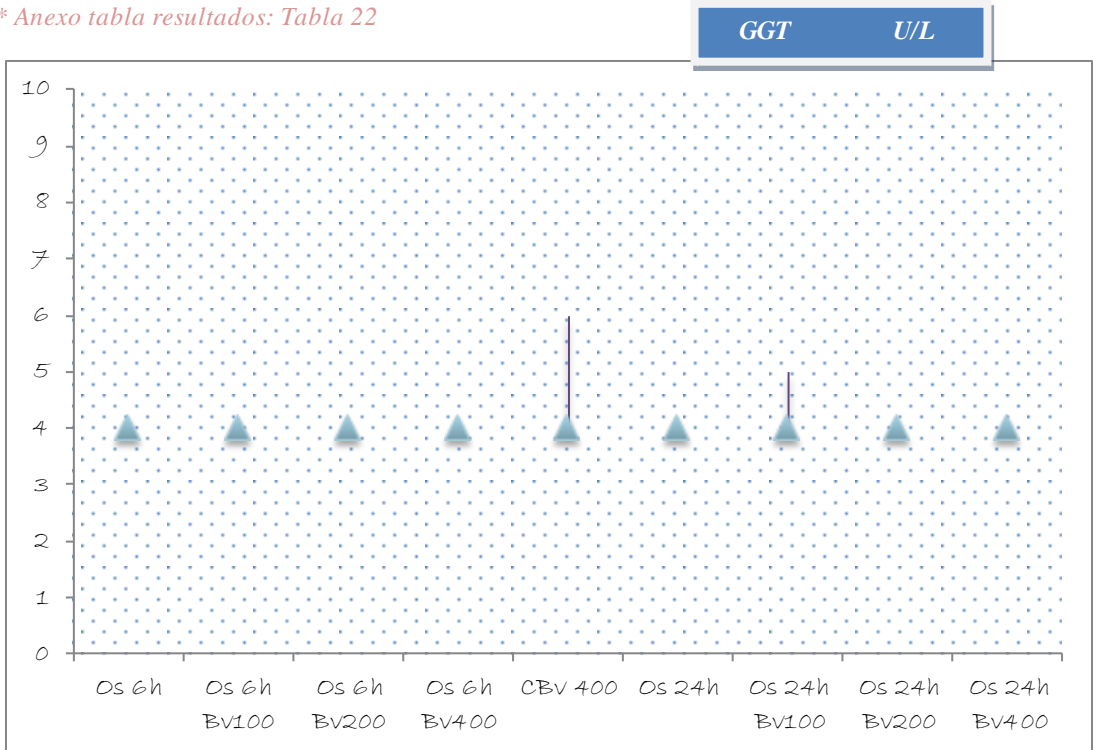


Figura 43. Diagrama comparando GGT entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

El análisis de la GGT tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 23

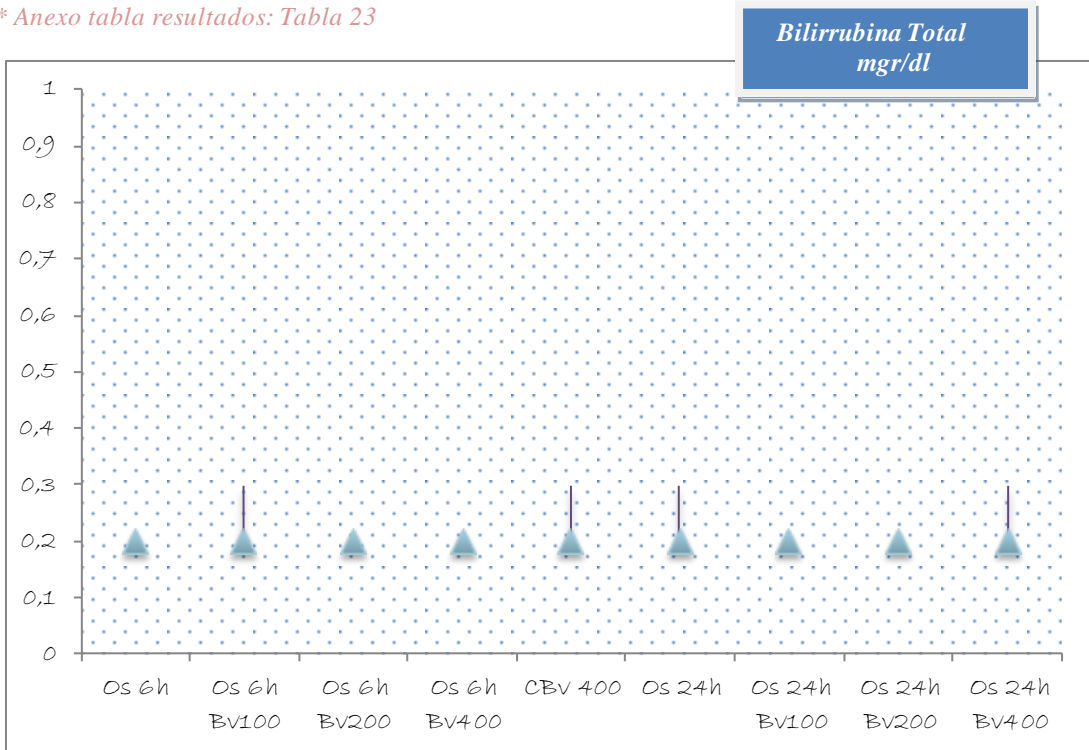


Figura 44. Diagrama comparando bilirrubina total entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBV 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

El análisis de la bilirrubina total tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 24

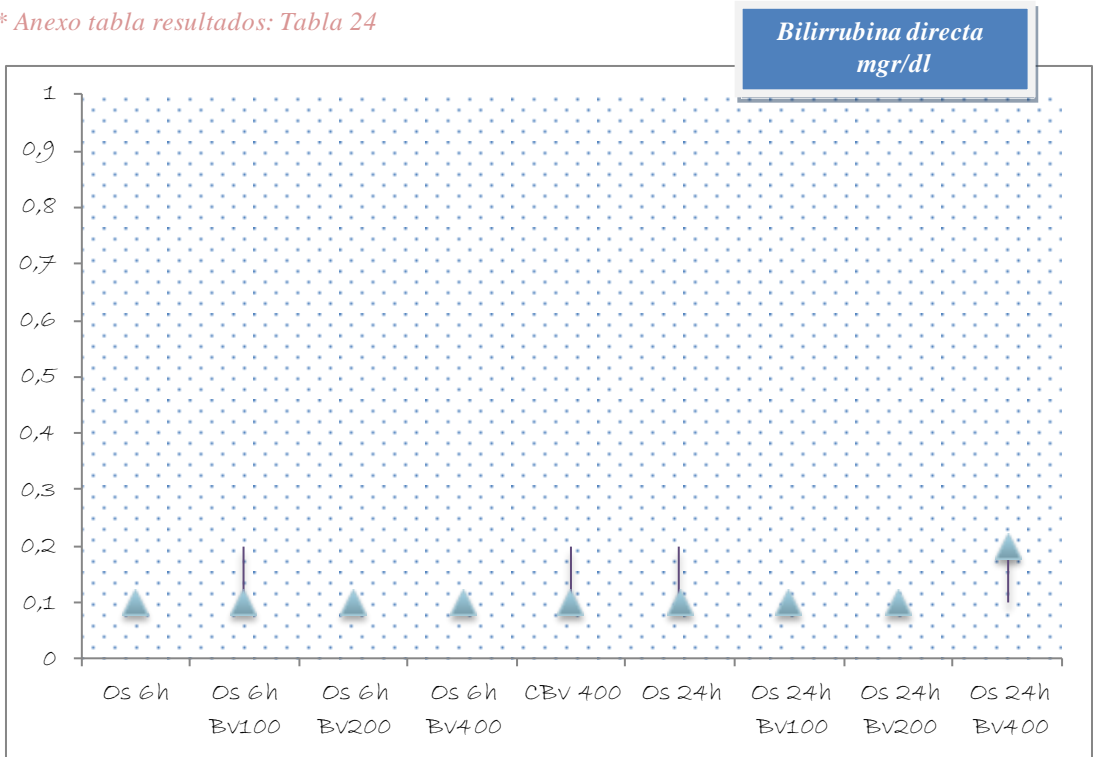


Figura 44. Diagrama comparando bilirrubina directa entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBV 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

El análisis de la bilirrubina directa tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 25

Proteínas totales
gr/dl

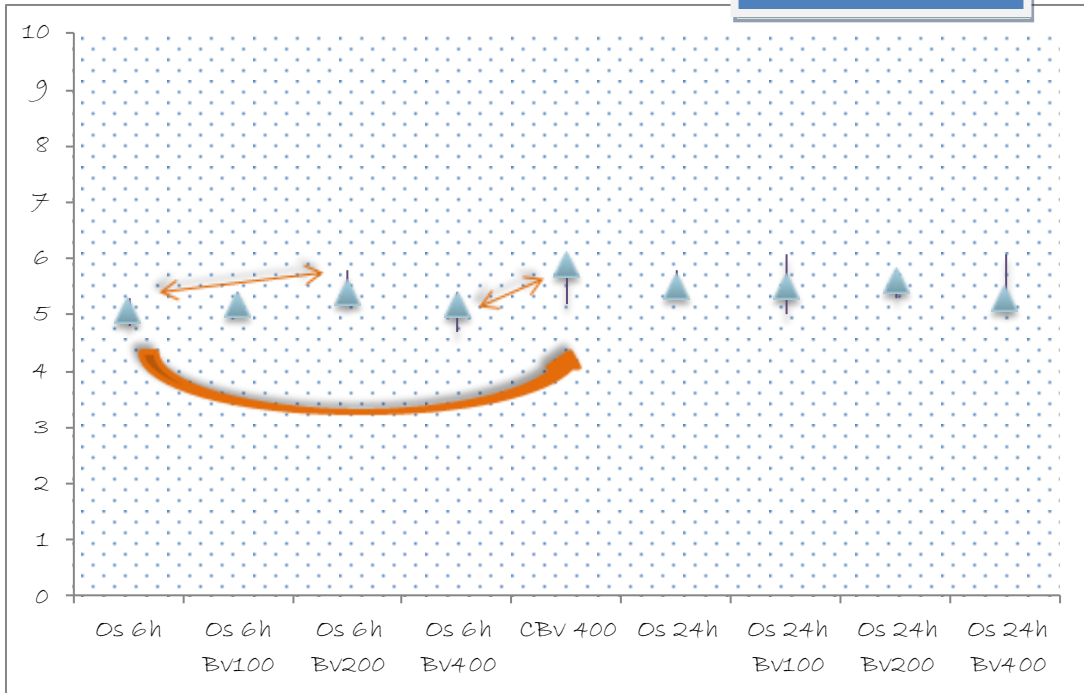


Figura 46. Diagrama comparando proteínas totales entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de las proteínas totales tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ El parámetro proteínas totales es significativamente mayor en el grupo al que se le administra 200µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 6h, respecto al grupo control (Os 6h).

≈ El parámetro proteínas totales es significativamente menor en en los grupos Os 6h y Os 6h Bv 400µgr, respecto al grupo control sin cirugía Bv 400µgr.

* Anexo tabla resultados: Tabla 26

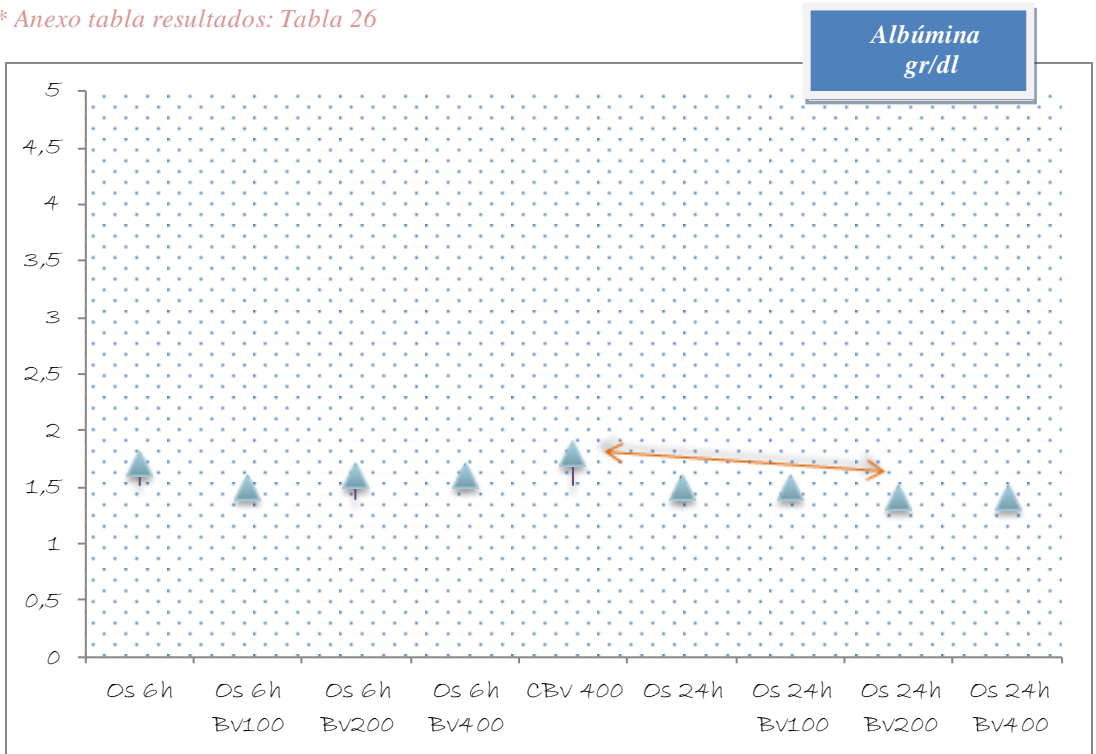


Figura 47. Diagrama comparando albúmina entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

*Las flechas representan los grupos los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de la albúmina tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ La albúmina es significativamente menor en el grupo Os 24h Bv 200µgr, respecto al grupo control sin cirugía Bv 400µgr.

* Anexo tabla resultados: Tabla 27

Creatinina
mgr/dl

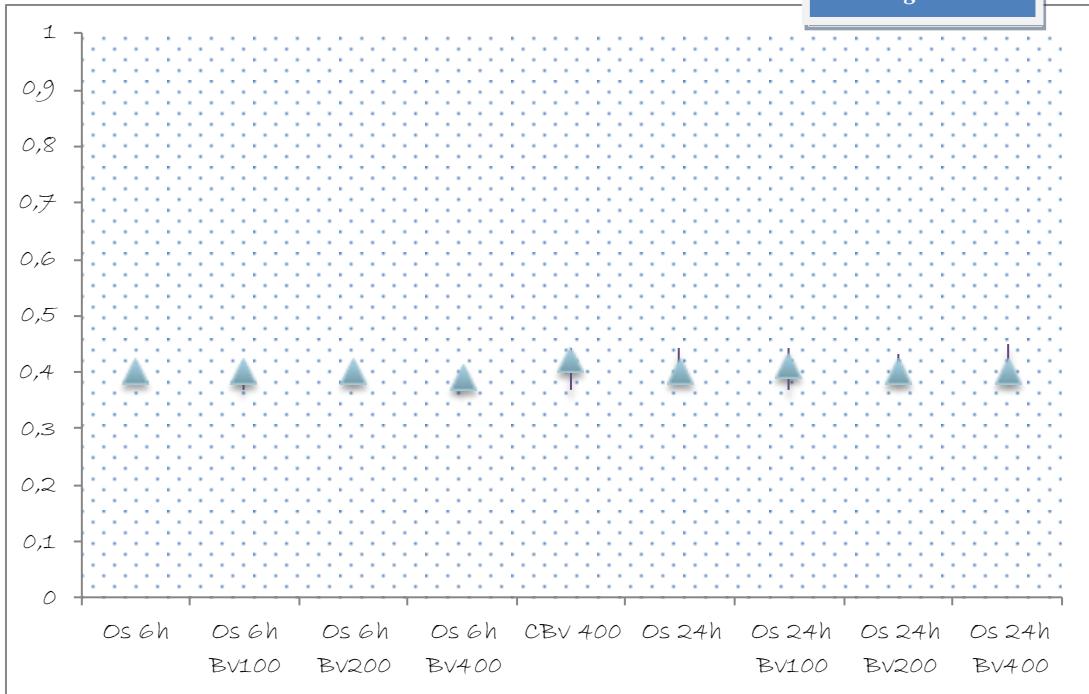


Figura 48. Diagrama comparando creatinina entre grupos.
 (Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

El análisis de la creatinina tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 28

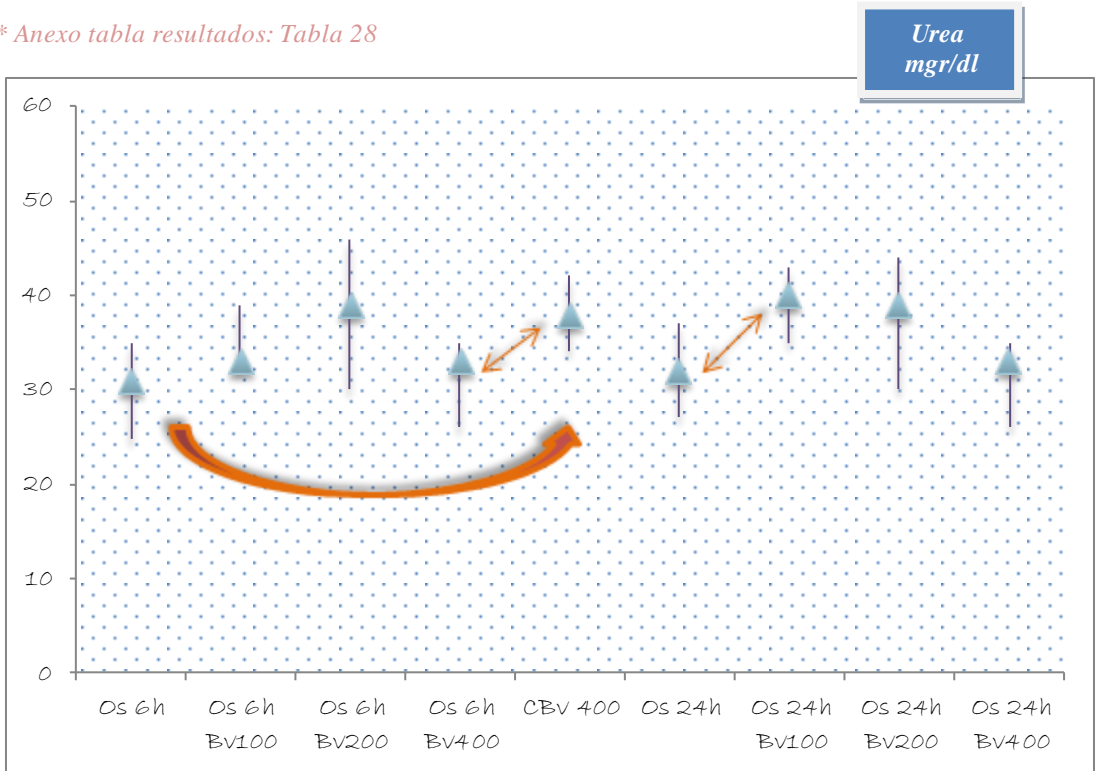


Figura 49. Diagrama comparando urea entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de la urea tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

~ La urea es significativamente mayor en el grupo al que se le administra 200µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 24h, respecto al grupo control (Os 24h).

~ Se observa que la urea es significativamente menor en los grupos Os 6h y Os 6h Bv 400µgr, respecto al grupo control sin cirugía Bv 400µgr.

• Citoquinas

* Anexo tabla resultados: Tabla 29

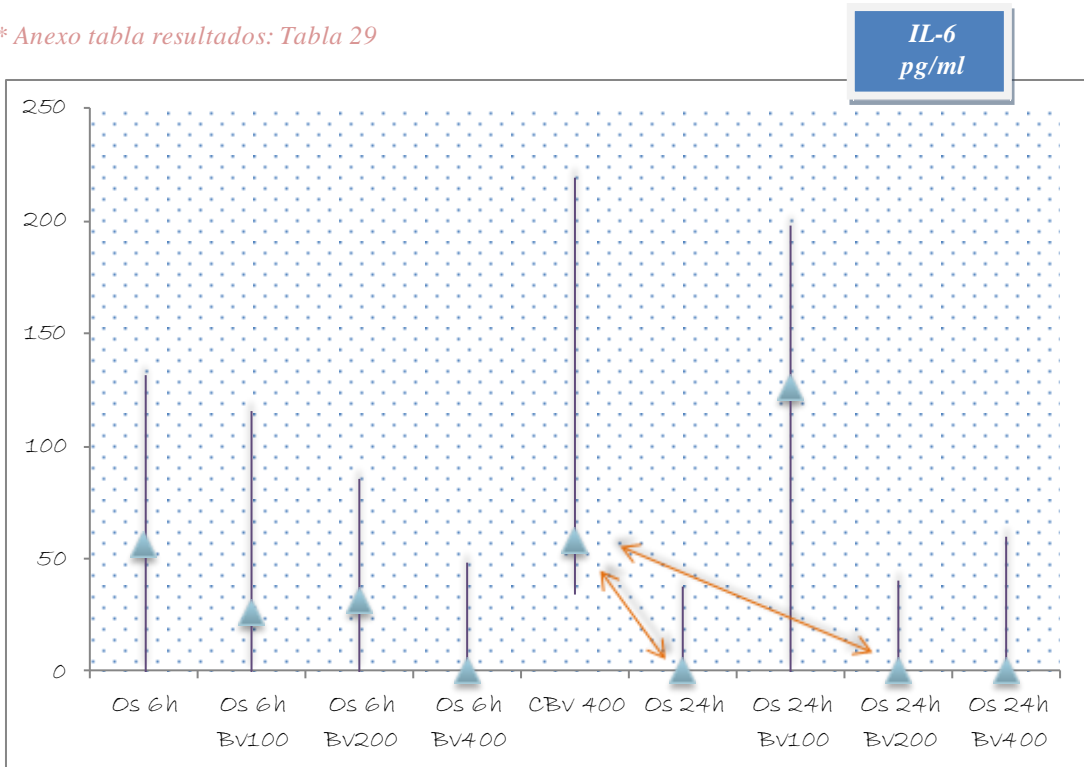


Figura 50. Diagrama comparando IL-6 entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de la IL-6 tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

~ La IL-6 es significativamente menor en los grupos Os 24h y Os 24h Bv 200µgr, respecto al grupo control sin cirugía Bv 400µgr

* Anexo tabla resultados: Tabla 30

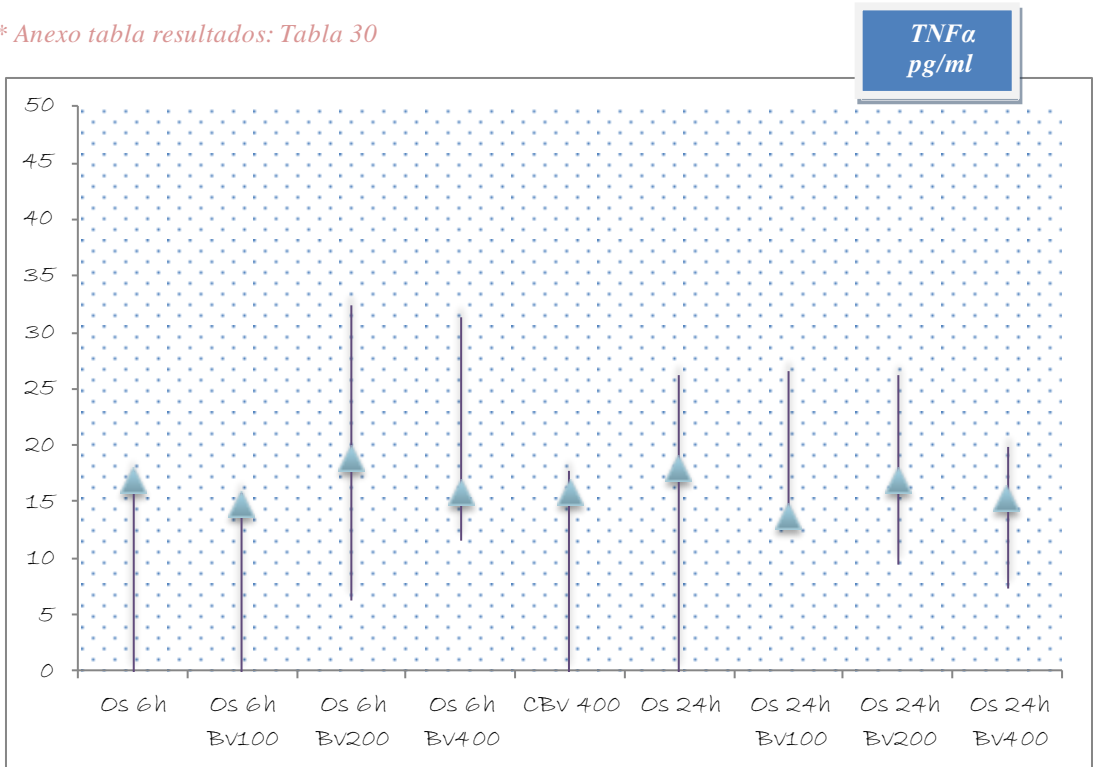


Figura 51. Diagrama comparando TNFα entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

El análisis de la citoquina TNFα tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 31

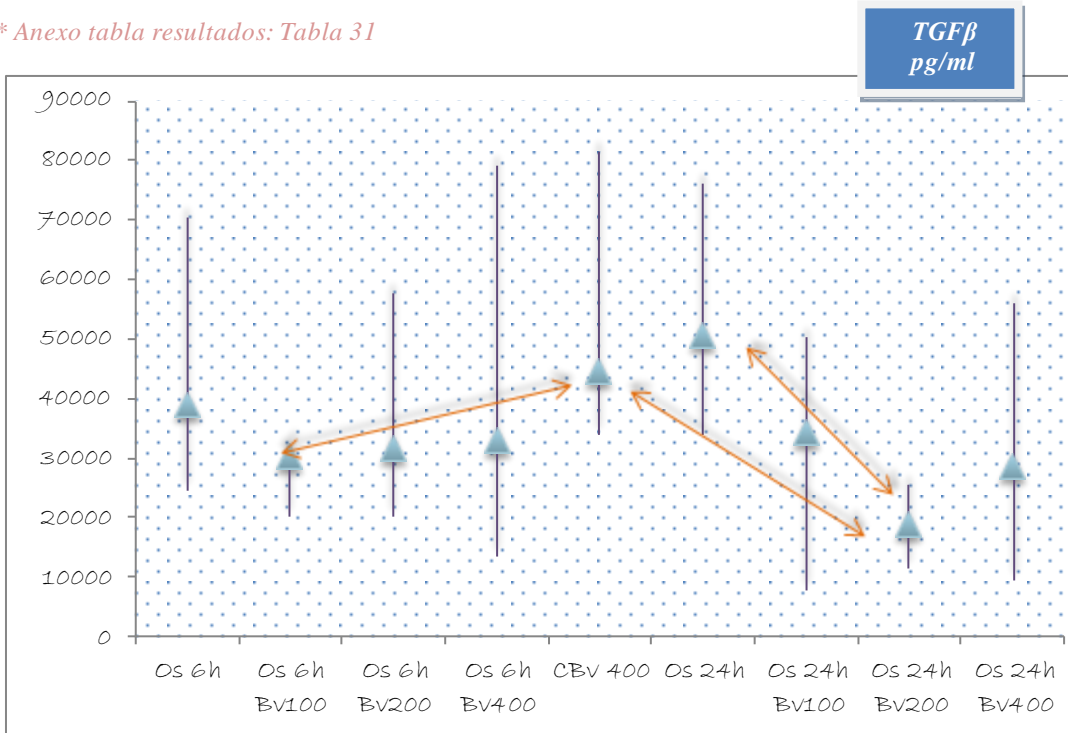


Figura 52. Diagrama comparando la citoquina TGFβ entre grupos.
 (Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)
 *Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de la citoquina TGFβ tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

- ≈ TGFβ es significativamente menor en el grupo al que se le administra 200μgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 24h, respecto al grupo control (Os 24h).
- ≈ TGFβ es significativamente menor en los grupos Os 6h Bv 100μgr y Os 24h Bv 200μgr, respecto al grupo control sin cirugía Bv 400μgr

* Anexo tabla resultados: Tabla 32

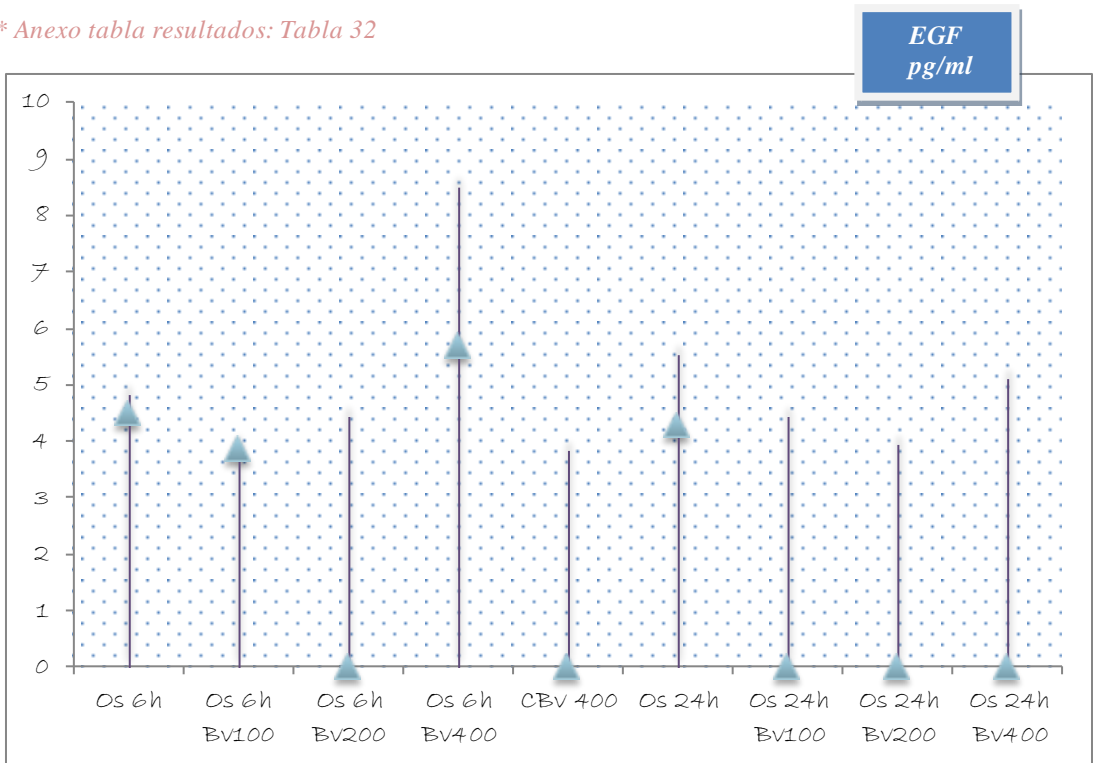


Figura 53 .Diagrama comparando EGF entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

El análisis de la citoquina EGF tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 33

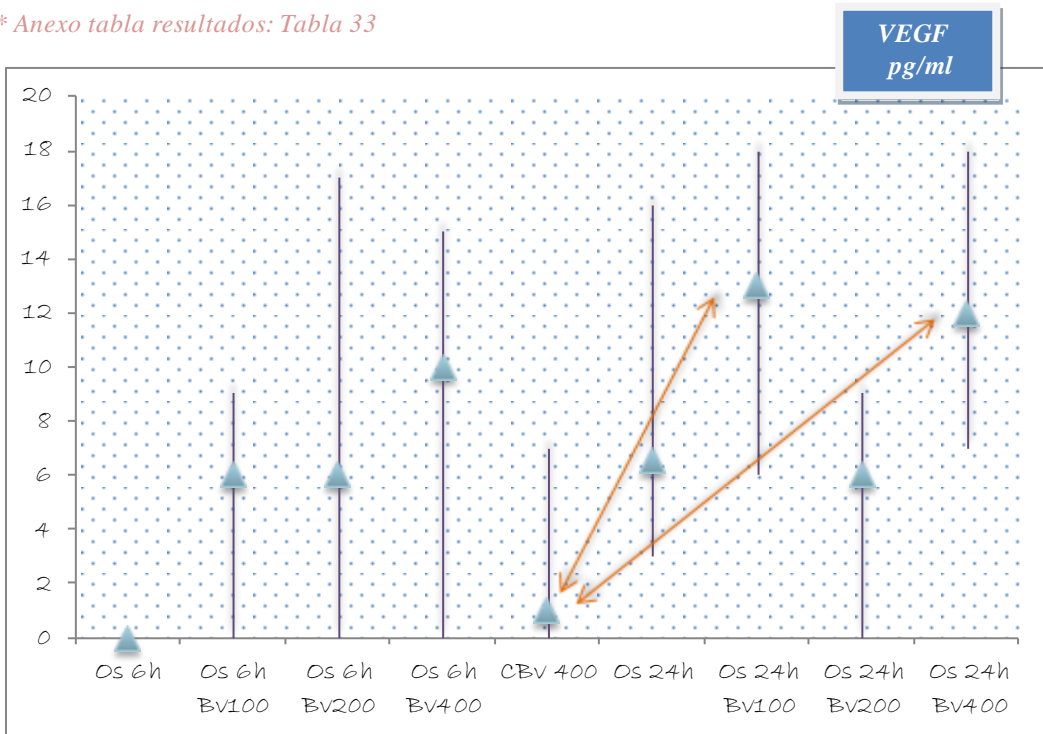
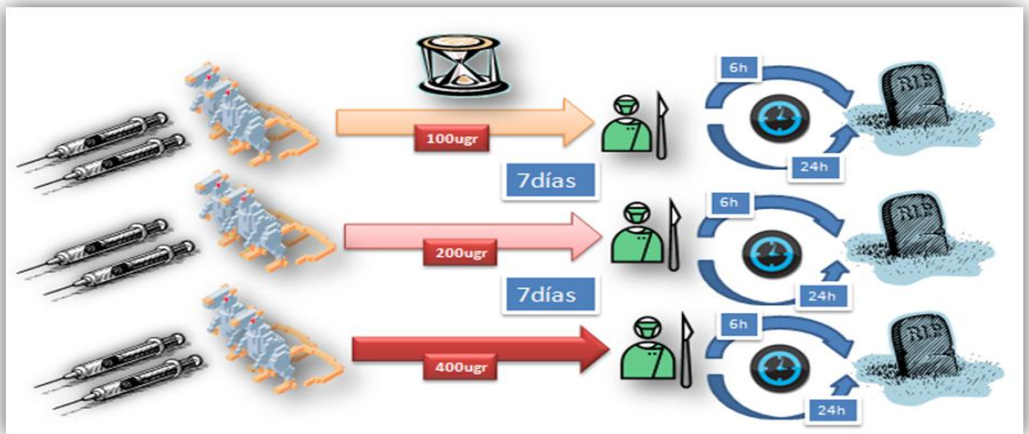


Figura 54. Diagrama comparando la citoquina VEGF entre grupos.
 (Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)
 *Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de la citoquina VEGF tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ VEGF es significativamente mayor en los grupos Os 24h Bv 100µgr y Os 24h Bv 400µgr, respecto al grupo control sin cirugía Bv 400µgr

b.2. Comparación estadística de las variables cuantitativas proliferación hepatocitaria, estrés oxidativo, perfil hepático y citoquinas, de ratas Wistar no sometidas a hepatectomía y a las que se les administra Bevacizumab (dosis basal) con aquellas a las que se les administra la mitad y el doble de la dosis del antiangiogénico



• Proliferación hepatocitaria y estrés oxidativo

* Anexo tabla resultados: Tabla 34

Bromodesoxiuridina

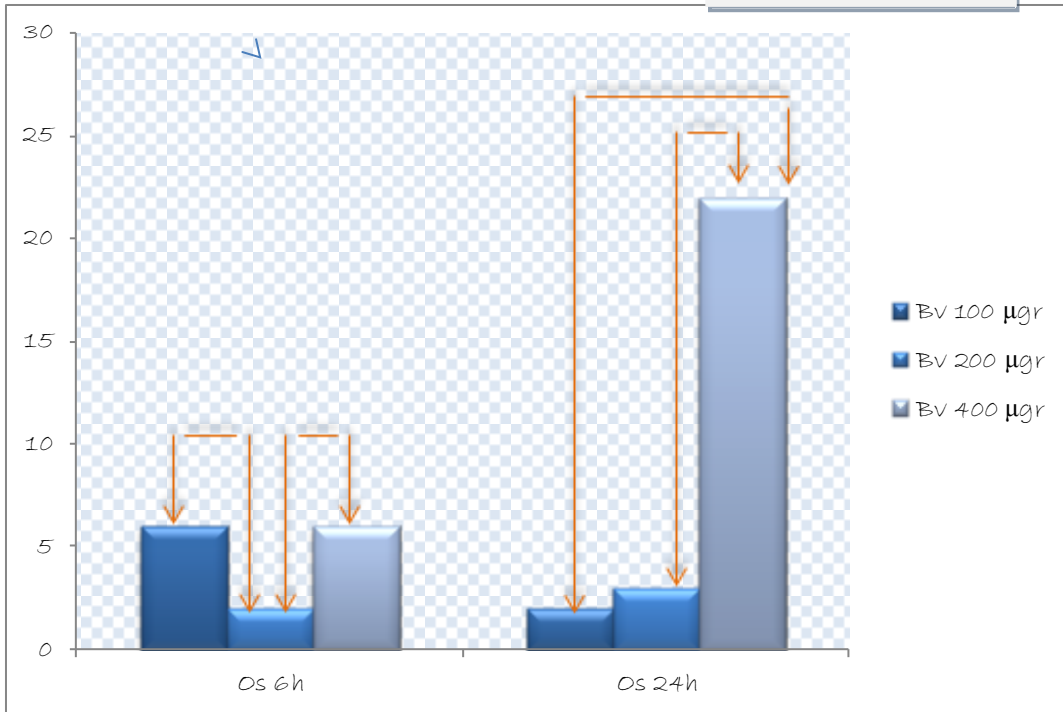


Figura 55. Diagrama comparando la proliferación hepatocitaria entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de la proliferación hepatocitaria tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

~ La proliferación hepatocitaria es significativamente mayor en los grupos a los que se les administran 100 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 6h, respecto al grupo al que se le administra la dosis basal (Os 200µgr 6h).

~ La proliferación hepatocitaria es significativamente mayor en el grupo al que se le administra 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía con posterior sacrificio a las 24h, respecto a los grupos a los que se les administran 100 y 200µgr del antiangiogénico.

* Anexo tabla resultados: Tabla 35

Indice GSH/GSSG

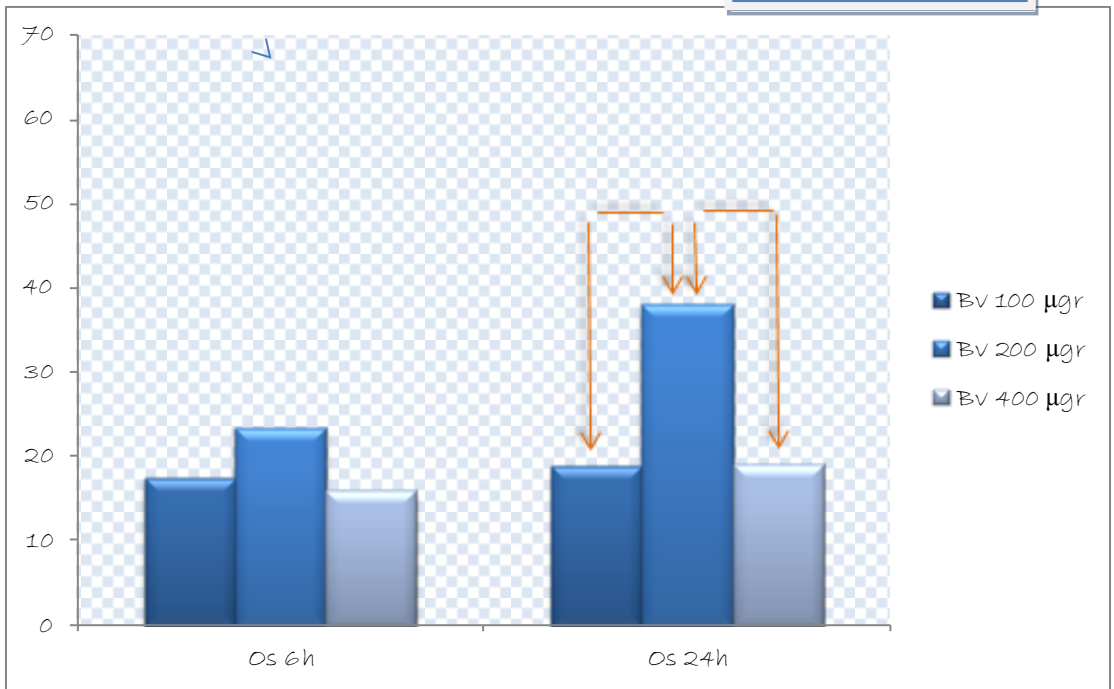


Figura 56. Diagrama comparando índice de estrés oxidativo entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico “U de Mann-Whitney”)

El análisis del índice de estrés oxidativo tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ El índice de estrés oxidativo es significativamente menor (al aumentar el cociente GSH/GSSG, disminuye el glutatión oxidado) en el grupo al que se le administra 200µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 24h, respecto a los grupos a los que se les administran 100 y 400µgr del antiangiogénico.

≈ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 36

**Peroxidación lipídica
nm/gr**

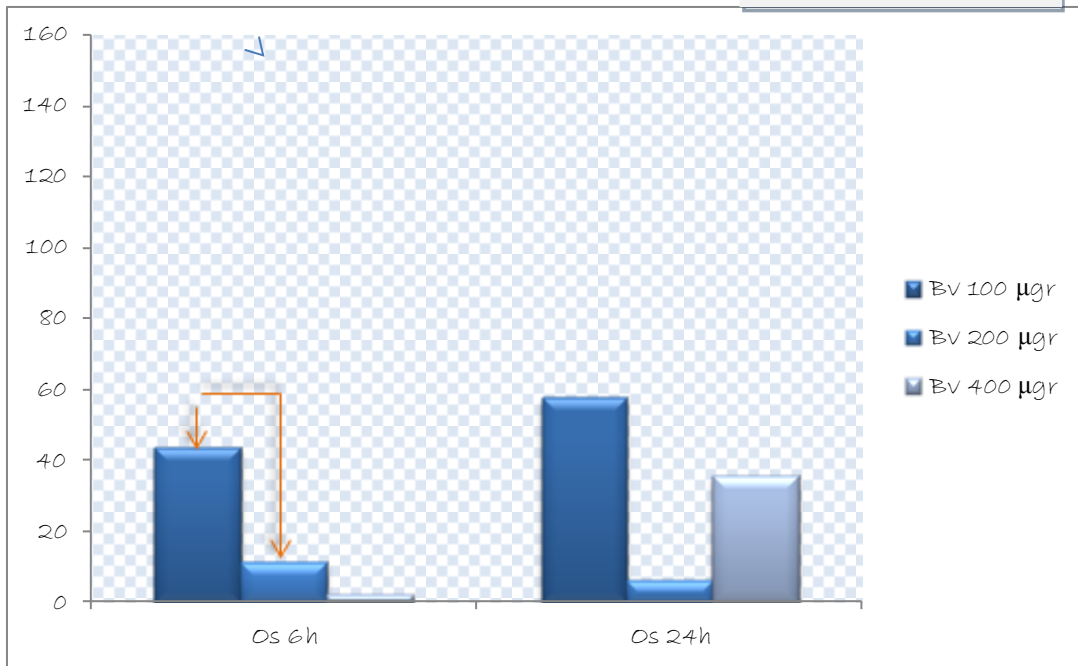


Figura 57. Diagrama comparando sustancias derivadas de la peroxidación lipídica en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de los TBARS tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ El estrés oxidativo medido de forma indirecta mediante a las sustancias derivadas de la peroxidación lipídica, es significativamente mayor en el grupo al que se le administra 100µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 6h, respecto al grupo que se le administra 200µgr del antiangiogénico.

≈ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 24h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 37

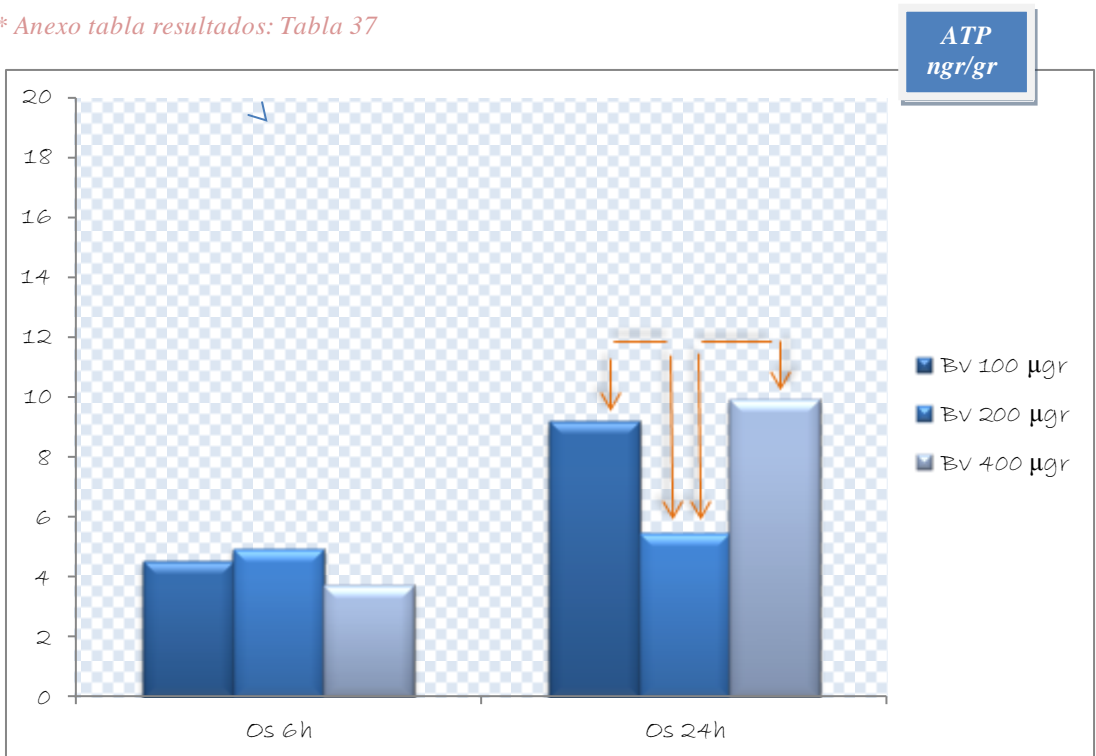


Figura 58. Diagrama comparando ATP entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis del ATP tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

~ La energía celular liberada en forma de adenosín trifosfato es significativamente menor en el grupo al que se le administra 200µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 24h, respecto a los grupos a los que se les administran 100 y 400µgr del antiangiogénico.

~ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

• Perfil hepático

* Anexo tabla resultados: Tabla 38

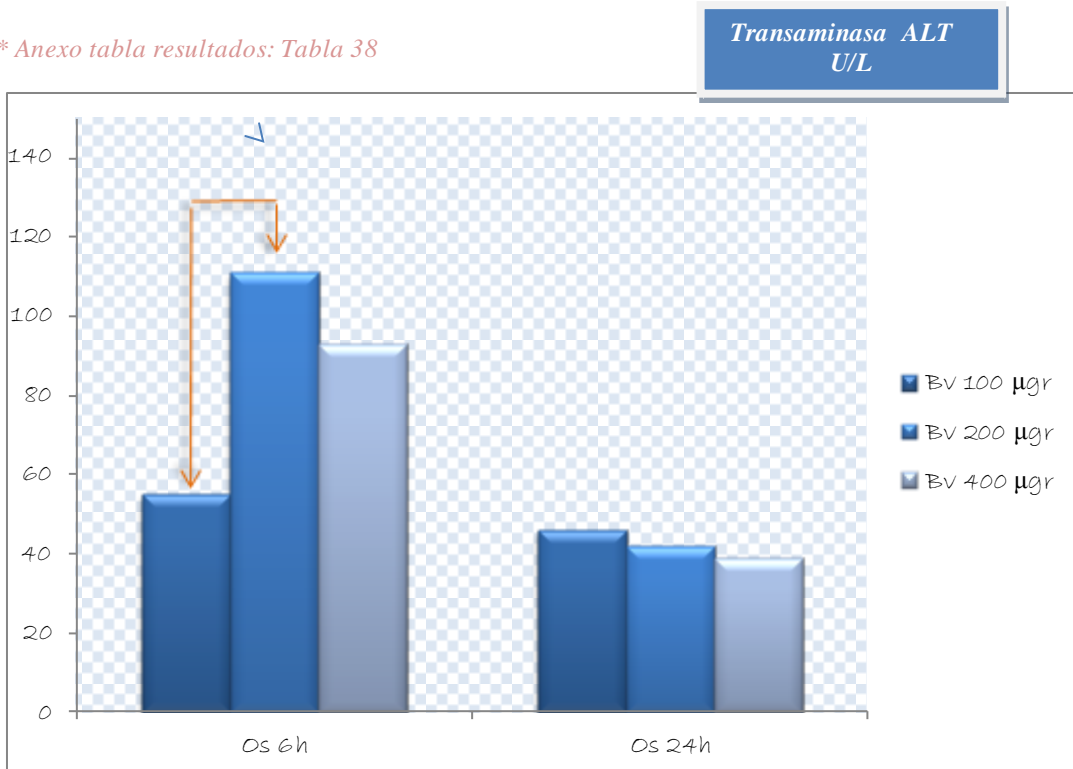


Figura 38. Diagrama comparando transaminasa ALT entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de ALT tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ ALT es significativamente mayor en el grupo al que se le administra 200µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 6h, respecto al grupo que se le administra 100µgr del antiangiogénico.

≈ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 24h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 39

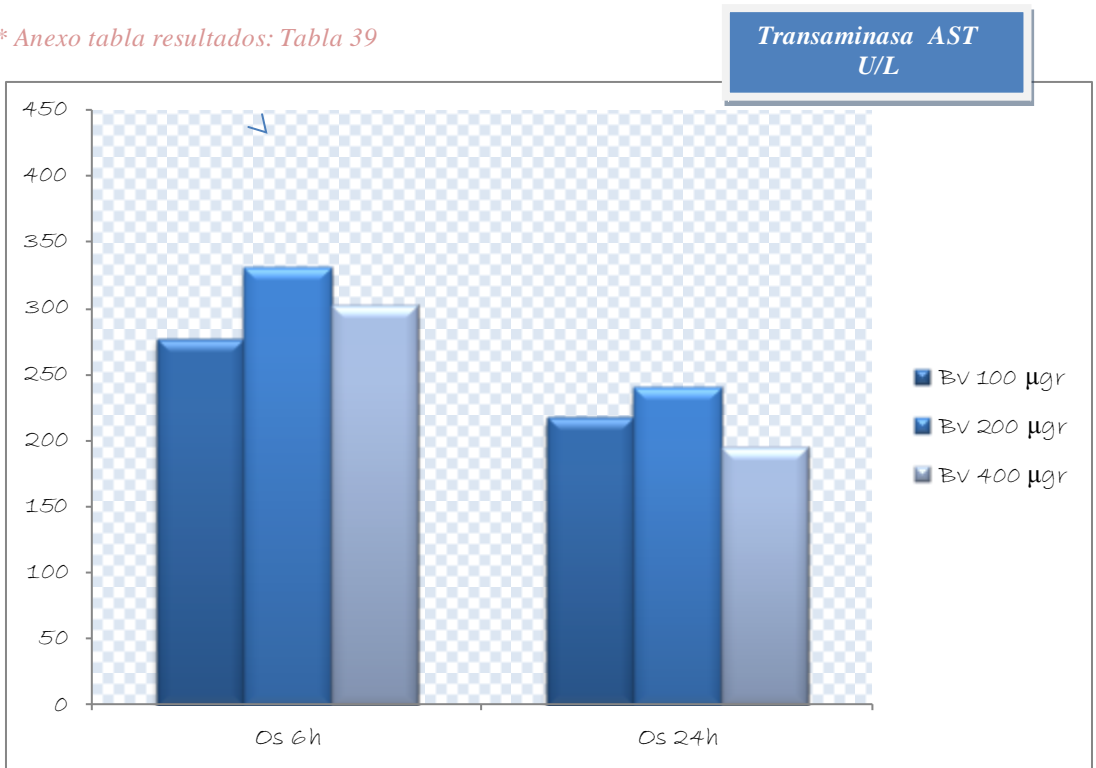


Figura 60. Diagrama comparando transaminasa AST entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

El análisis de AST tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

≈ Así mismo, no se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 24h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 40

Fosfatasa alcalina
U/L

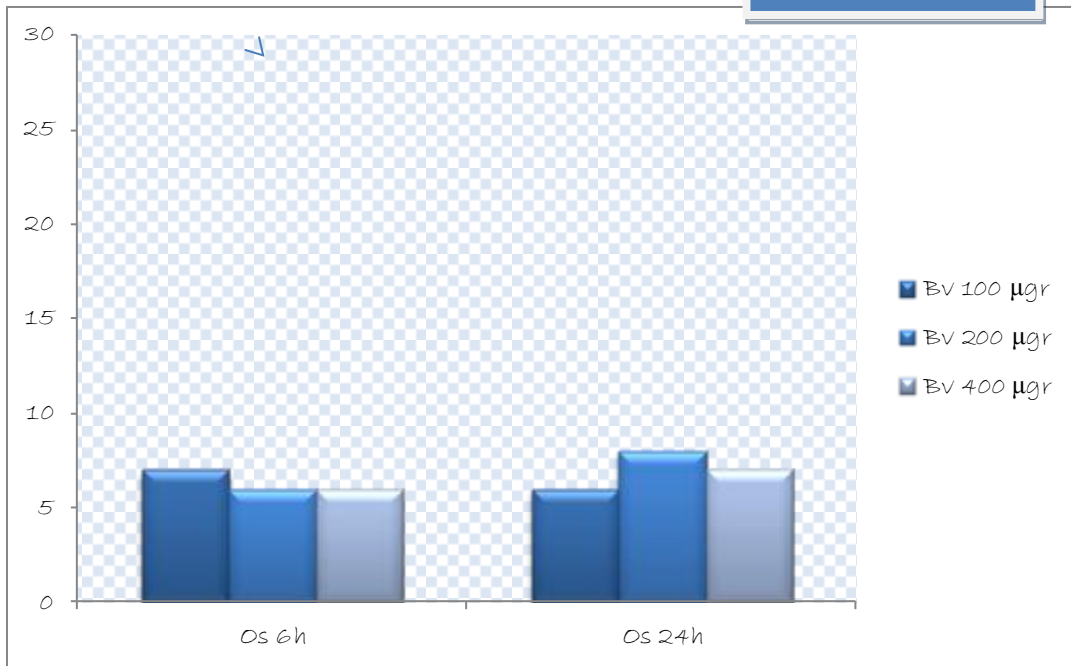


Figura 61. Diagrama comparando fosfatasa alcalina entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

El análisis de FA tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

~No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

~ Así mismo, no se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 24h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 41



Figura 62. Diagrama comparando GGT entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

El análisis de GGT tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

~No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

~Así mismo, no se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 24h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 42

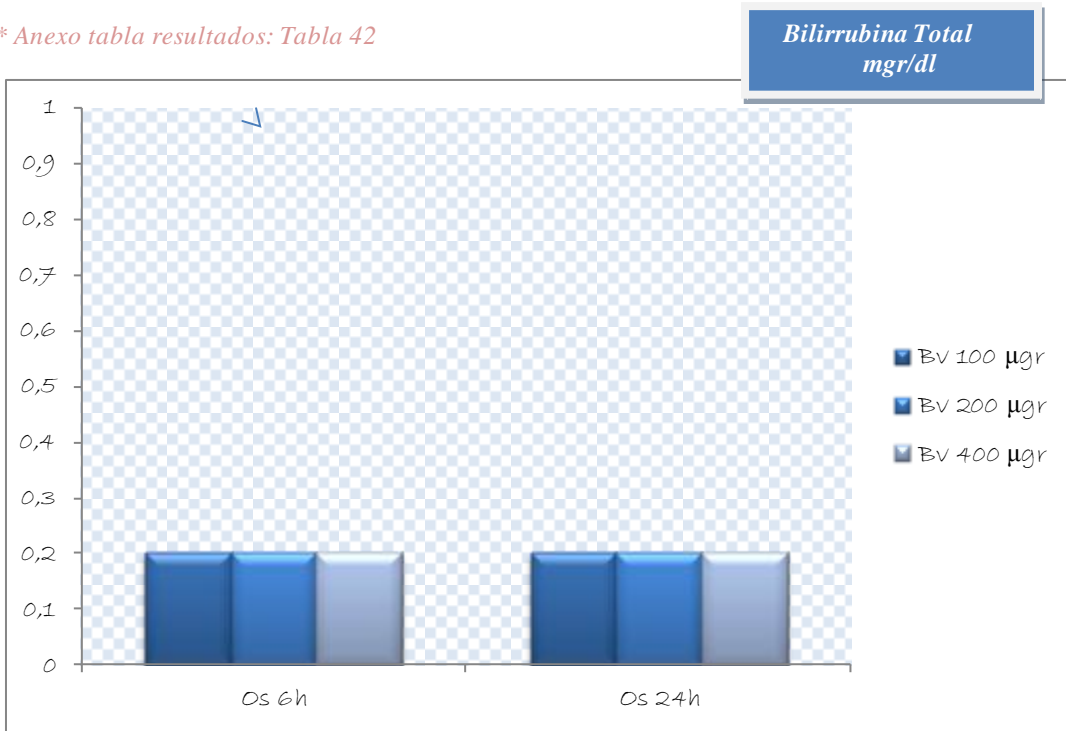


Figura 63. Diagrama comparando bilirrubina total entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.
 (Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

El análisis de BT tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

≈ Así mismo, no se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 24h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 43

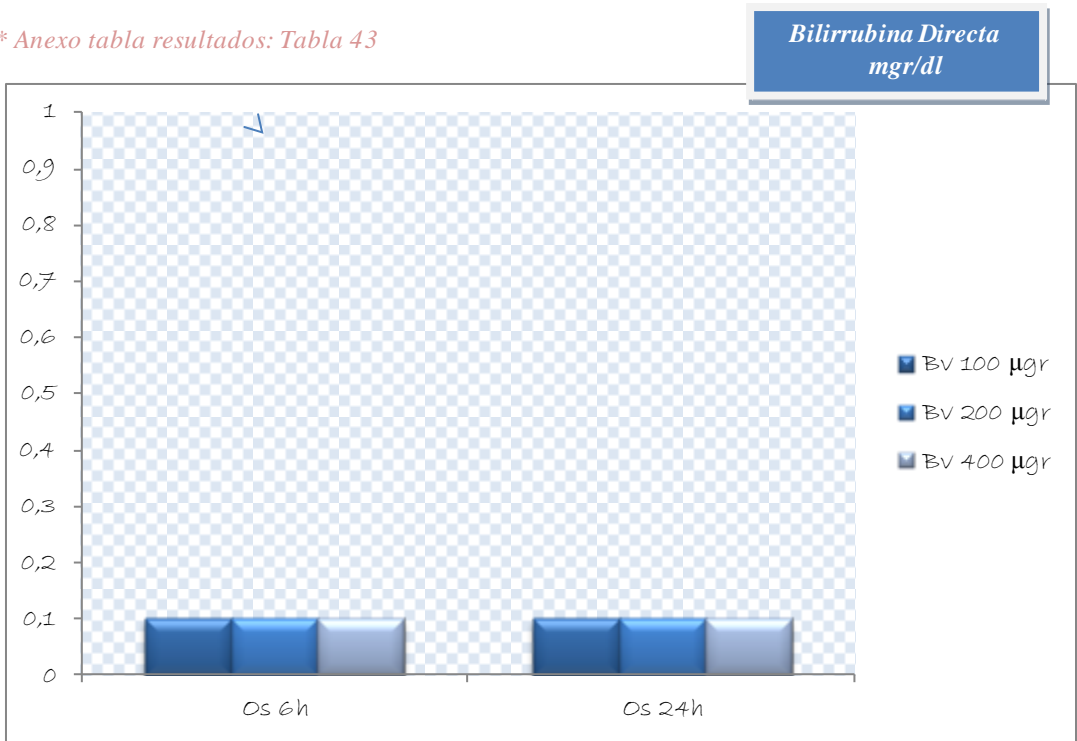


Figura 64. Diagrama comparando bilirrubina directa entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

El análisis de BD tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

≈ Así mismo, no se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 24h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 44

Proteínas totales
gr/dl

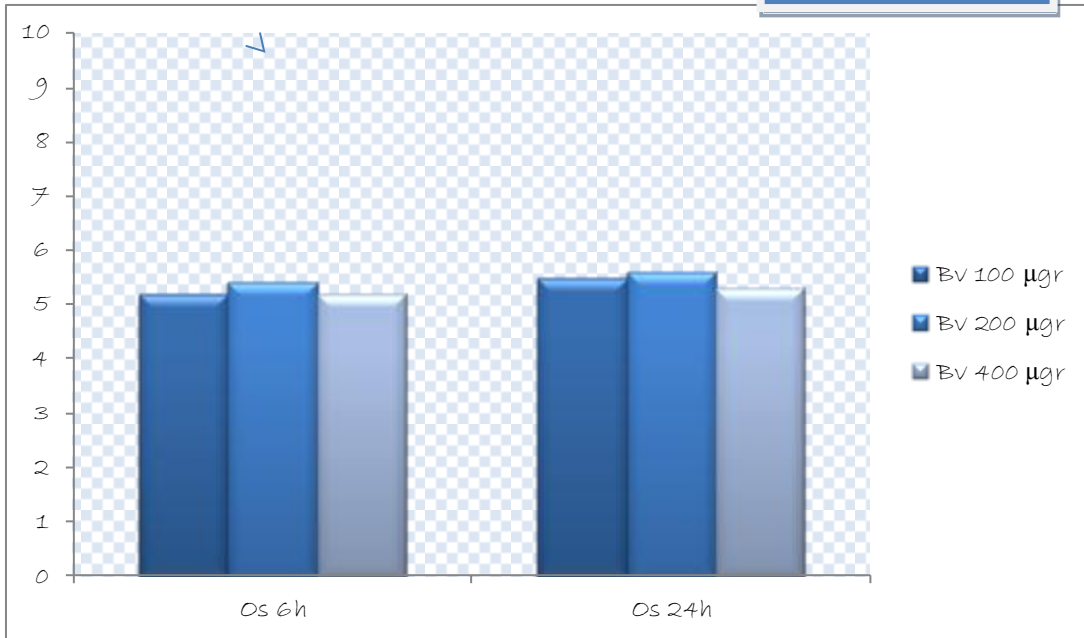


Figura 65. Diagrama comparando proteínas totales entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.
(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

El análisis de las proteínas totales tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

≈ Así mismo, no se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 24h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 45

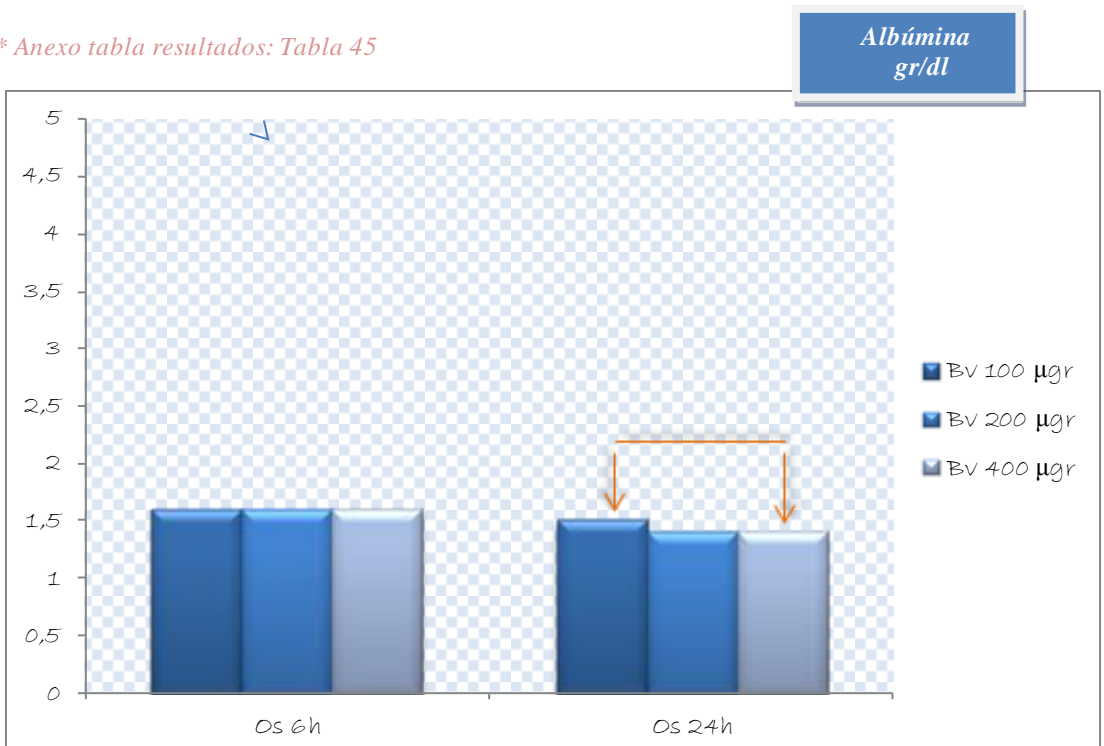


Figura 66. Diagrama comparando albúmina entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de la albúmina tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ La albúmina es significativamente mayor en el grupo al que se le administra 100µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 24h, respecto al grupo que se le administra 400µgr del antiangiogénico.

≈ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 46



Figura 67. Diagrama comparando la creatinina entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

El análisis de la creatinina tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

~ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

~ Así mismo, no se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 24h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 47

Urea
mgr/dl

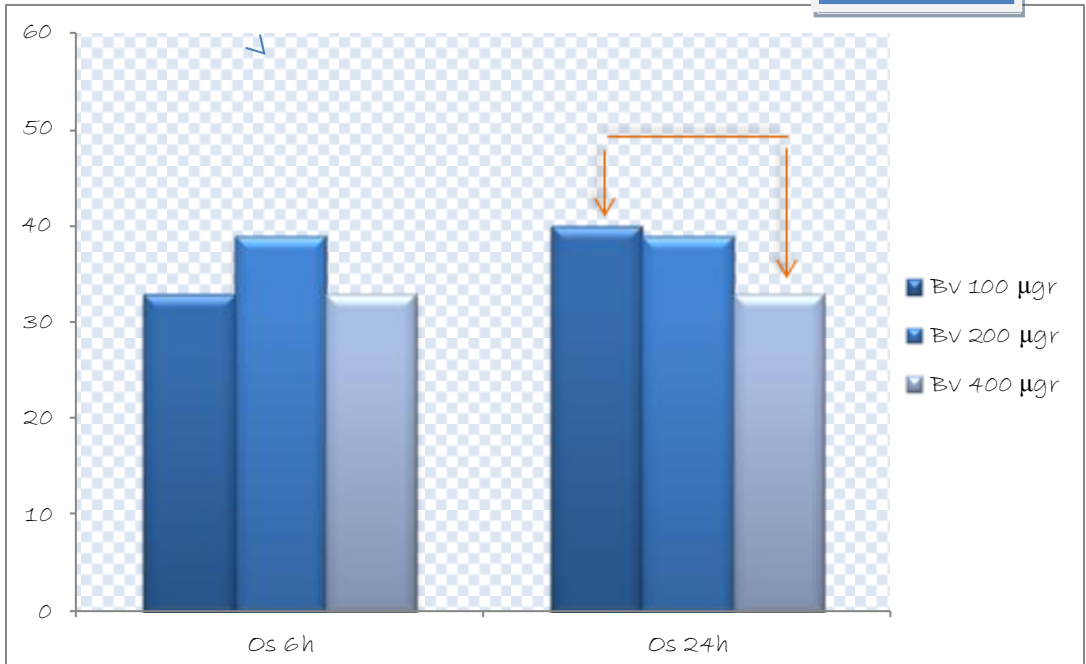


Figura 68. Diagrama comparando la urea entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney)

El análisis de la urea tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ La urea es significativamente mayor en el grupo al que se le administra 100µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 24h, respecto al grupo que se le administra 400µgr del antiangiogénico.

≈ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

9. Citoquinas

* Anexo tabla resultados: Tabla 48

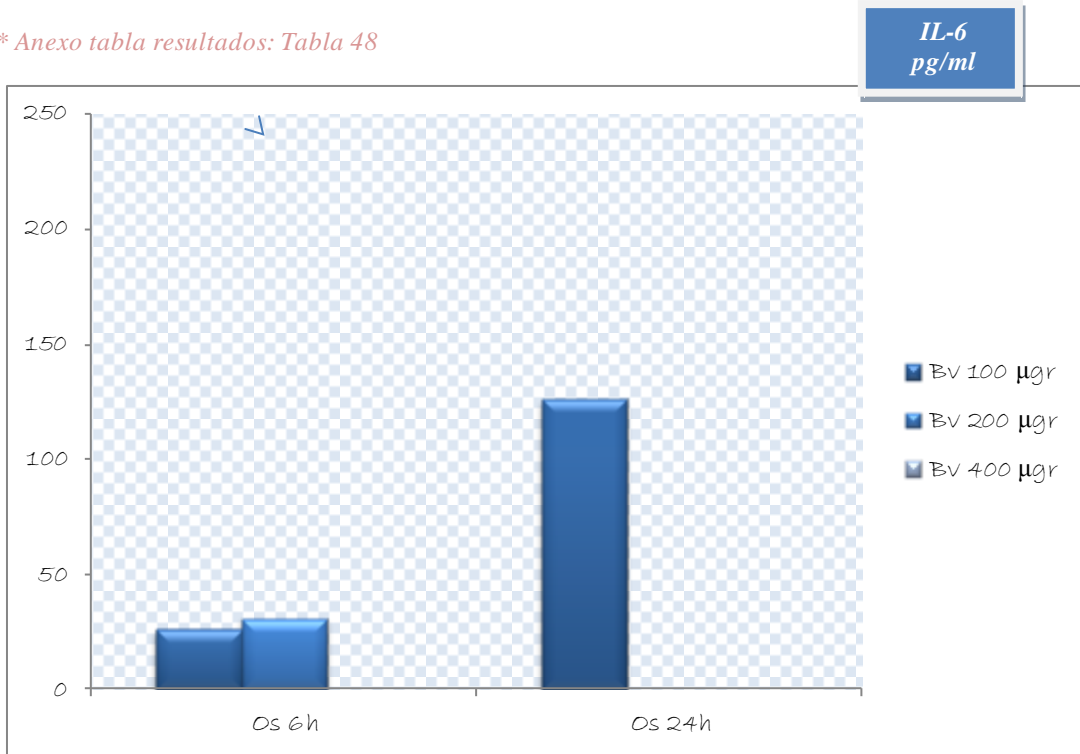


Figura 69. Diagrama comparando IL-6 entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.
 (Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

El análisis de IL-6 tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

≈ Así mismo, no se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 24h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 49

TNF α
pg/ml

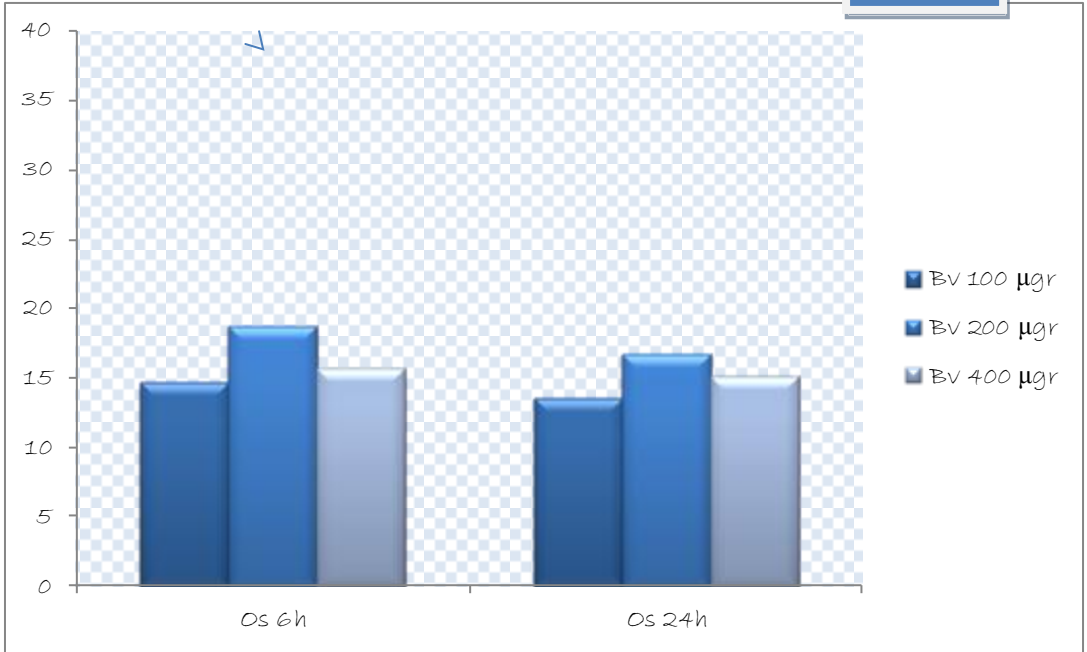


Figura 70. Diagrama comparando TNF α entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

El análisis de TNF α tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400 μ gr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

≈ Así mismo, no se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400 μ gr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 24h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 50

TGFβ
pg/ml

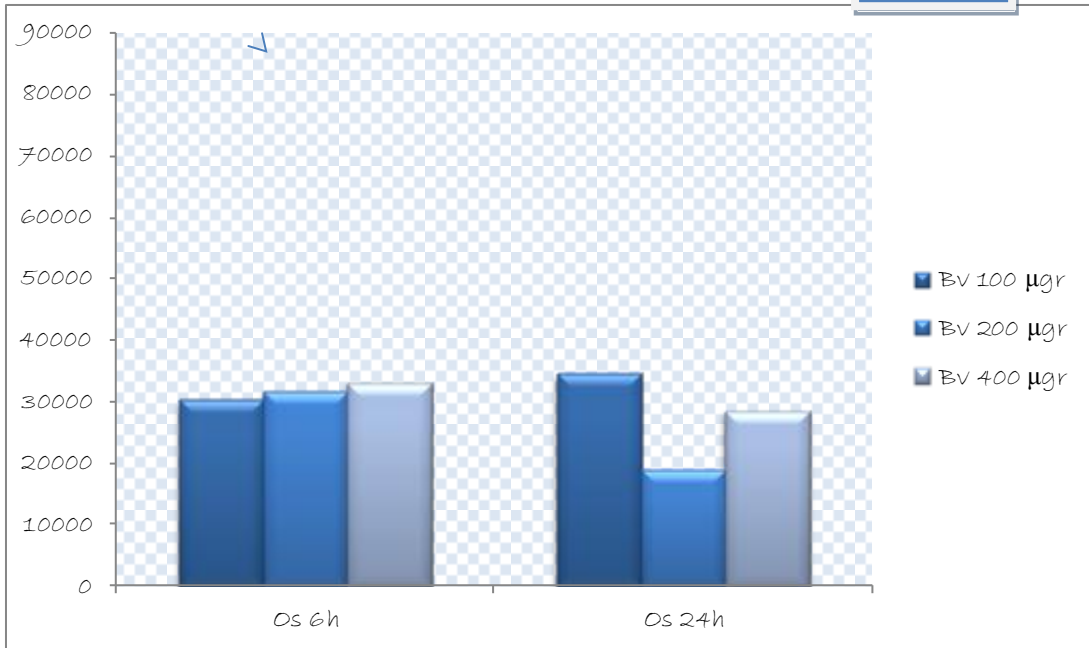


Tabla 50. Diagrama comparando TGFβ entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

El análisis de TGFβ tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400μgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

≈ Así mismo, no se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400μgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 24h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 51

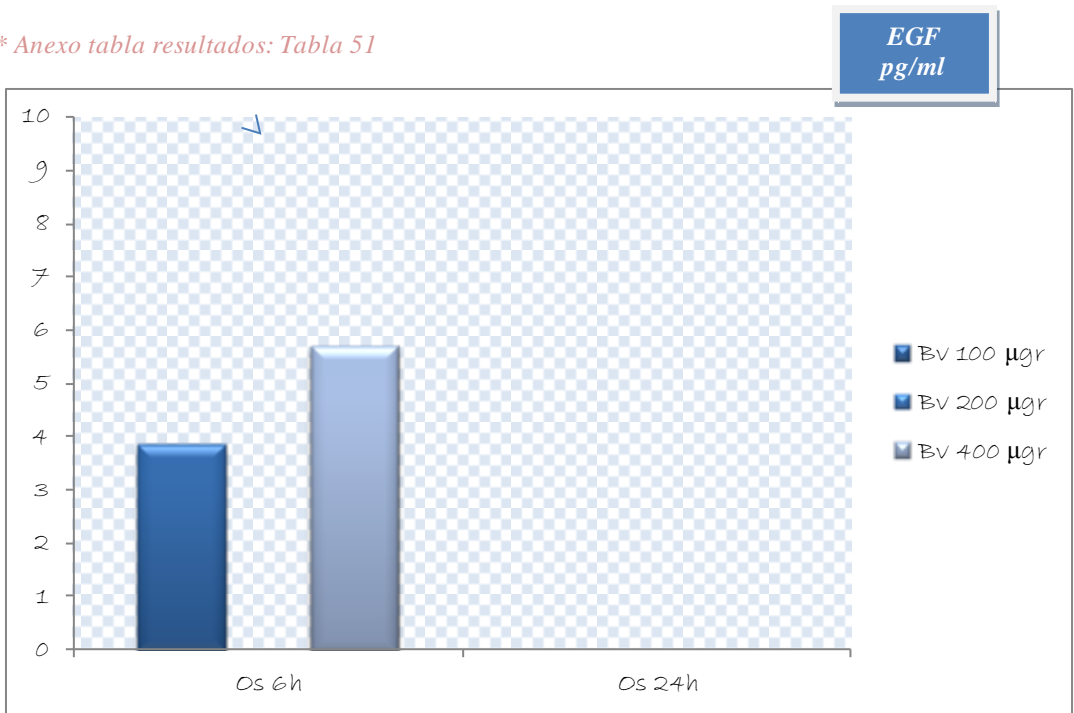


Figura 72. Diagrama comparando EGF entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

El análisis de EGF tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

~ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

~ Así mismo, no se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 24h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 52

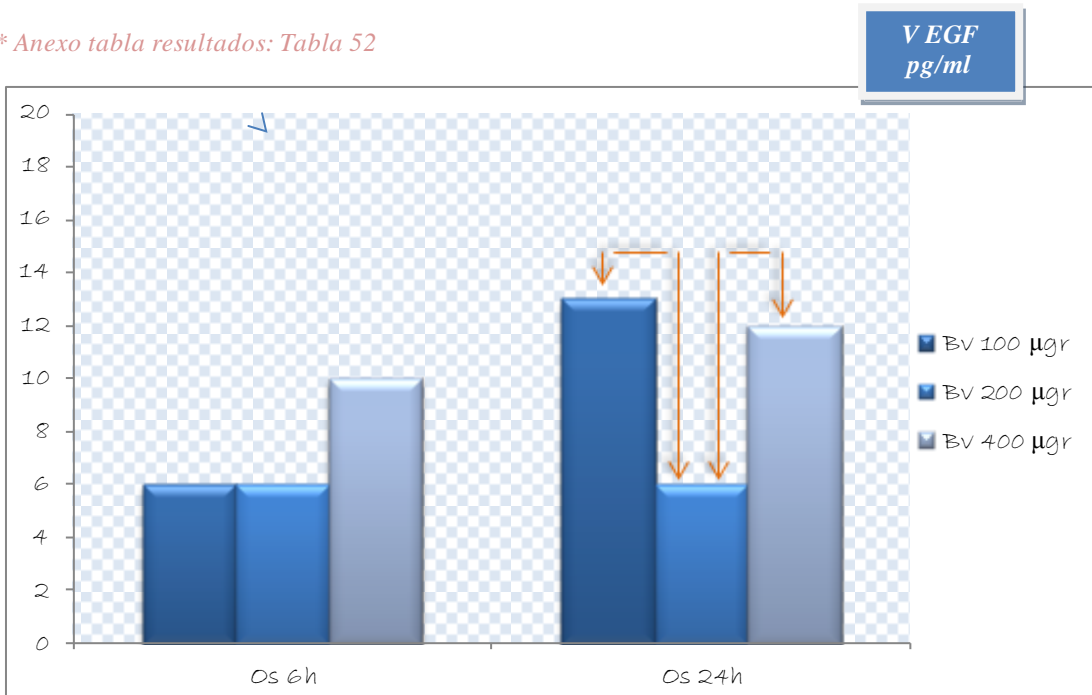


Figura 73. Diagrama comparando VEGF entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100, 200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab.)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de VEGF tras la administración de Bevacizumab en los grupos control nos muestra:

~ La citoquina VEGF es significativamente menor en el grupo al que se le administra 200µgr de Bv siete días antes de la cirugía (operación simulada) con posterior sacrificio a las 24h, respecto a los grupos a los que se les administran 100 y 400µgr del antiangiogénico.

~ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 6h.

b.3. Representación, mediante diagramas de sectores, de las variables cualitativas esteatosis, lesión histopatológica y grado de inflamación hepáticas.

1. Esteatosis hepática

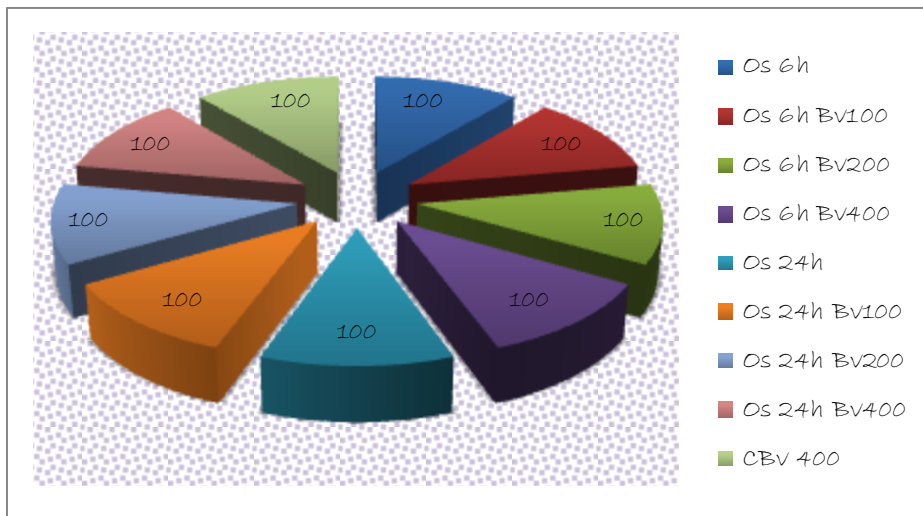


Figura 74. Diagrama de sectores que representa el grado de esteatosis hepática ausente-leve en los diferentes grupos control. (Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBV 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico).

~En todos los grupos se observó, en un 100% de los casos, un grado de esteatosis ausente-leve.

• Lesión histopatológica

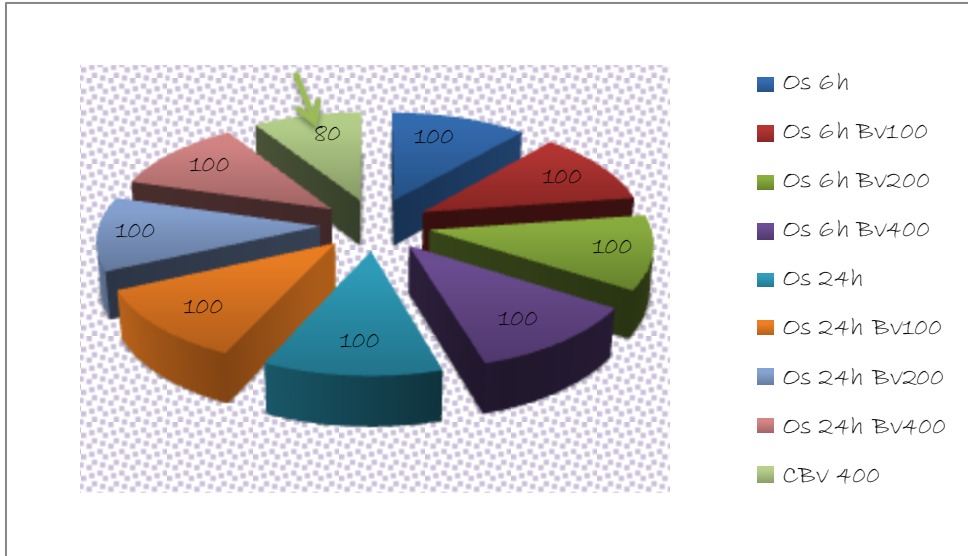


Figura 75. Diagrama de sectores que representa el grado de lesión histopatológica ausente-leve en los diferentes grupos control.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico).

≈ En la mayor parte de los grupos se observó, en un 100% de los casos, un grado ausente-leve de lesión histopatológica

≈ En el grupo CBv 400 se encontró, en un 20% de los casos, un grado moderado-grave de lesión histopatológica.

9. Inflamación hepatocitaria

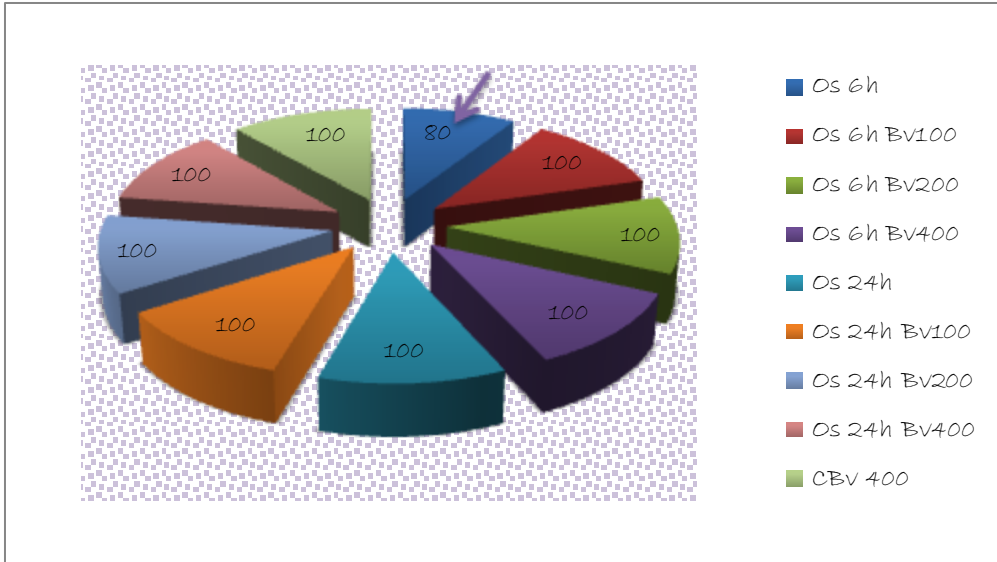


Figura 76. Diagrama de sectores que representa el grado de inflamación ausente-leve en los diferentes grupos control.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico).

≈ En la mayor parte de los grupos se observó, en un 100% de los casos, un grado ausente-leve de inflamación

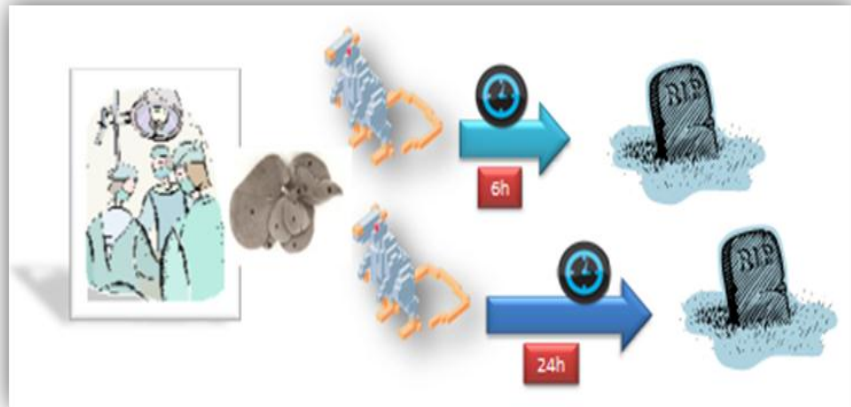
≈ En el grupo Os 6h se encontró, en un 20% de los casos, un grado de inflamación hepatocitaria moderado-grave.

RESULTADOS

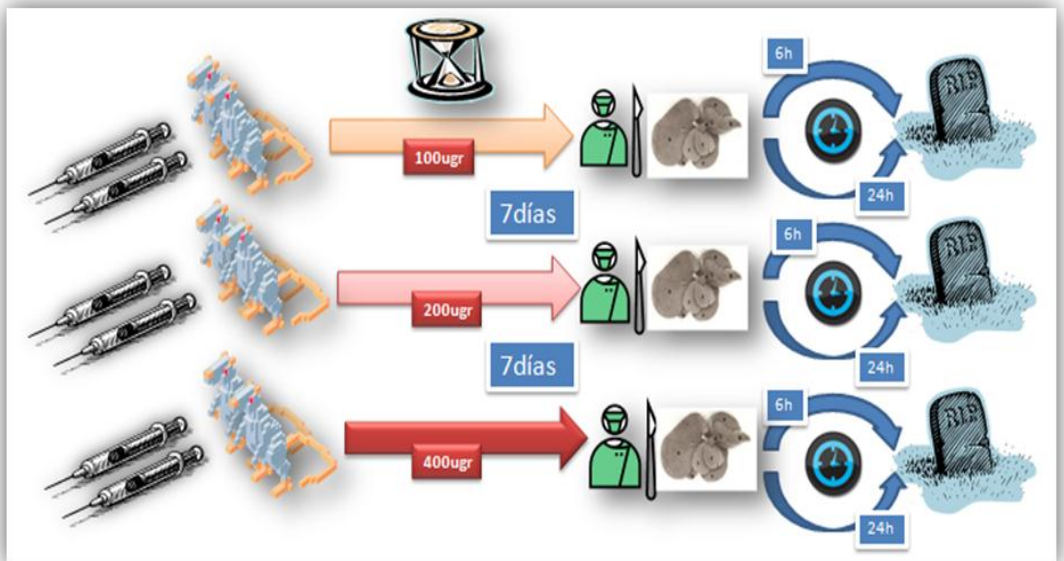
Estudio del efecto del Bevacizumab en el hígado sometido a cirugía de resección

c.- Influencia del Bevacizumab sobre el hígado de los animales sometidos a hepatectomía

c.1. Comparación estadística de las variables cuantitativas regeneración y proliferación hepatocitarias, estrés oxidativo, perfil hepático y citoquinas, de ratas Wistar sometidas a hepatectomía del 70% y a las que no se les administra Bevacizumab, con aquellas a las que se les administra el antiangiogénico



&



• Índice de regeneración hepática, proliferación y estrés oxidativo

* Anexo tabla resultados: Tabla 53

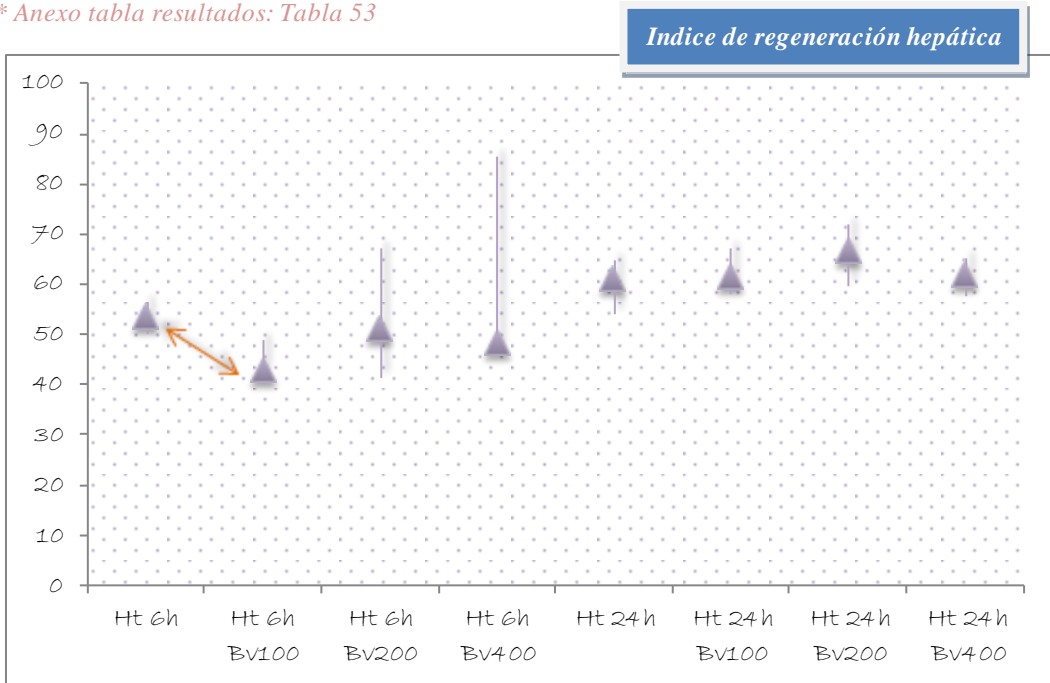


Figura 77. Diagrama comparando el índice de regeneración hepática entre grupos.
 (Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h;
 Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)
 *Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis del índice de regeneración hepática tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ El índice de regeneración hepatocitaria es significativamente menor en el grupo al que se le administra 100µgr de Bv siete días antes de la cirugía (hepatectomía del 70%) con posterior sacrificio a las 6h, respecto al grupo control (Ht 6h).

* Anexo tabla resultados: Tabla 54

Bromodesoxiuridina

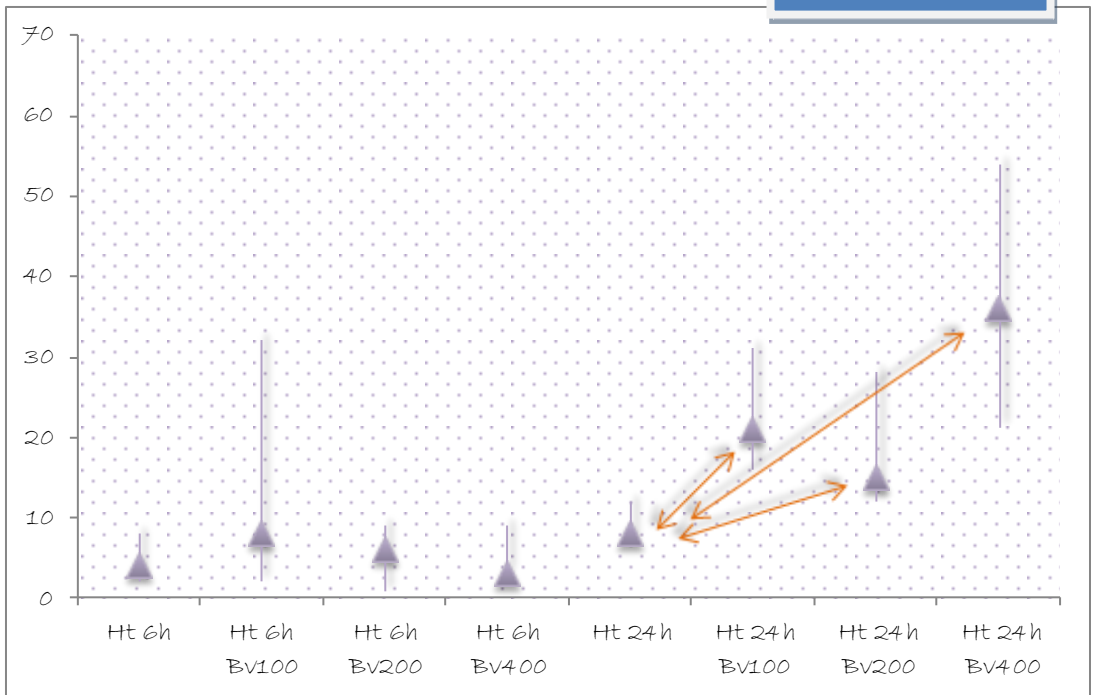


Figura 78. Diagrama comparando el número de células BrdU positivas entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de la proliferación hepatocitaria tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ El número de células BrdU positivas es significativamente mayor en los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía (hepatectomía del 70%) con posterior sacrificio a las 24h, respecto al grupo control (Ht 24h).

* Anexo tabla resultados: Tabla 55

Indice GSH/GSSG

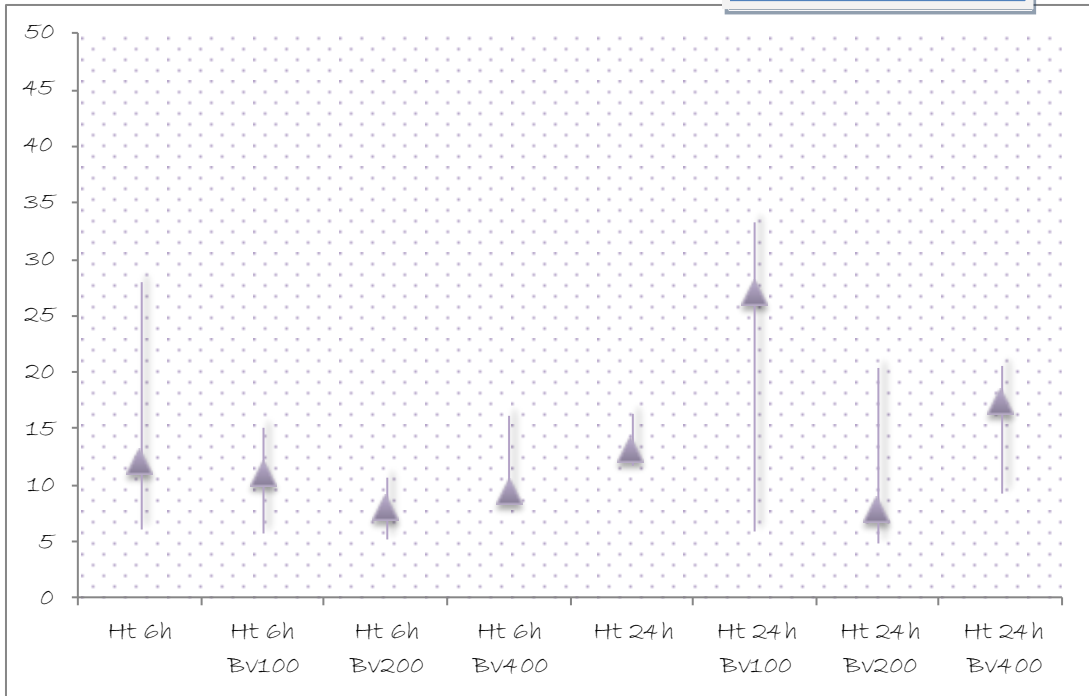


Figura 79. Diagrama comparando el índice de estrés oxidativo entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis del índice de estrés oxidativo tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 56

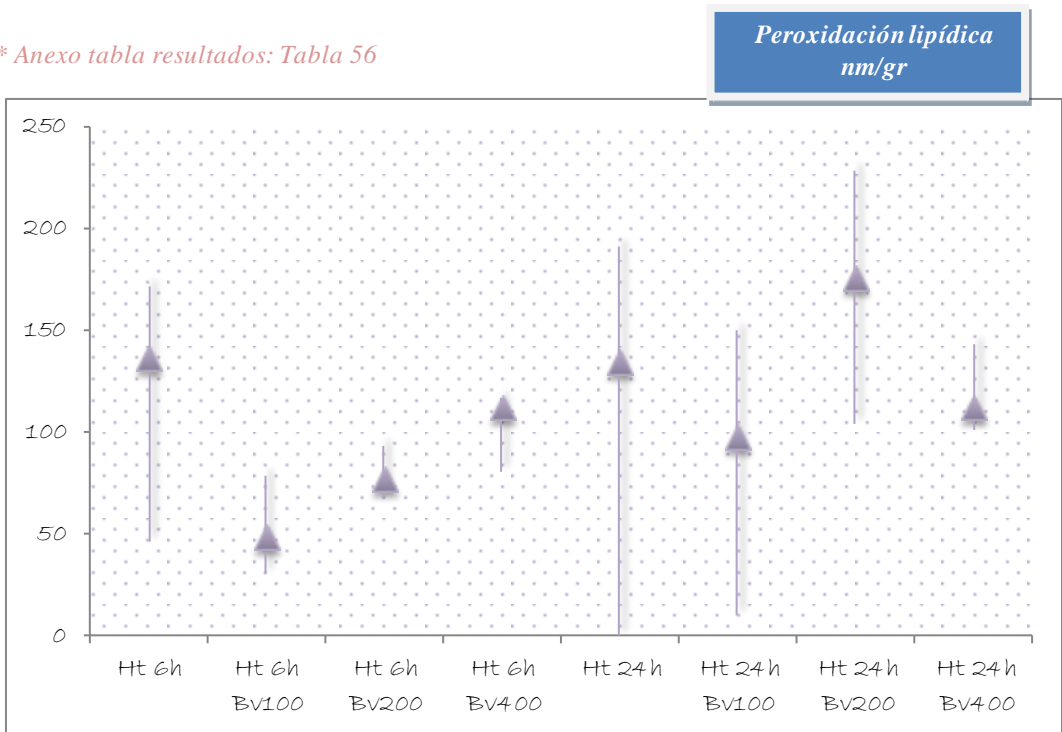


Figura 80. Diagrama comparando sustancias derivadas de la peroxidación lipídica entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de TBARS tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 57

ATP
ngr/gr

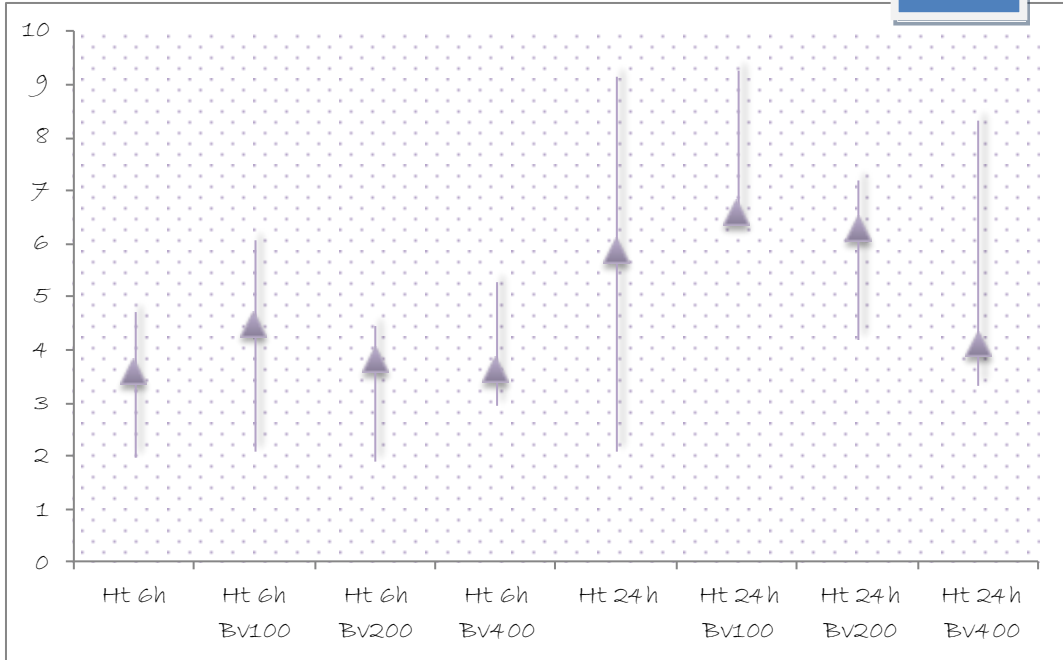


Figura 81. Diagrama comparando ATP entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h;
Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran
respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de ATP tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

• Perfil hepático

* Anexo tabla resultados: Tabla 58

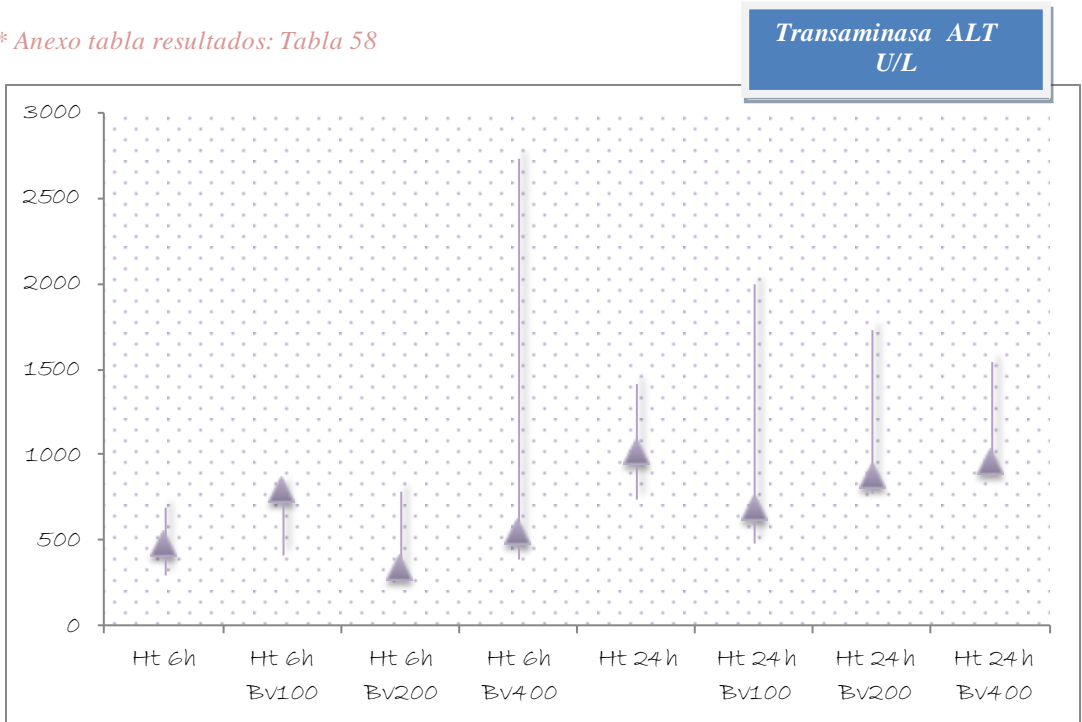


Figura 82. Diagrama comparando la transaminasa ALT entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la transaminasa ALT tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 59

Transaminasa AST
U/L

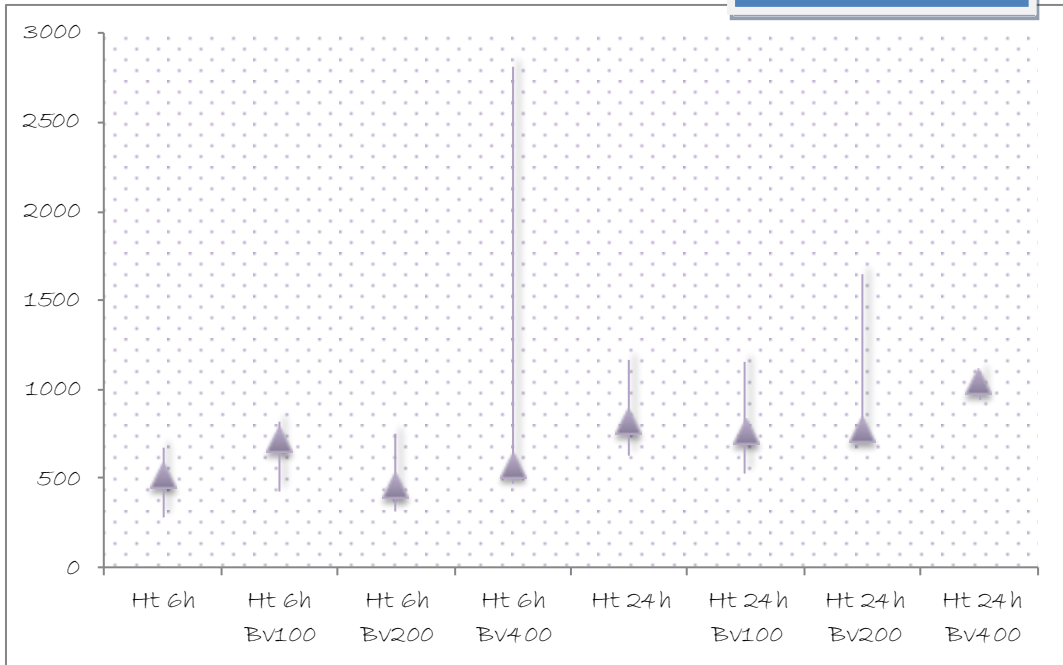


Figura 83. Diagrama comparando la transaminasa AST entre grupos.
(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la transaminasa AST tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 60

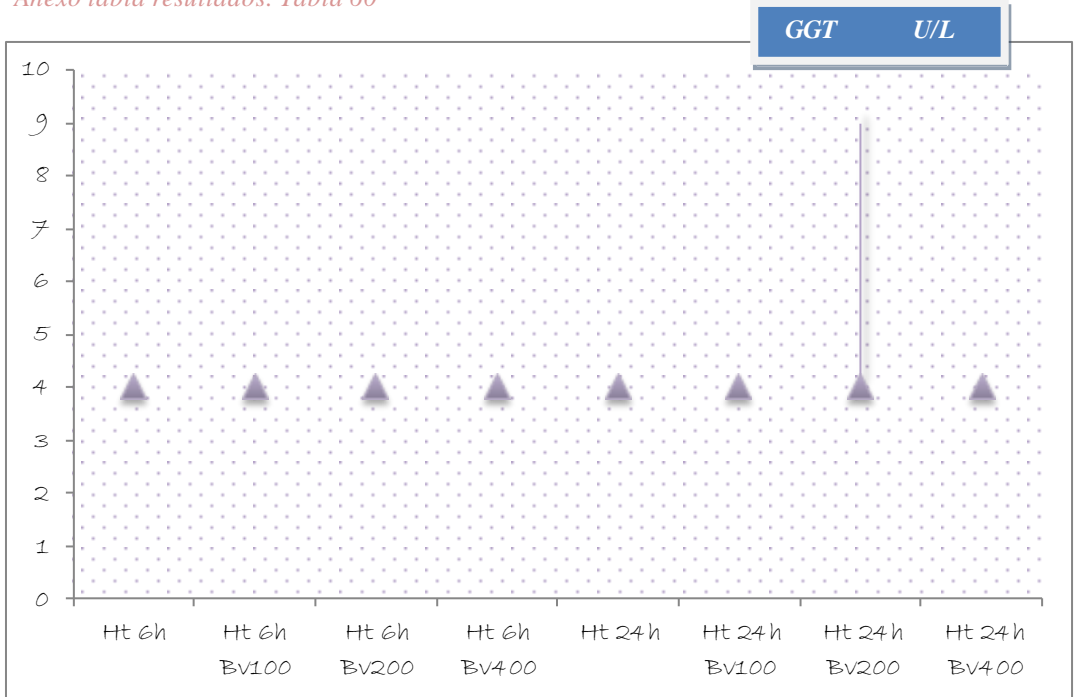


Figura 84. Diagrama comparando GGT entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de GGT tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 61

Fosfatasa alcalina
U/L

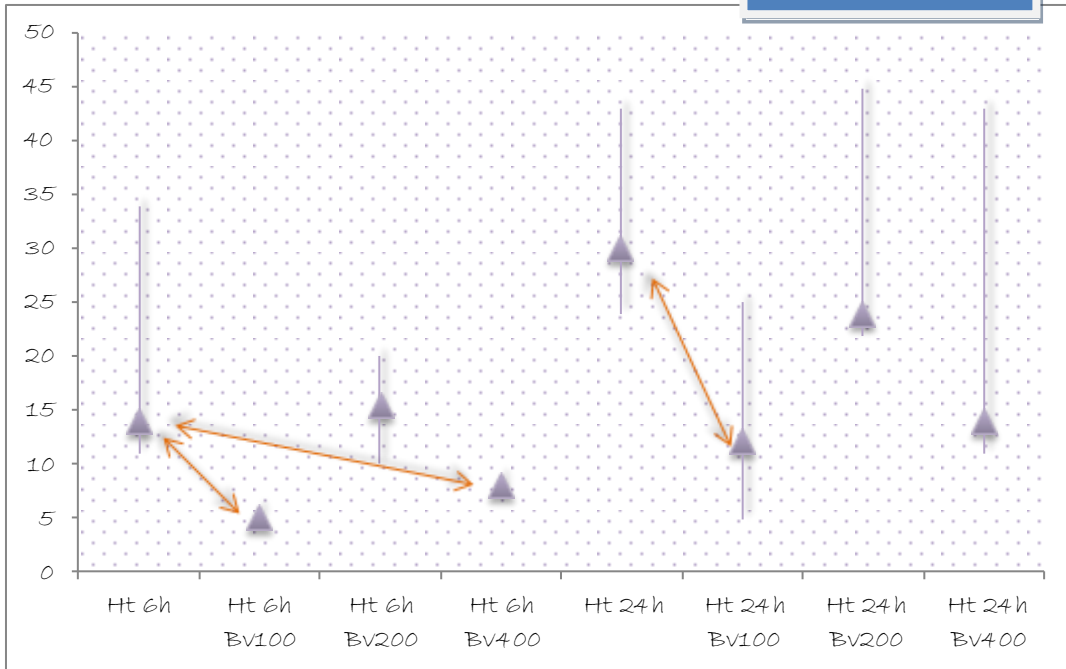


Figura 85. Diagrama comparando fosfatasa alcalina entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de la fosfatasa alcalina tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ La FA es significativamente menor en los grupos a los que se les administran 100 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía (hepatectomía del 70%) con posterior sacrificio a las 6h, respecto al grupo control (Os 6h).

≈ La FA es significativamente menor en el grupo al que se le administra 100µgr de Bv siete días antes de la cirugía con posterior sacrificio a las 24h, respecto a su grupo control (Os 24h).

* Anexo tabla resultados: Tabla 62

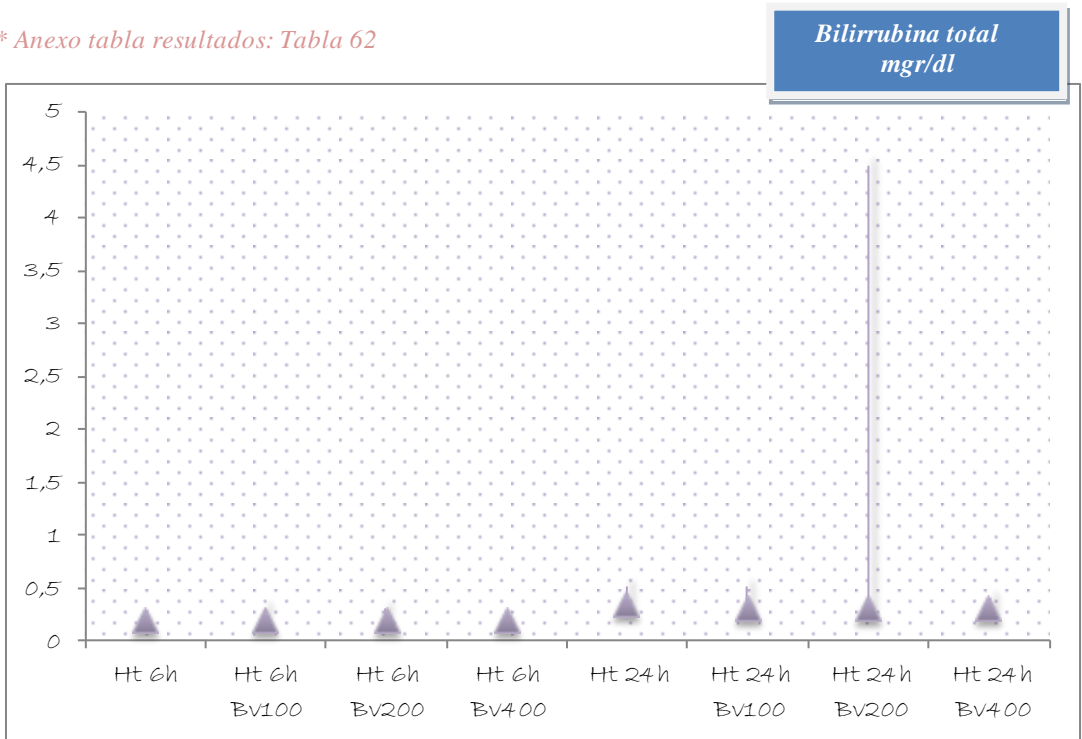


Figura86. Diagrama comparando bilirrubina total entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de BT tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 63

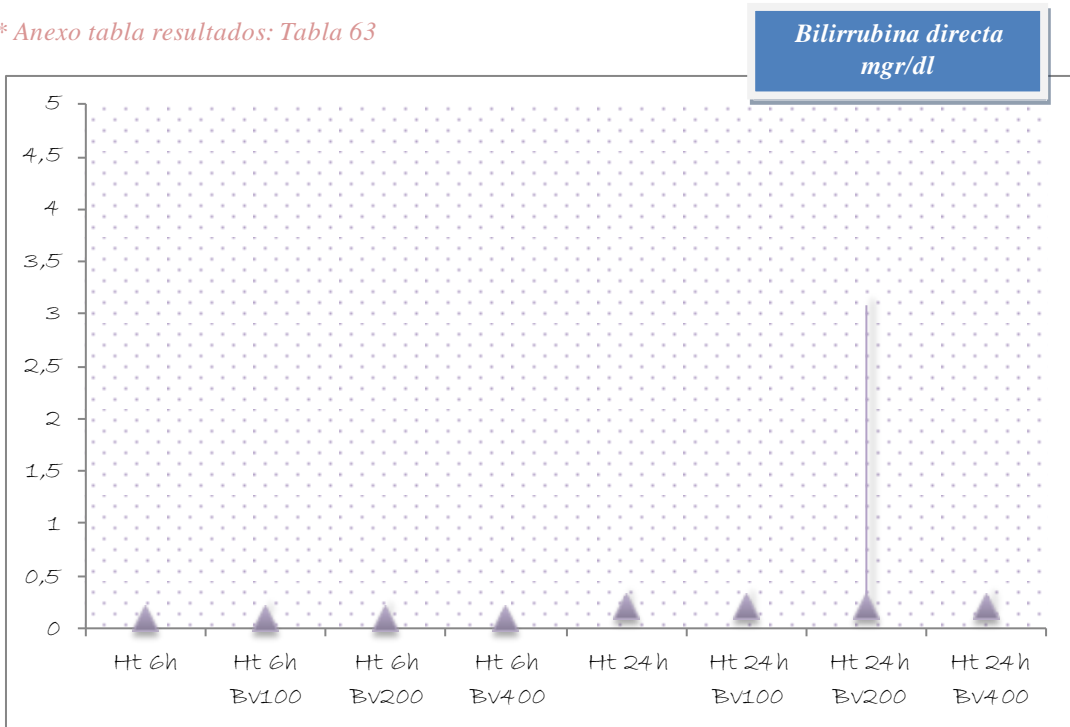


Figura 87. Diagrama comparando bilirrubina directa entre grupos.
 (Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de BD tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 64

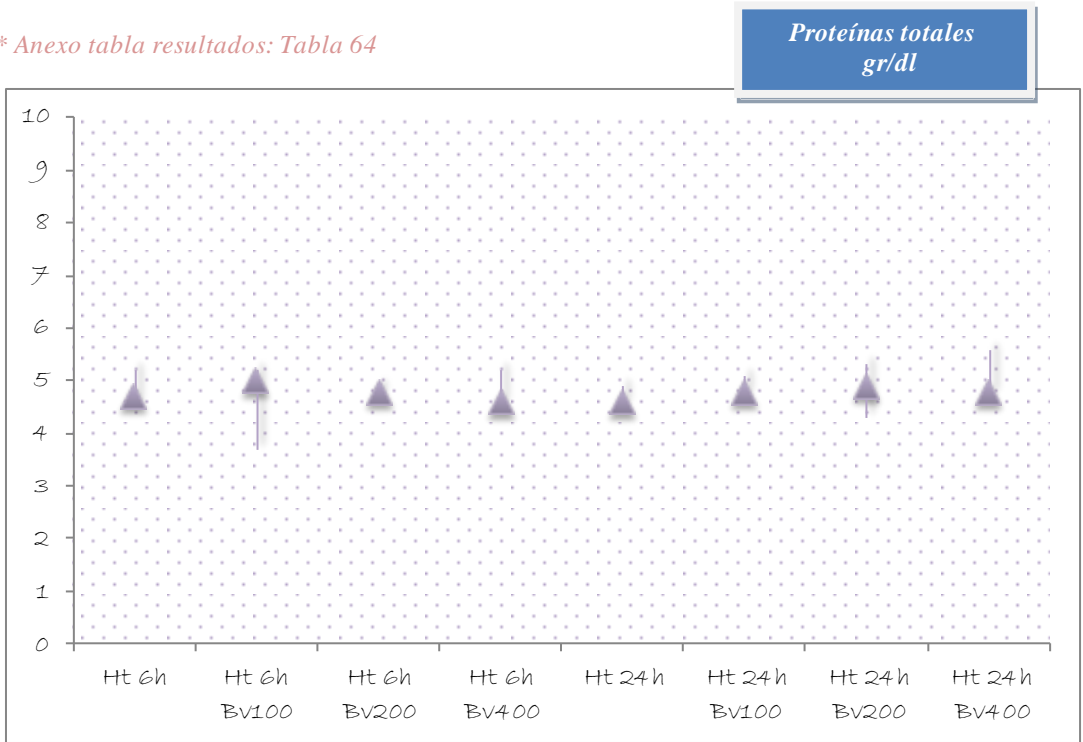


Figura 88. Diagrama comparando proteínas totales entre grupos.
 (Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de PT tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 65

Albúmina
gr/dl

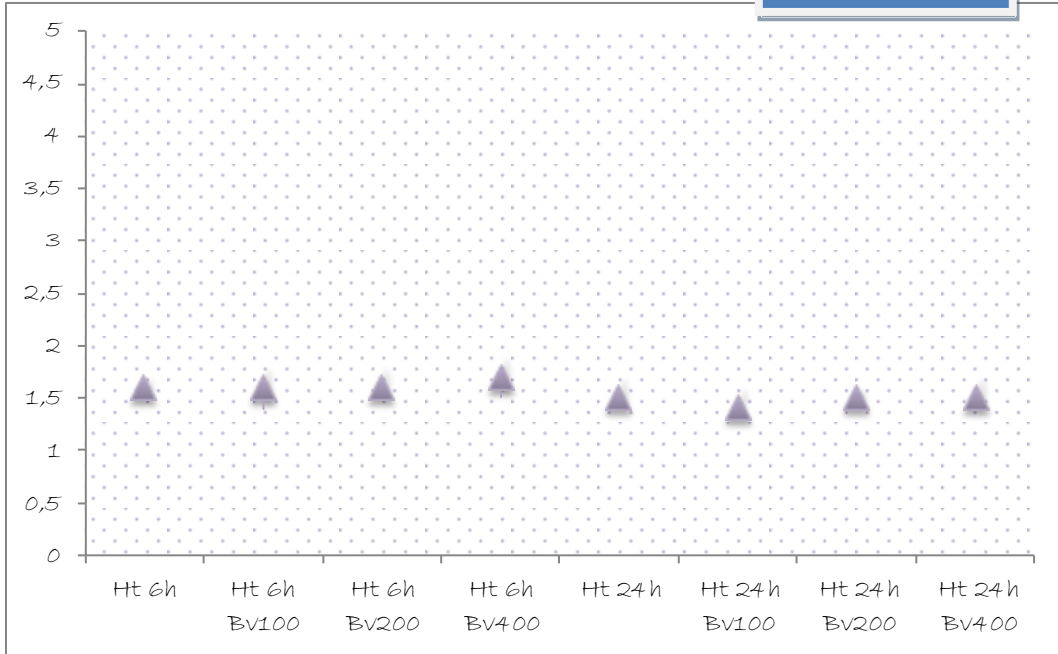


Figura 89. Diagrama comparando albúmina entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h;
Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran
respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de albúmina tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

~ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 66

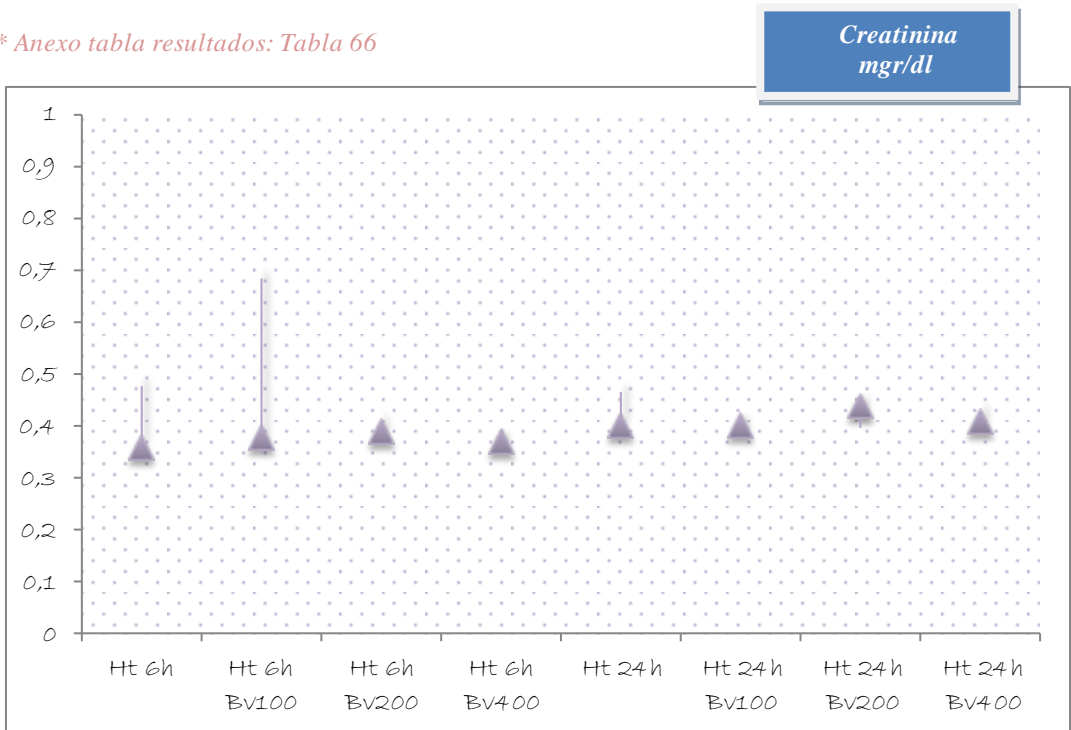


Figura 90. Diagrama comparando creatinina entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h;
Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran
respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la creatinina tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 67

Urea
mgr/dl

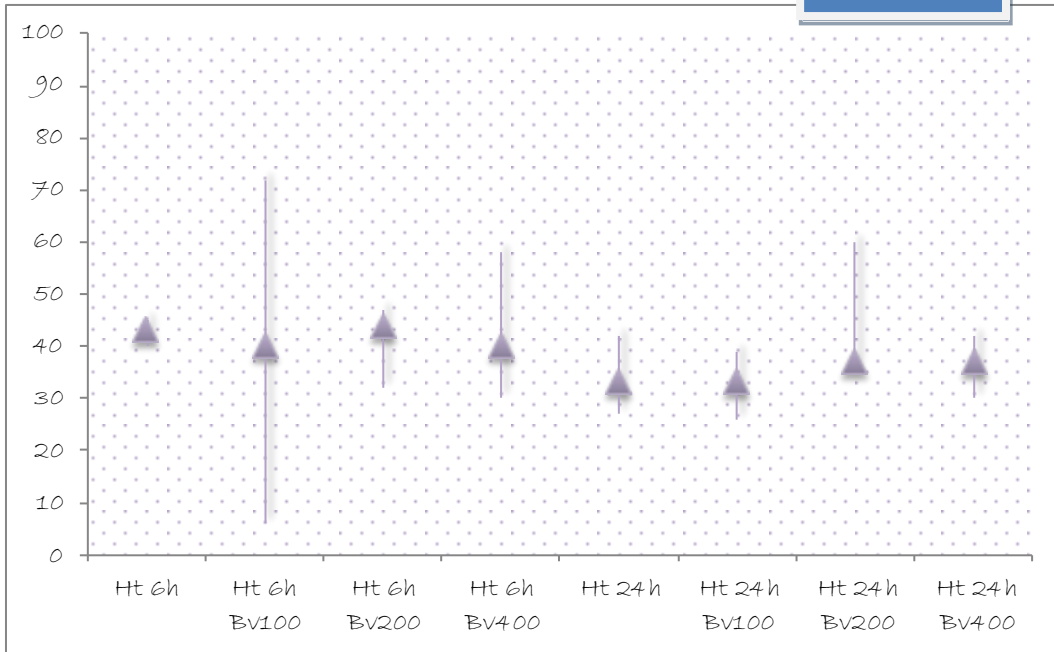


Figura 91. Diagrama comparando urea entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la urea tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

~ No se observan diferencias significativas

• Citoquinas

* Anexo tabla resultados: Tabla 68

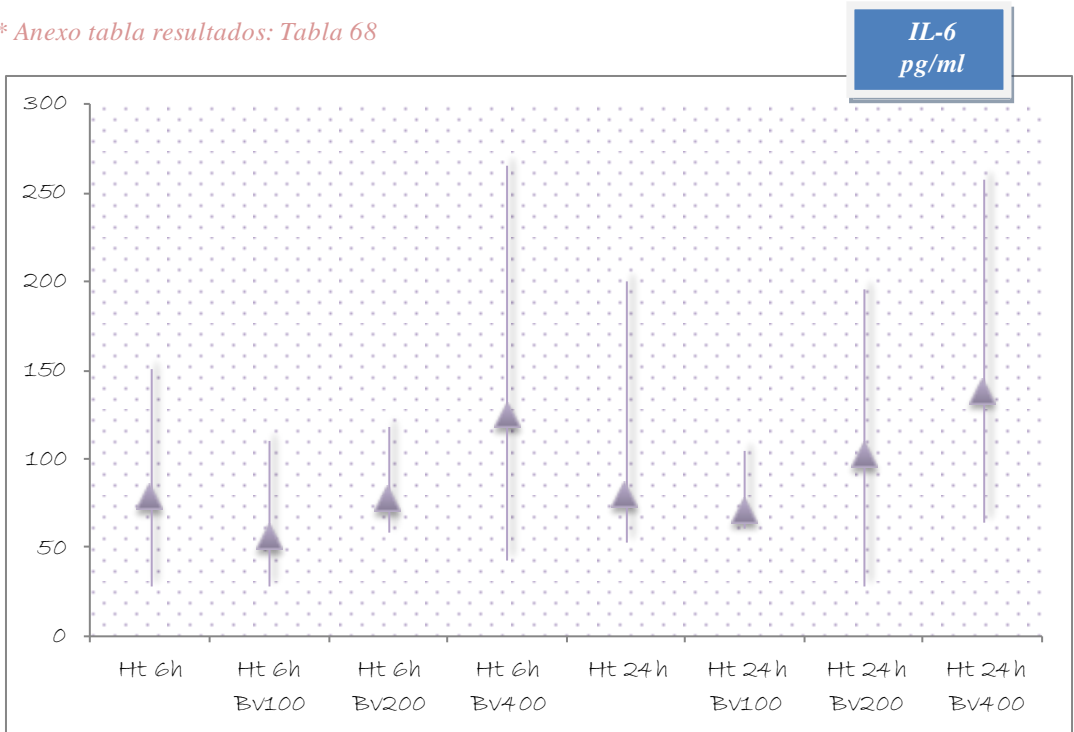


Figura 92. Diagrama comparando IL-6 entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h;
Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran
respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la IL-6 tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 69

TNF α
pg/ml

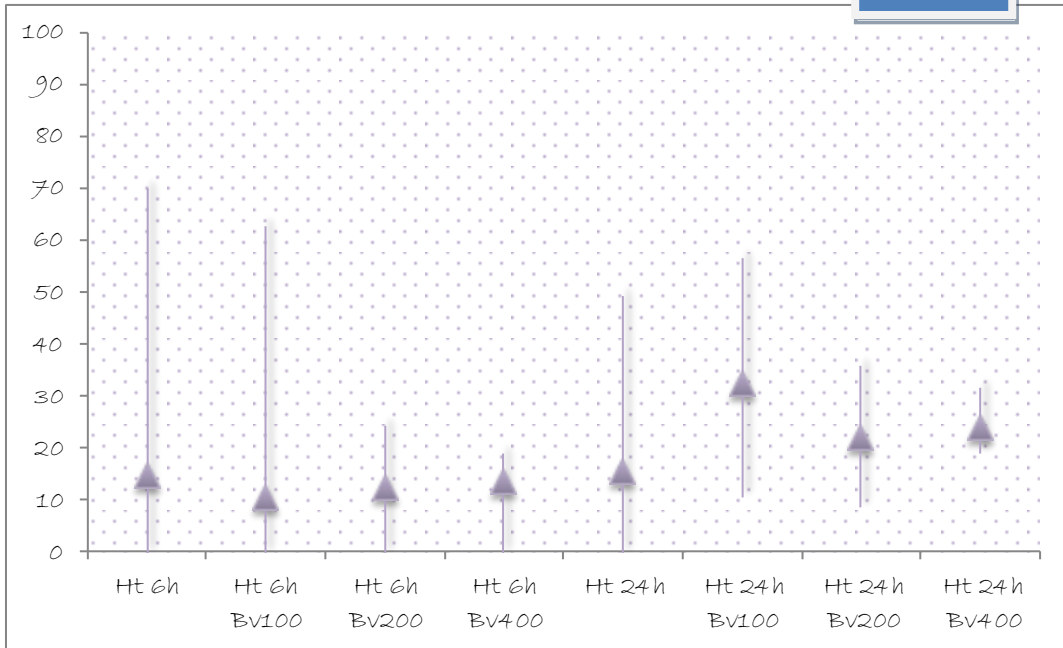


Figura 93. Diagrama comparando la citoquina TNF α entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la citoquina TNF α tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 70

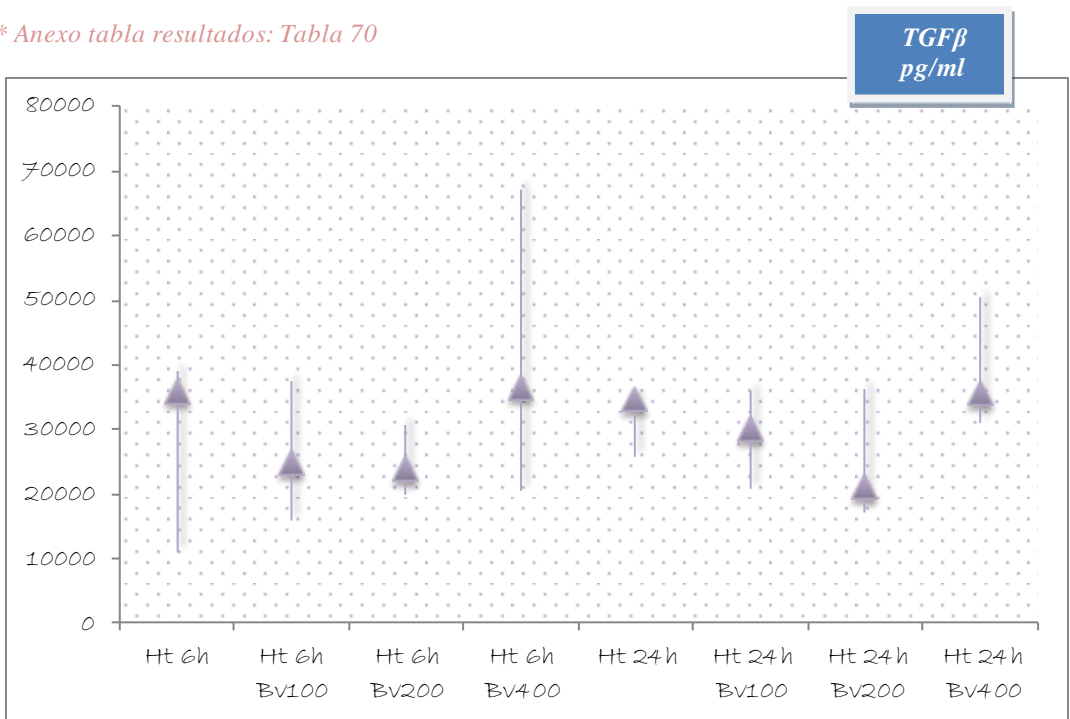


Figura 94. Diagrama comparando la citoquina TGFβ entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la citoquina TGFβ tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 71

EGF
pg/ml

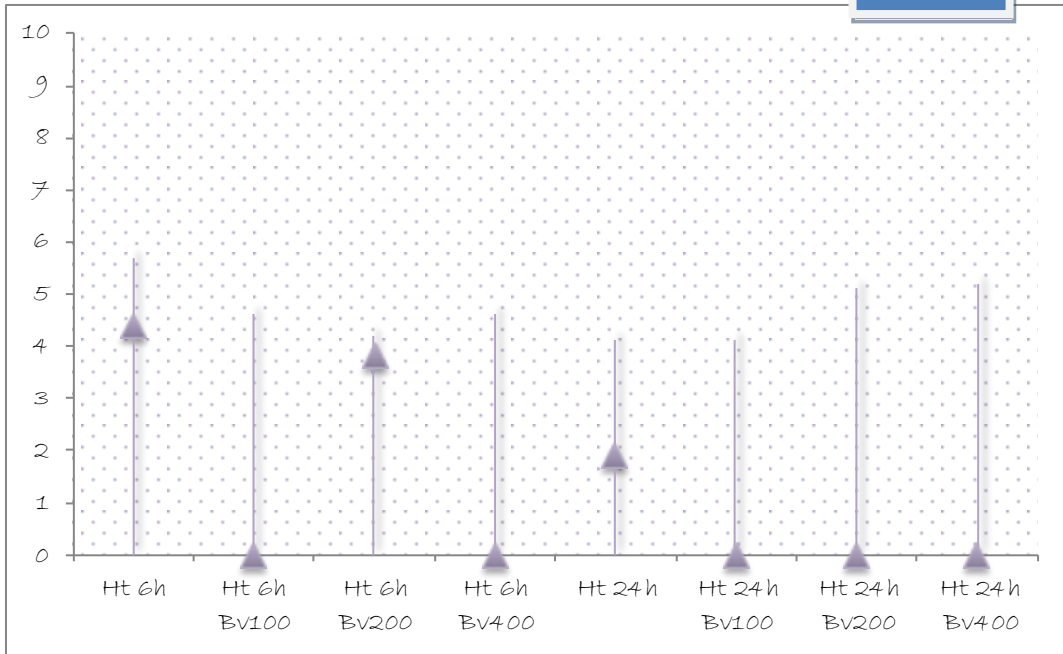


Figura 95. Diagrama comparando la citoquina EGF entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la citoquina EGF tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 72

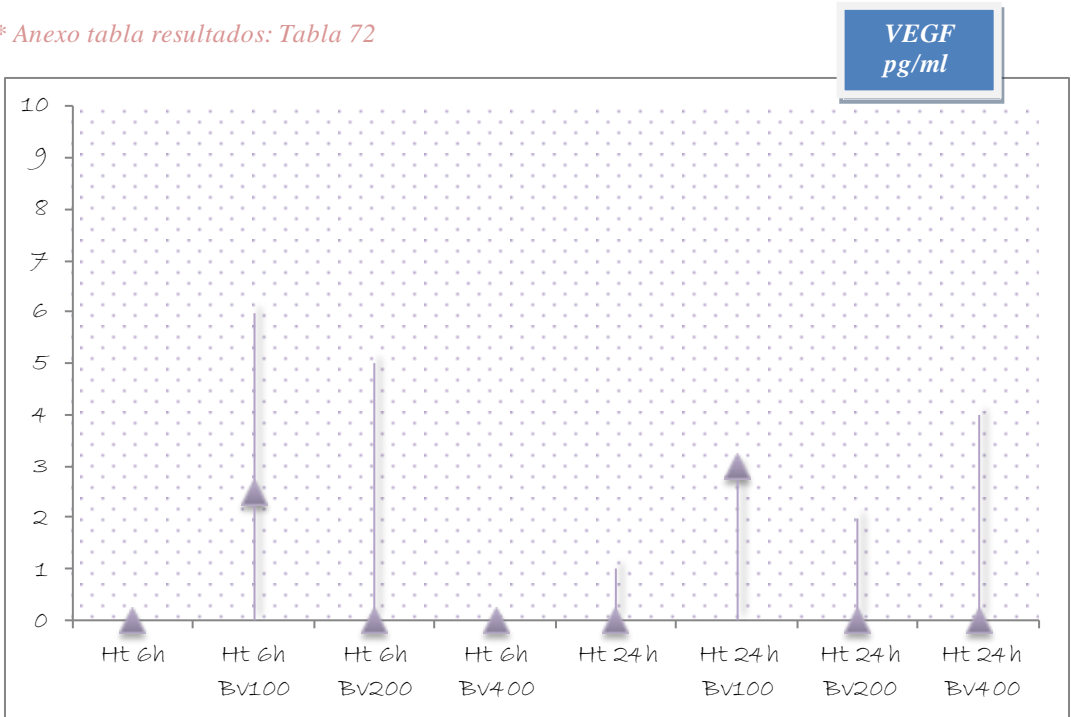


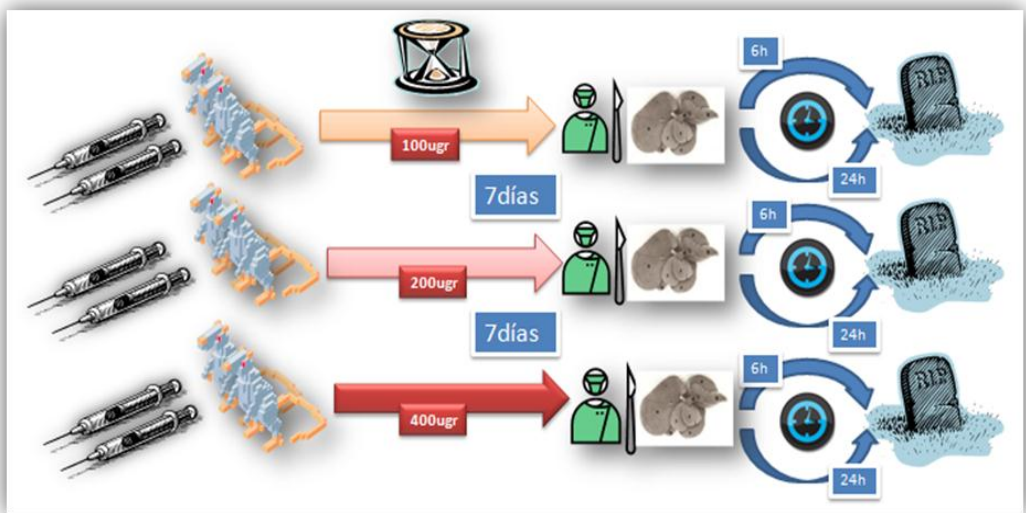
Figura 96. Diagrama comparando VEGF entre grupos.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la citoquina VEGF tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

c.2. Comparación estadística de las variables cuantitativas regeneración y proliferación hepatocitarias, estrés oxidativo, perfil hepático y citoquinas, de ratas Wistar sometidas a hepatectomía del 70% y a las que se les administra Bevacizumab (dosis basal), con aquellas a las que se les administra la mitad y el doble de la dosis del antiangiogénico



9. Índice de regeneración hepática, proliferación y estrés oxidativo

* Anexo tabla resultados: Tabla 73

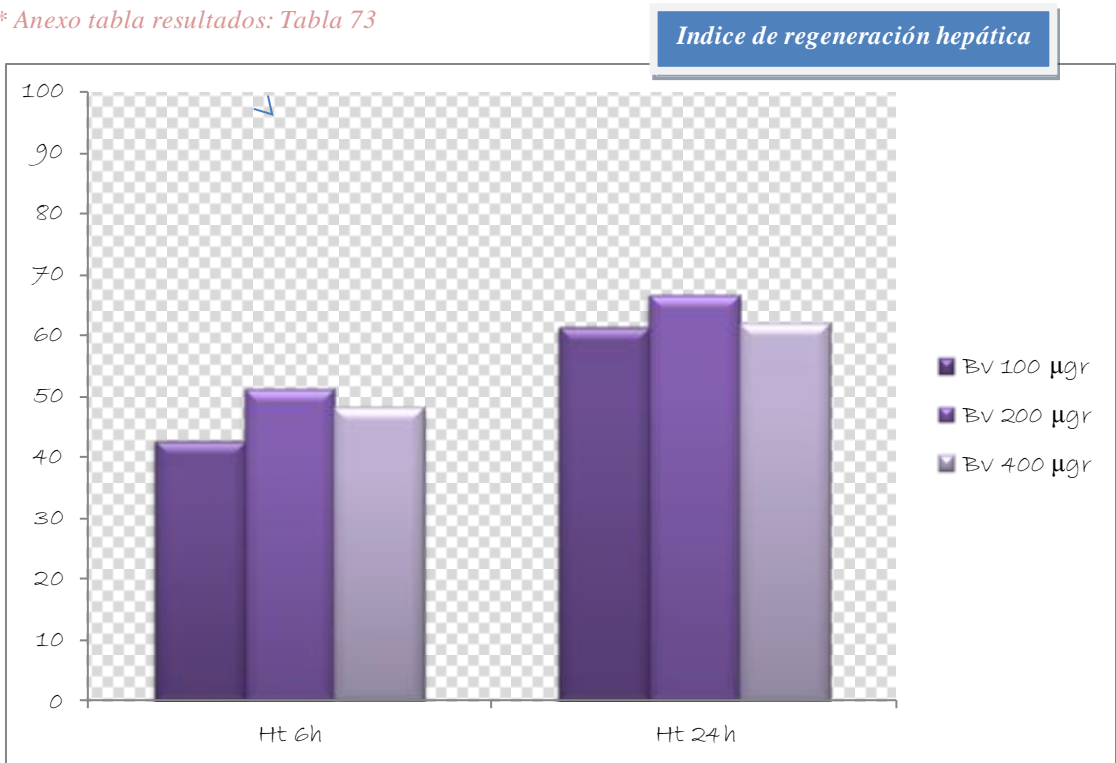


Figura 97. Diagrama comparando el índice de regeneración hepática entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.
 (Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h;
 Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis del índice de regeneración hepática tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 74

Bromodesoxiuridina

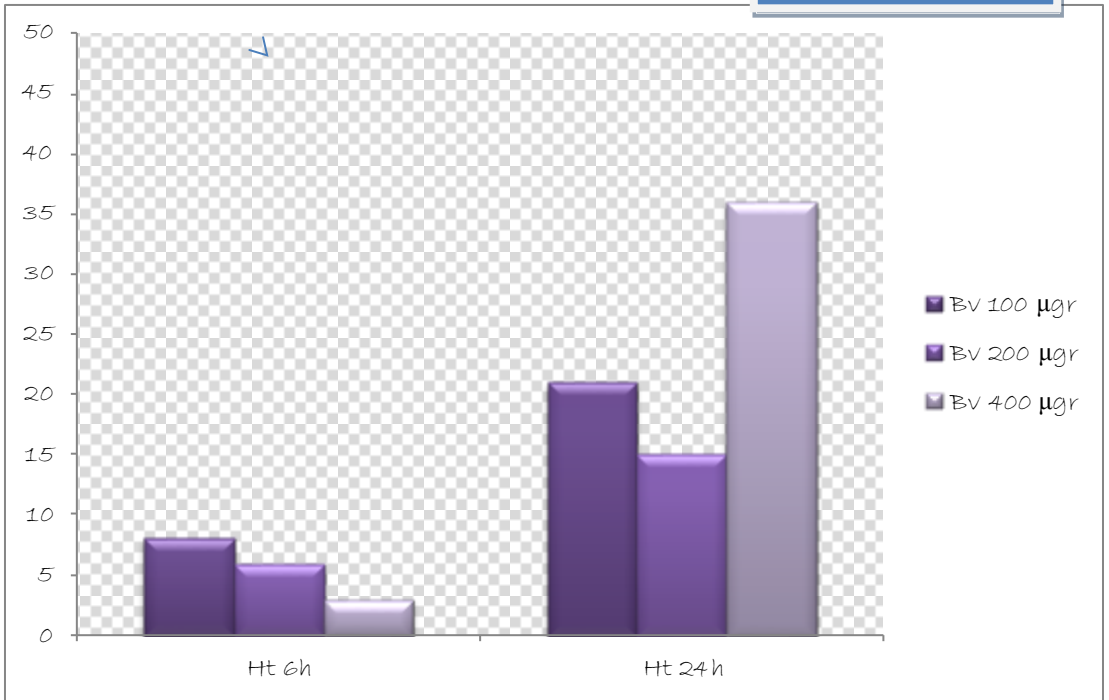


Figura 98. Diagrama comparando las células BrdU positivas entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la proliferación hepatocitaria tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 75

Indice GSH/GSSG

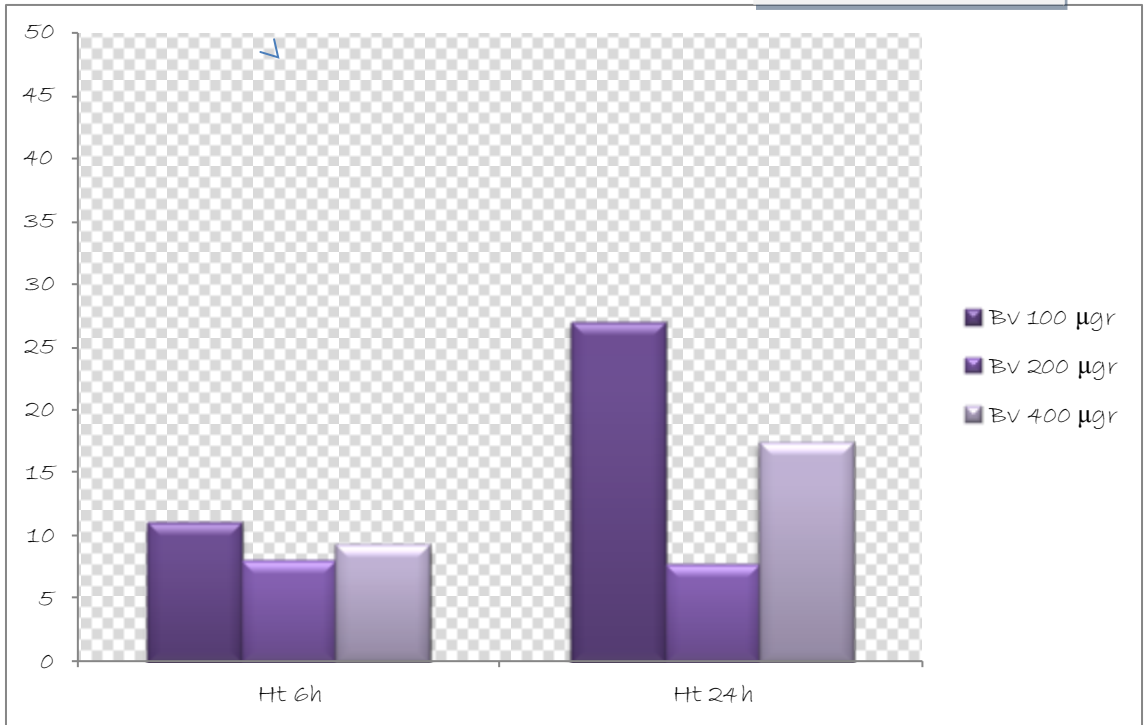


Figura 99. Diagrama comparando el índice de estrés oxidativo entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis del índice de estrés oxidativo tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 76

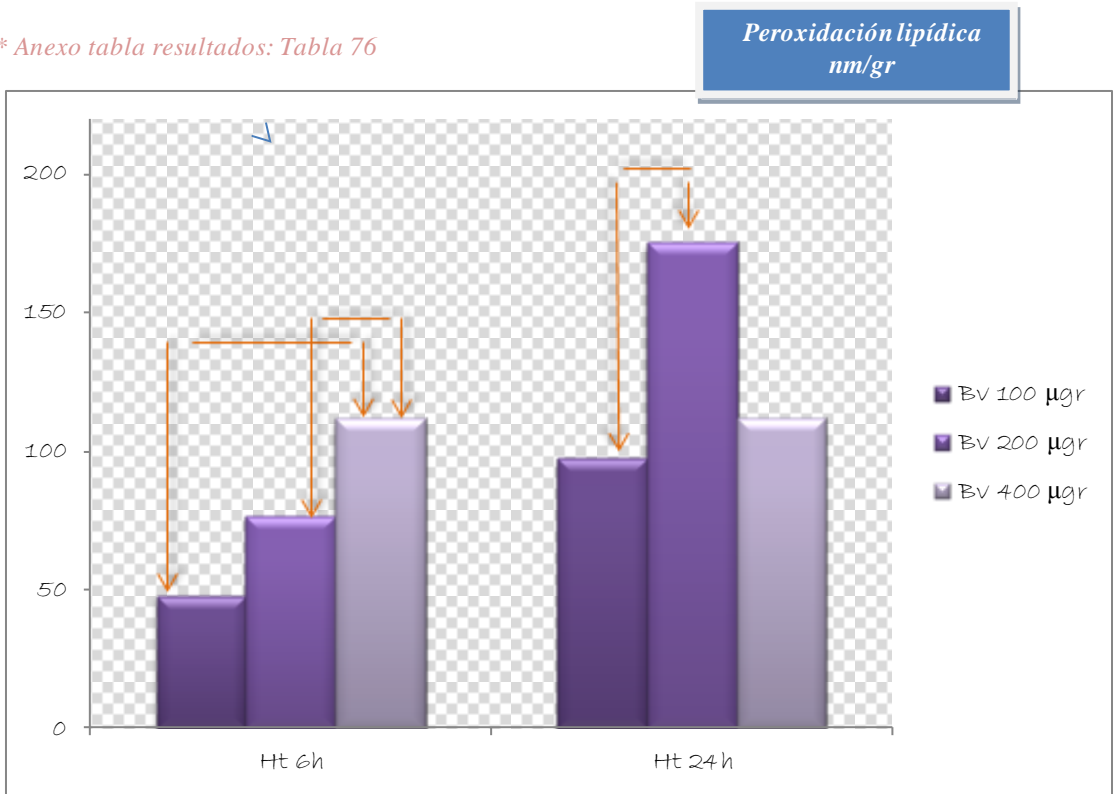


Figura 100. Diagrama comparando sustancias derivadas de la peroxidación lipídica entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico "U de Mann-Whitney")

El análisis de los TBARS tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ El estrés oxidativo medido de forma indirecta mediante las sustancias derivadas de la peroxidación lipídica, es significativamente mayor en el grupo al que se le administra 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía (hepatectomía del 70%) con posterior sacrificio a las 6h, respecto a los grupos a los que se les administran 100 y 200µgr del antiangiogénico.

≈ Así mismo el estrés oxidativo es significativamente mayor en el grupo al que se le administra 200µgr de Bv siete días antes de la cirugía (hepatectomía del 70%) con posterior sacrificio a las 24h, respecto al grupo al que se le administran 100µgr del antiangiogénico.

* Anexo tabla resultados: Tabla 77

ATP
ngr/gr

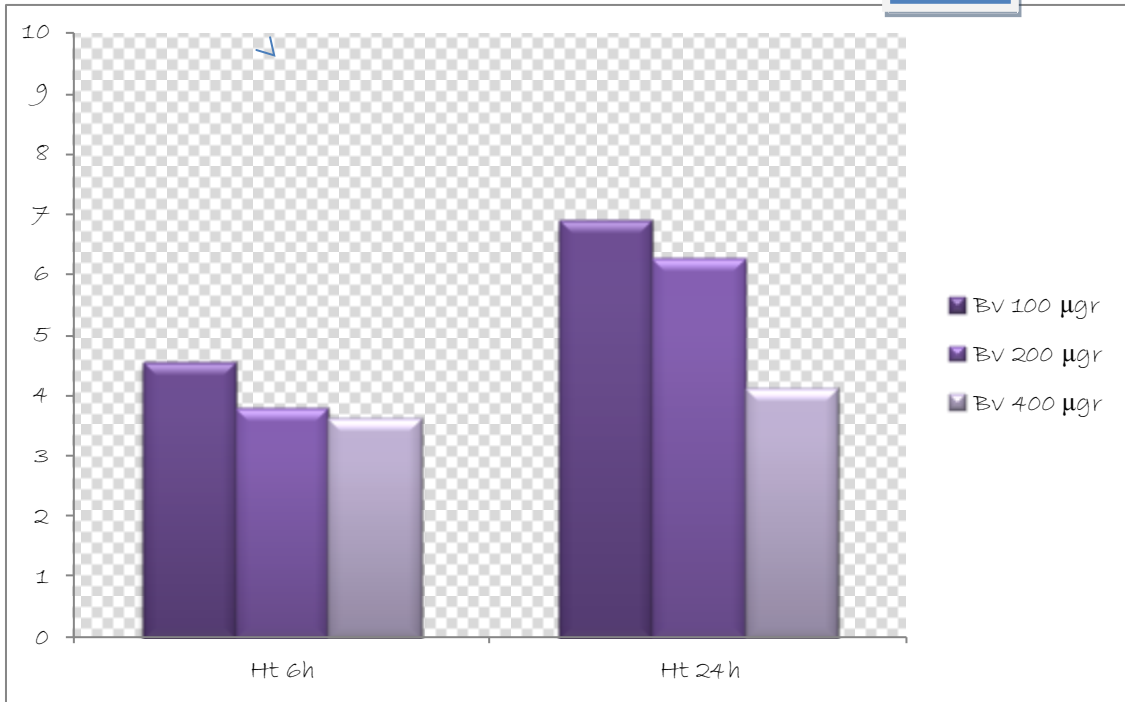


Figura 101. Diagrama comparando ATP entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.
 (Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la energía celular liberada tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:
 ≈ No se observan diferencias significativas

• Perfil hepático

* Anexo tabla resultados: Tabla 78

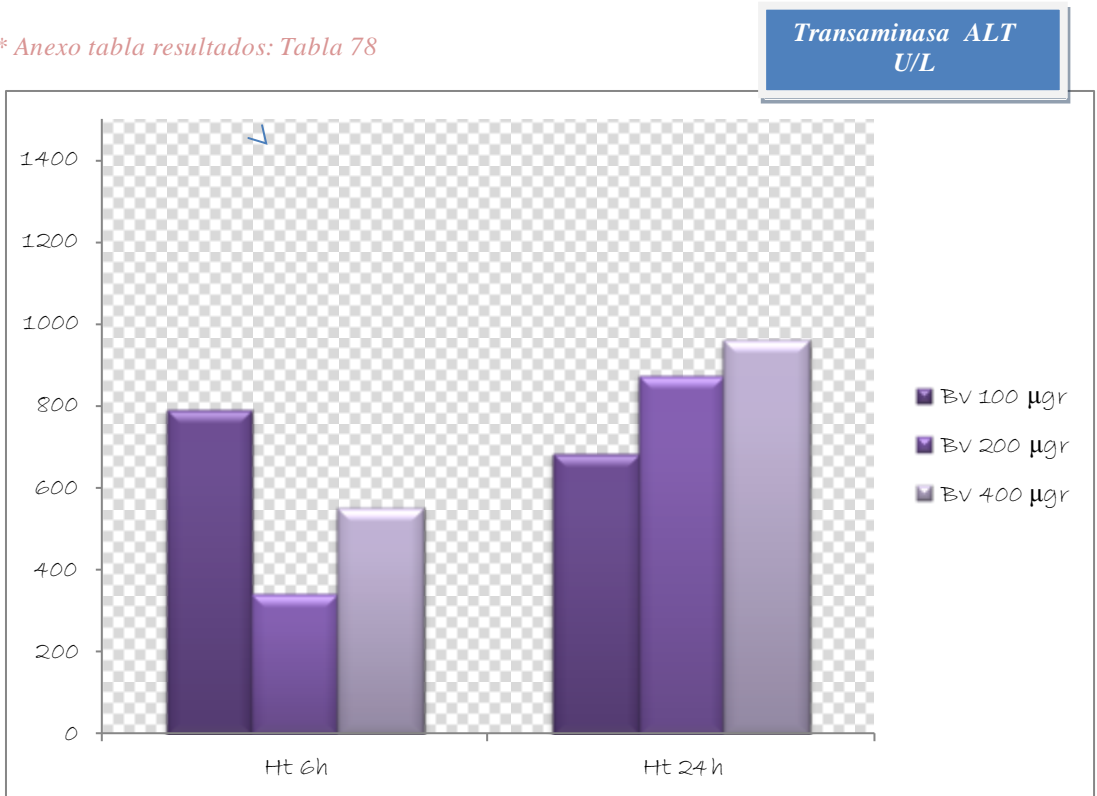


Figura 102. Diagrama comparando la transaminasa ALT entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la transaminasa ALT tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 79

Transaminasa AST
U/L



Figura 103. Diagrama comparando la transaminasa AST entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la transaminasa AST tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 80

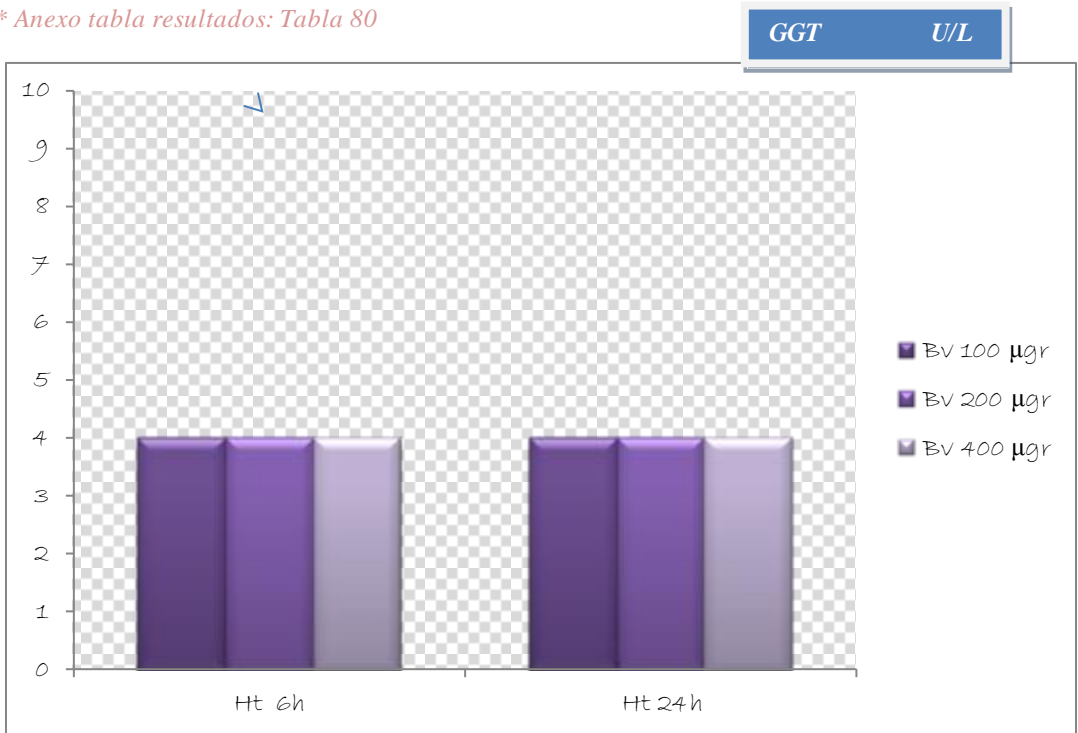


Figura 104. Diagrama comparando GGT entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de GGT tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

~ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 81

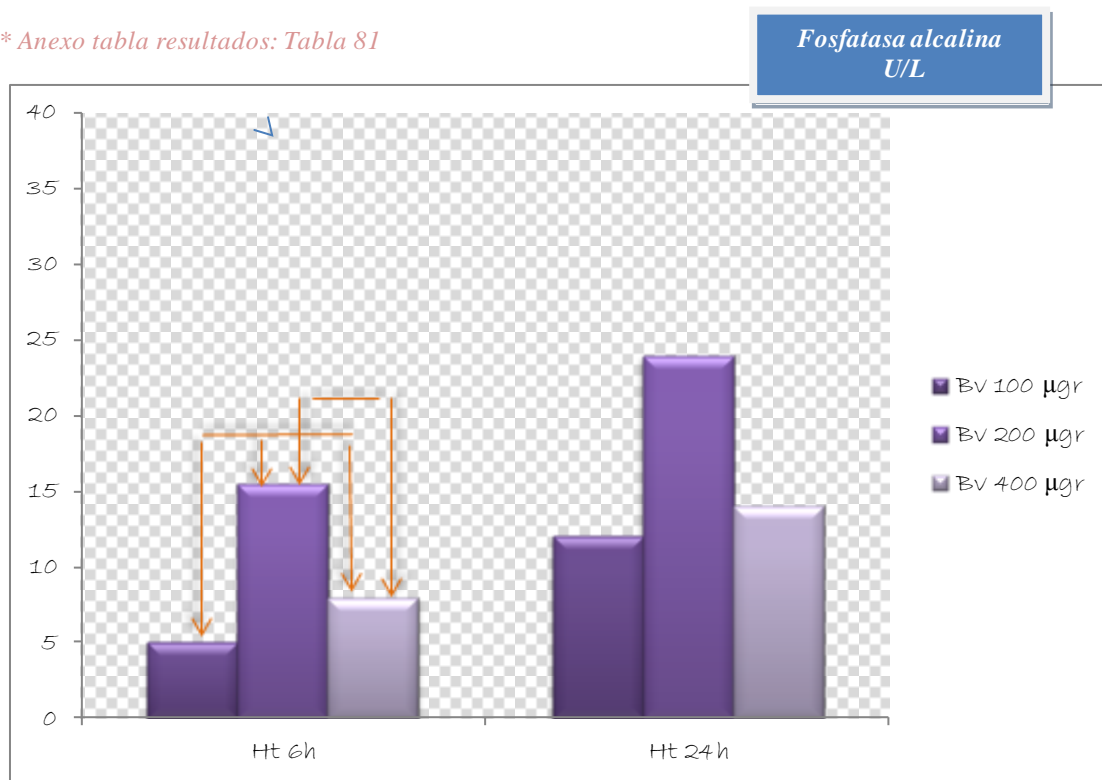


Figura 105. Diagrama comparando fosfatasa alcalina entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

*Las flechas representan los grupos entre los que se observan diferencias significativas ($p < 0,05$, Test no paramétrico “U de Mann-Whitney”)

El análisis de FA tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ La fosfatasa alcalina es significativamente mayor en el grupo al que se le administra 200µgr de Bv siete días antes de la cirugía (hepatectomía del 70%) con posterior sacrificio a las 6h, respecto a los grupos a los que se les administran 100 y 400µgr del antiangiogénico.

≈ A su vez, la FA es significativamente mayor en el grupo al que se le administra 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía con posterior sacrificio a las 6h, respecto al grupo al que se le administra 100µgr del antiangiogénico.

≈ No se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía, con posterior sacrificio a las 24h.

* Anexo tabla resultados: Tabla 82

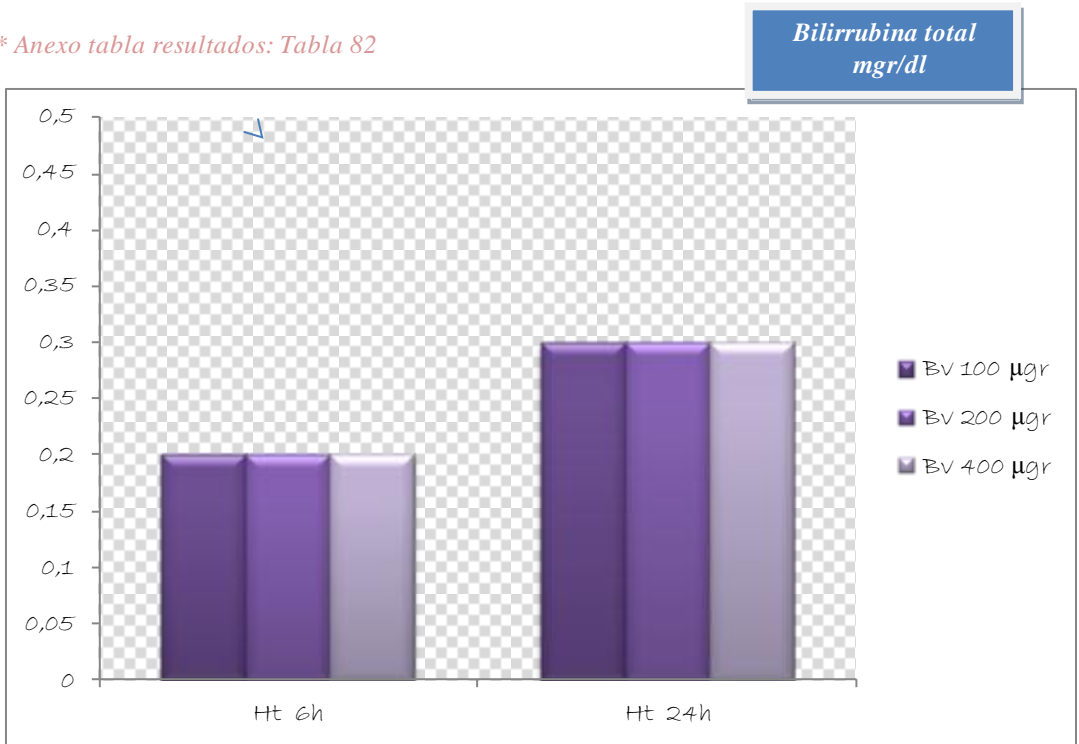


Figura 106. Diagrama comparando bilirrubina total entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de bilirrubina total tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 83

Bilirrubina directa
mgr/dl

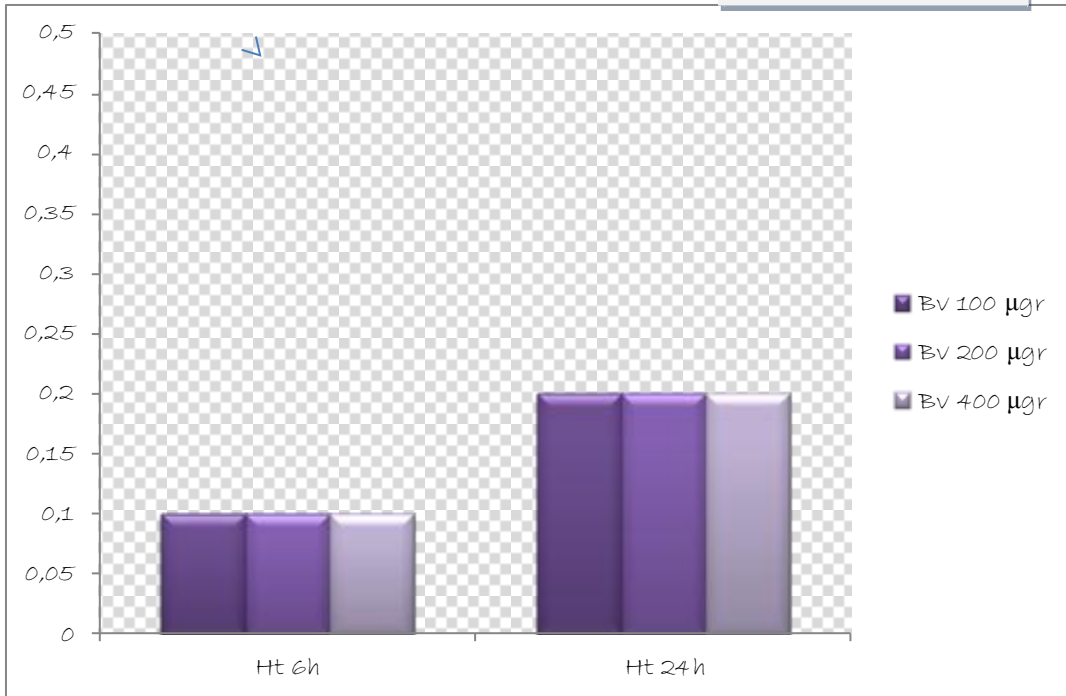


Figura 107. Diagrama comparando bilirrubina directa entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de bilirrubina directa tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 84

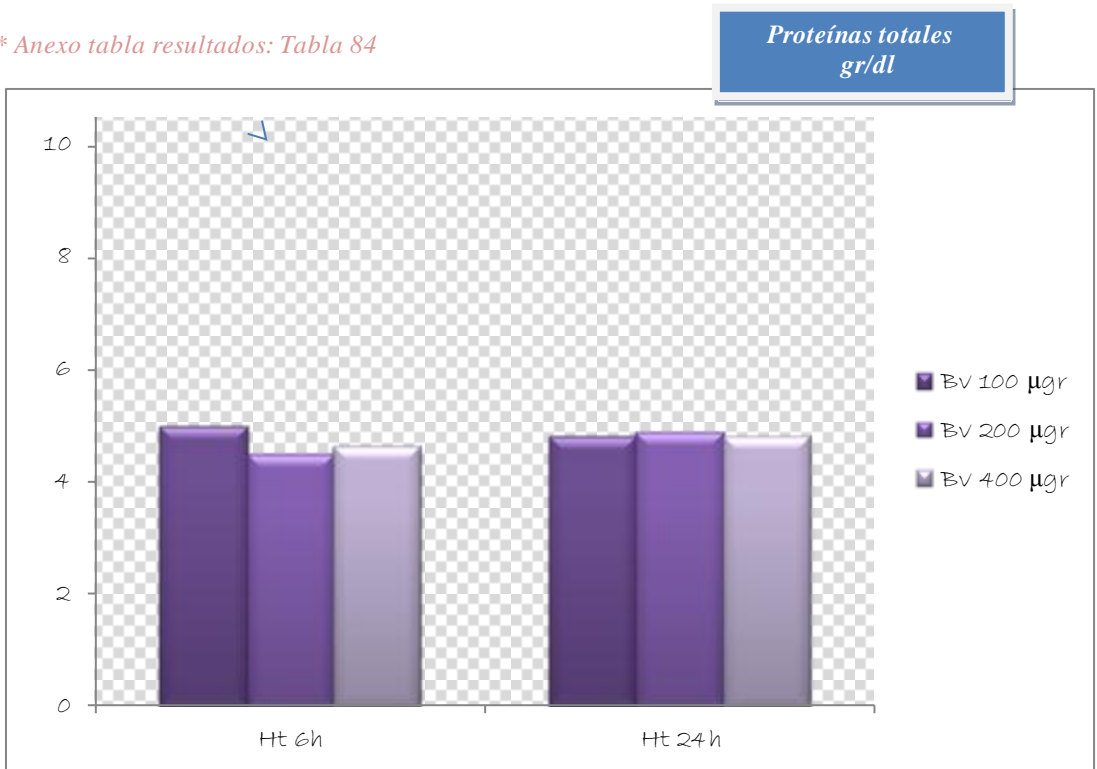


Figura 108. Diagrama comparando proteínas totales entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de proteínas totales tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 85

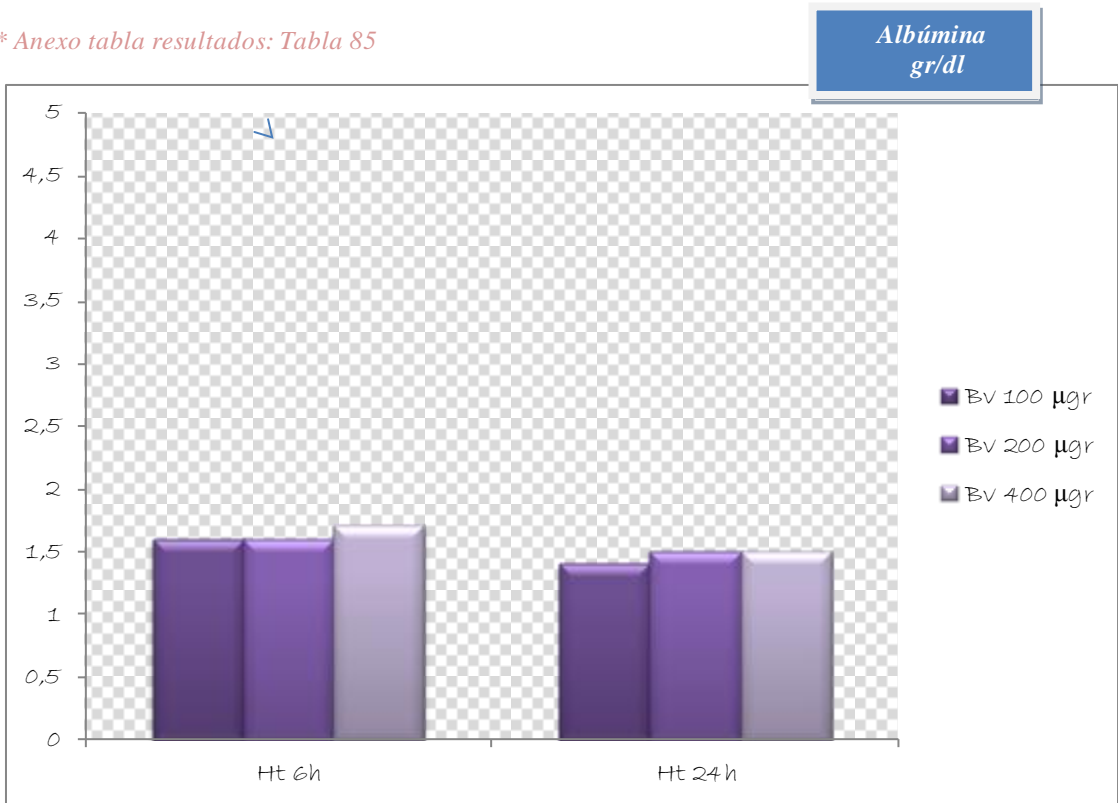


Figura 109. Diagrama comparando albúmina entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de albúmina tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 86

Creatinina
mgr/dl

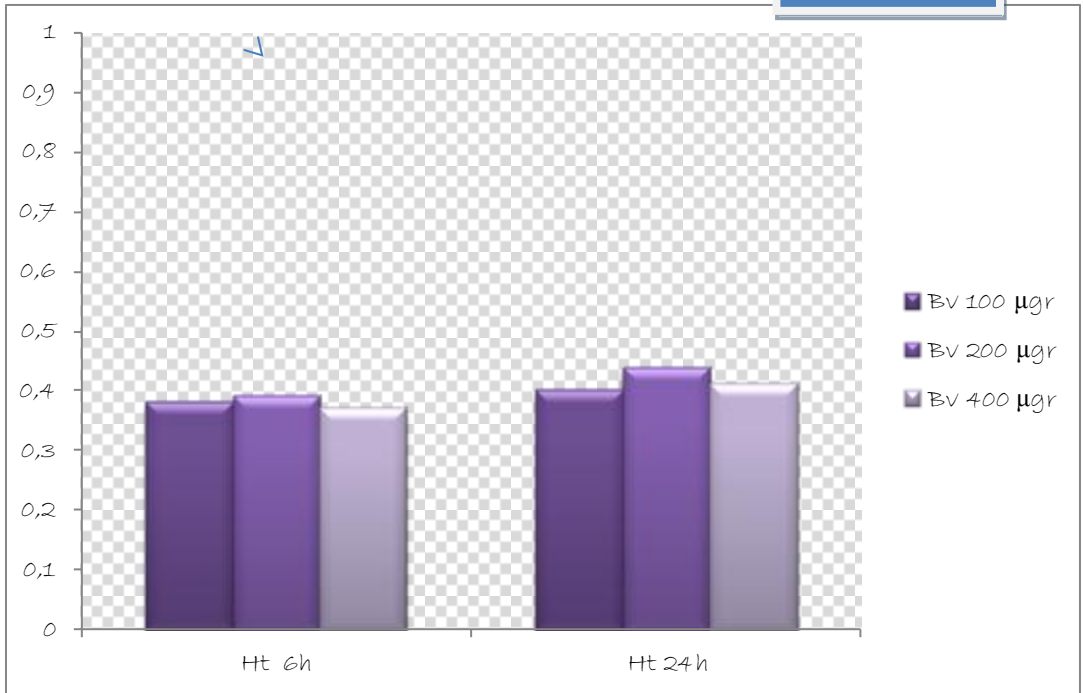


Figura 110. Diagrama comparando la creatinina entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de creatinina tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 87

Urea
mgr/dl

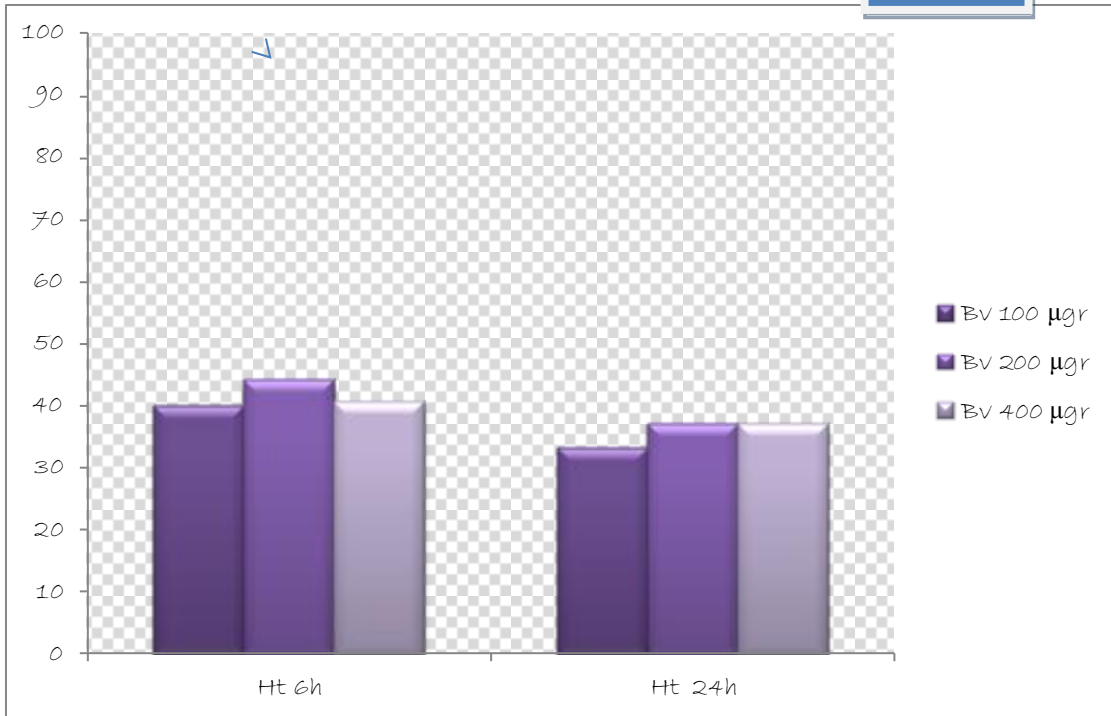


Figura 111. Diagrama comparando la urea entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de urea tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

• Citoquinas

* Anexo tabla resultados: Tabla 88

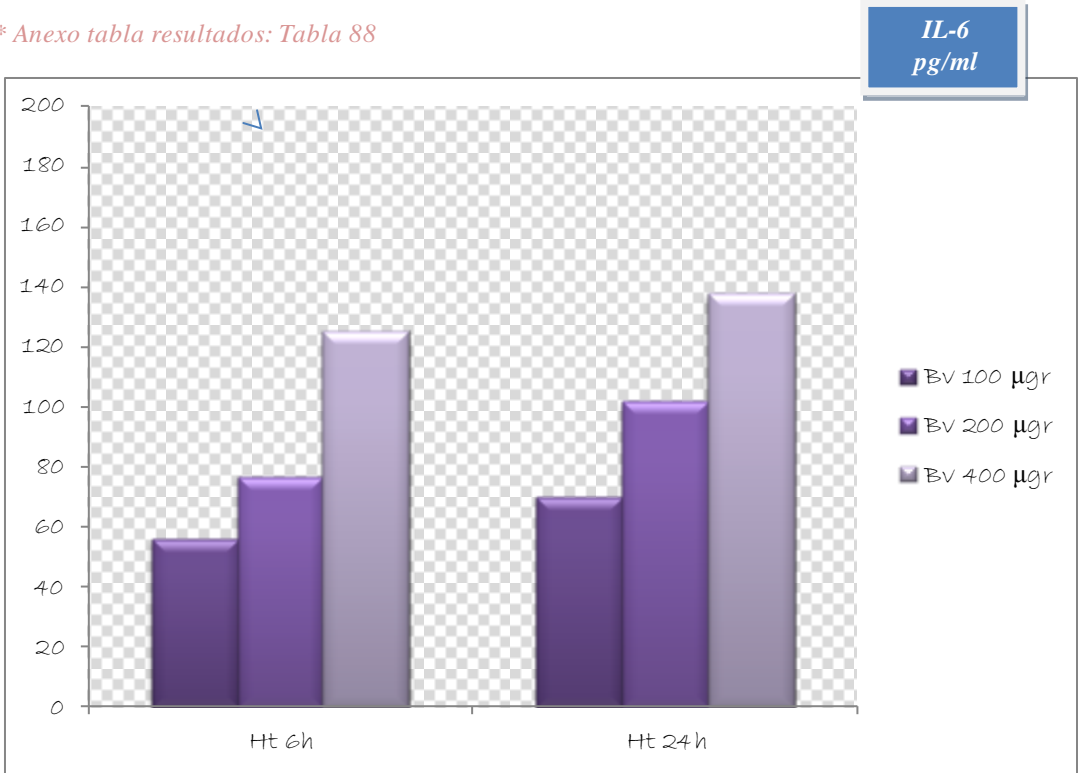


Figura 112. Diagrama comparando la citoquina IL-6 entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la citoquina IL-6 tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 89

TNF α
pg/ml

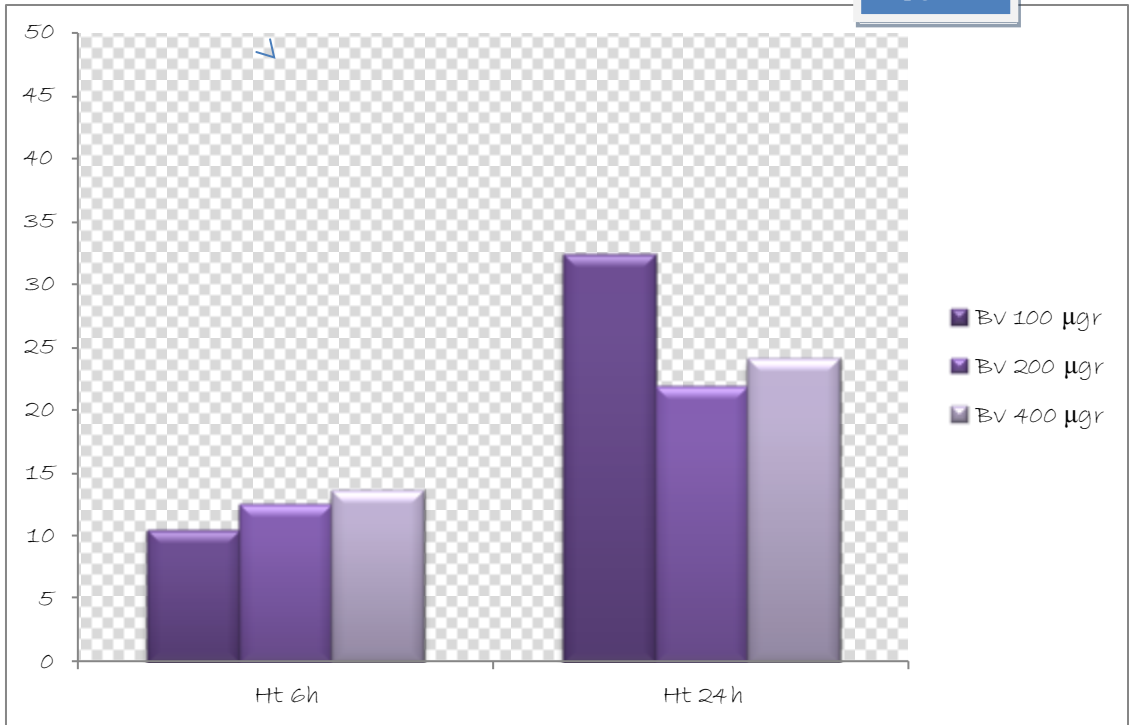


Figura 113. Diagrama comparando TNF α entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la citoquina TNF α tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

[≈] No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 90

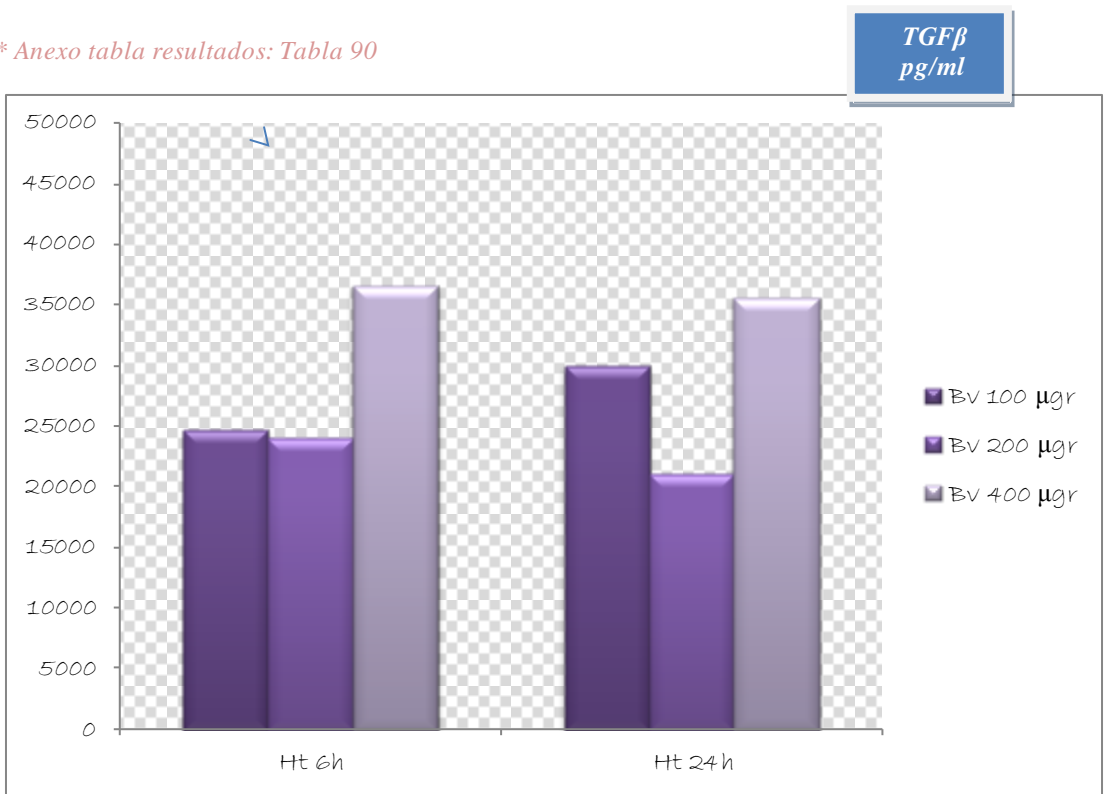


Figura 114. Diagrama comparando la citoquina TGFβ entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.
 (Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h;
 Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la citoquina TGFβ tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas

* Anexo tabla resultados: Tabla 91

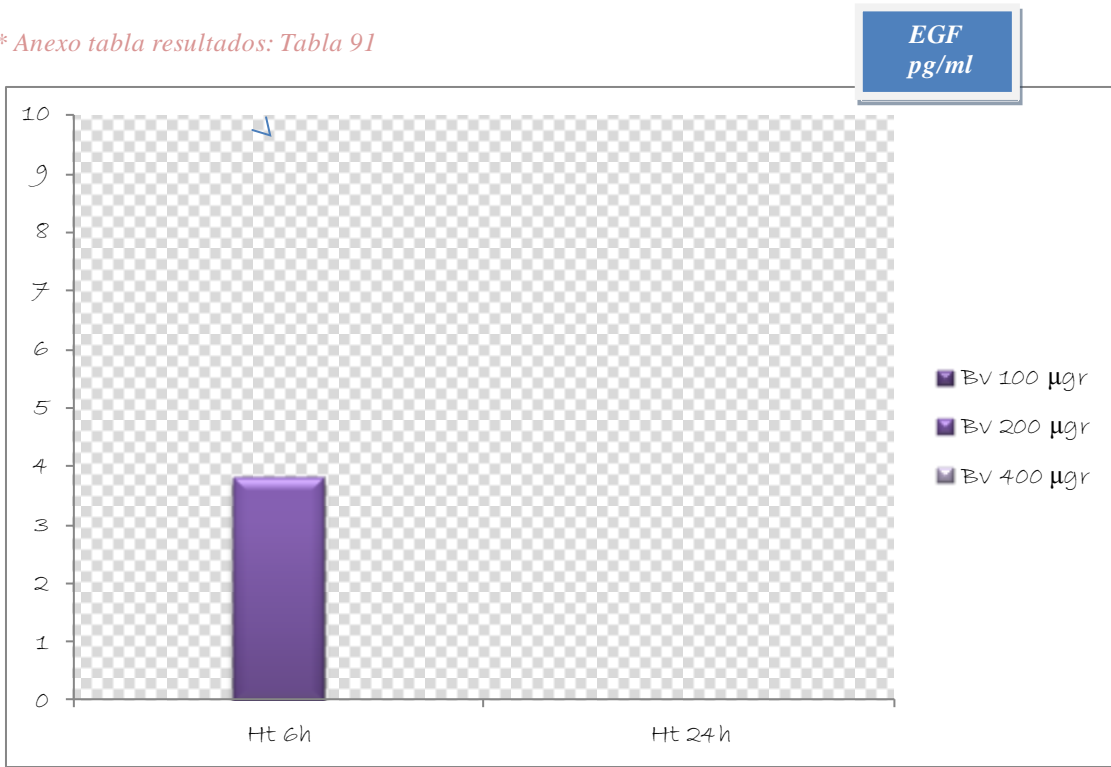


Figura 115. Diagrama comparando la citoquina EGF entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la citoquina EGF tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas siendo muchos de los valores obtenidos igual a cero.

* Anexo tabla resultados: Tabla 92

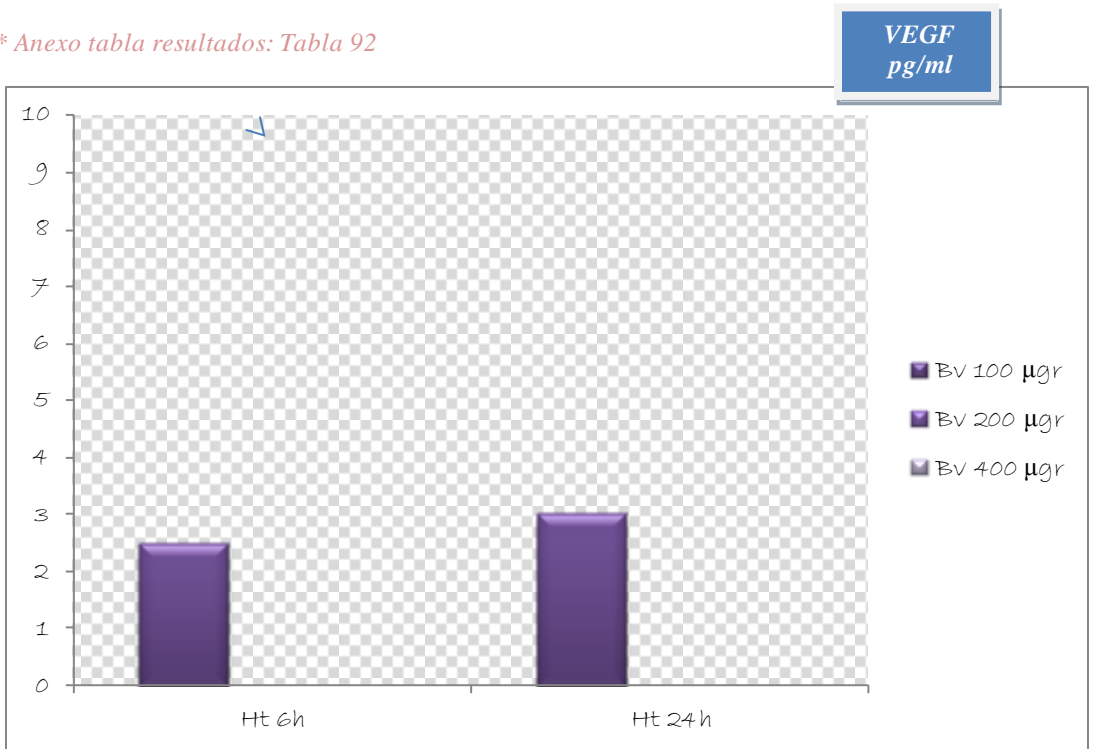


Figura 116. Diagrama comparando la citoquina VEGF entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

El análisis de la citoquina VEGF tras la administración de Bevacizumab en los grupos sometidos a hepatectomía nos muestra:

≈ No se observan diferencias significativas.

0.3. Representación, mediante diagramas de sectores, de las variables cualitativas esteatosis, lesión histopatológica y grado de inflamación hepáticas.

1. Esteatosis hepática

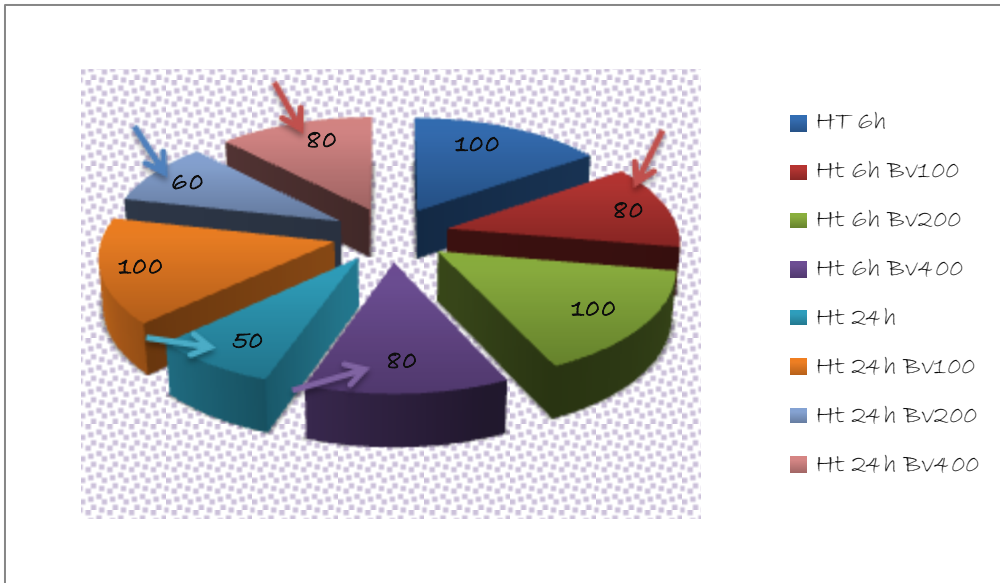


Figura 117. Diagrama de sectores que representa el grado de esteatosis hepática ausente-leve en los diferentes grupos sometidos a cirugía de resección.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

≈ En el grupo al que se le administró 100µgr de Bevacizumab siete días antes de la cirugía con posterior sacrificio a las 6h, en un 20% de los casos se observó una esteatosis hepática moderada-grave

≈ En los grupos a los que se les administró 400µ de Bevacizumab siete días antes de la hepatectomía con posterior sacrificio a las 6 y 24h, en un 20% de los casos de cada grupo, se observó un grado de esteatosis moderado-grave

≈ En el grupo control sin Bv al que se le realizó hepatectomía del 70% con posterior sacrificio a las 24h de la cirugía se observó, en un 50% de los casos, un grado de esteatosis moderado-grave

≈ En el grupo al que se le administró 200µgr de Bv siete días antes de la hepatectomía con posterior sacrificio a las 24h se observó, en un 40% de los casos, un grado de esteatosis moderado-grave.

• Lesión histopatológica

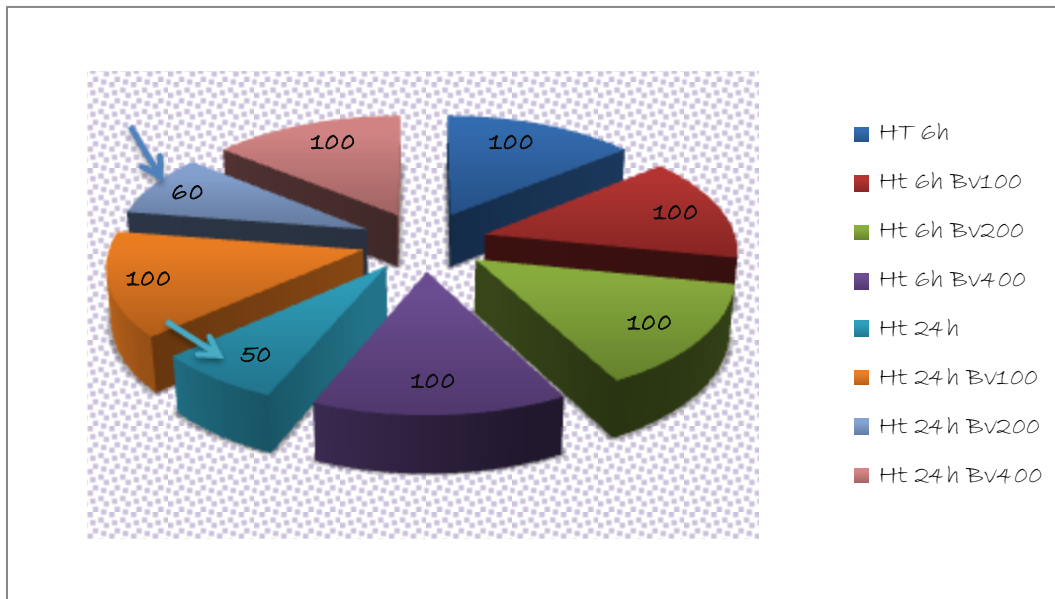


Figura 118. Diagrama de sectores que representa el grado de lesión histopatológica ausente-leve en los diferentes grupos sometidos a cirugía de resección.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

≈ En el grupo control sin Bv al que se le realizó hepatectomía del 70% con posterior sacrificio a las 24h de la cirugía, se observó en un 50% de los casos un grado de lesión histopatológica moderada-grave

≈ En el grupo al que se le administró 200µgr de Bv siete días antes de la hepatectomía con posterior sacrificio a las 24h, se observó en un 40% de los casos un grado de lesión histopatológica moderada-grave.

≈ En el resto de grupos, en un 100% de los casos, se encontró un grado de lesión histopatológica ausente-leve

9. Inflamación hepatocitaria

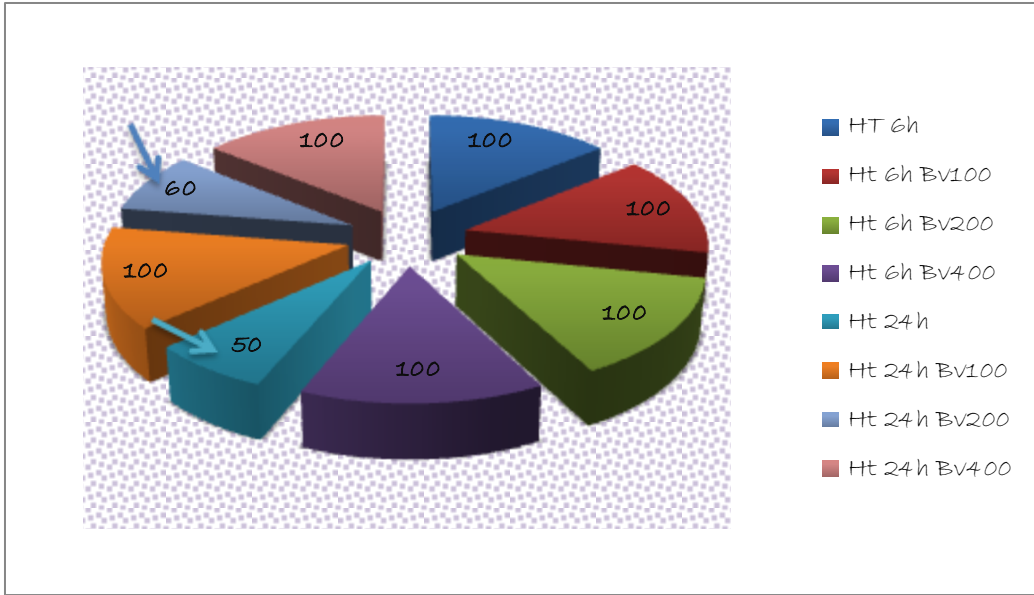


Figura 119. Diagrama de sectores que representa el grado de inflamación hepatocitaria ausente-leve en los diferentes grupos sometidos a cirugía de resección.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

≈ En el grupo control sin Bv al que se le realizó hepatectomía del 70% con posterior sacrificio a las 24h de la cirugía, se observó en un 50% de los casos un grado de inflamación hepatocitaria moderado-grave

≈ En el grupo al que se le administró 200µgr de Bv siete días antes de la hepatectomía con posterior sacrificio a las 24h, se observó en un 40% de los casos, un grado de inflamación moderado-grave.

VII.- DISCUSION

a. -Metodológica y Bibliográfica

Las limitaciones éticas que conlleva la experimentación en humanos, especialmente cuando utilizamos un modelo quirúrgico, ha conducido los esfuerzos de la ciencia en el conocimiento de la regeneración hepática hacia los animales, especialmente a la rata, por su disponibilidad y facilidad anatómica. Es por ello, que nuestro trabajo, sin olvidar la vertiente clínica que como cirujanos tenemos, se ha dirigido a estos animales, fuente del conocimiento científico en su vertiente experimental y de investigación básica.

Siempre que se lleva a cabo un estudio experimental, es necesario en primer lugar cumplir con una serie de variables de estandarización, que permita la reproductibilidad del experimento.

La incidencia de la regeneración hepática debe ser diseñada bajo condiciones experimentales estandarizadas, porque la duración de la fase inicial (estado prerreplicativo), la intensidad y el momento de inicio de la síntesis máxima de DNA y el momento de comienzo de la mitosis que conllevan la inducción de la regeneración

hepática, varía con la especie animal empleada, la edad, estatus nutricional y ritmo circadiano de los animales¹¹¹. A causa del ritmo circadiano de la regeneración hepática, ésta debe ser iniciada en un momento estandarizado del día. Si la regeneración es quirúrgicamente inducida, tanto el régimen anestésico como el analgésico postoperatorio además de ser estandarizados, deben también ser tenidos en cuenta su interacción con el proceso de regeneración en sí. Es preciso evitar drogas como el halotano o el tramadol, por su metabolismo hepático. También deben ser constantes la temperatura corporal durante y tras la intervención quirúrgica.

Los grupos control con operaciones simuladas deben ser siempre incluidos en todos los estudios puesto que el estrés quirúrgico, la manipulación del hígado e incluso la anestesia y farmacoterapia pueden iniciar el fenómeno de síntesis de DNA¹¹².

Una vez que se han definido las condiciones estándar del experimento, debemos discutir acerca de cuál es el modelo experimental más adecuado para el estudio de la influencia de la terapia antiangiogénica en la regeneración hepática, más aún cuando el proyecto tiene una vertiente de aplicabilidad clínica en el campo de la cirugía de resección hepática.

El proceso regenerativo del hígado puede estudiarse desde dos vertientes, la primera sería estudios *in vivo*, mientras que la segunda lo son estudios *in vitro* (cultivo de hepatocitos)¹¹³.

El comportamiento fisiopatológico del hepatocito varía considerablemente en función de si el estudio es *in vivo* o *in vitro*, debido al gran y reconocido impacto que las células no parenquimatosas y su relación con el hepatocito podrían tener en el fenómeno de regeneración *in vivo*².

Gran cantidad de sustancias que se consideran tienen relación con el fenómeno regenerativo *in vivo*, son inespecíficas y probablemente estén presentes sin necesidad de que el fenómeno regenerativo tenga lugar, lo que podría representar un fenómeno de confusión *in vivo*; así mismo muchas de estas

sustancias no pueden ser analizadas del suero.

La capacidad regenerativa del hígado junto al conocimiento anatómico de los segmentos hepáticos, constituyen la base de la cirugía hepática moderna, así, el fenómeno del split en la cirugía del trasplante, ha sido posible gracias al mejor conocimiento del fenómeno regenerativo hepático en el postoperatorio y su adaptación al tamaño corporal (volumen hepático/superficie corporal)¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Sin embargo, la regeneración hepática no siempre tiene lugar tras la lesión hepática, en ocasiones es inefectiva o simplemente no tiene lugar. En ese momento nos encontramos ante la clínica de “fallo hepático agudo”. Sin embargo, cuando el proceso regenerativo es simplemente incompleto, se produce el fenómeno de fibrosis hepática, mediante el cual el tejido parenquimatoso es sustituido no por las mismas células, sino por tejido conectivo. Esta situación de fibrosis hepática tiende a progresar, lo que conlleva en último lugar a la destrucción de la arquitectura lobar y vascular hepática creándose los nódulos regenerativos separados por septos conectivos que

caracterizan al fenómeno de cirrosis y “fallo hepático crónico”¹¹⁷. Los estudios de regeneración en el ser humano presentan importantes limitaciones éticas y también dificultades debidas a la heterogeneidad lesional que precede a la regeneración. Es por ello que los modelos de experimentación animal tienen tanta utilidad e importancia en el conocimiento de este complejo proceso de regeneración hepática. Los modelos in vitro

han permitido conocer e investigar sobre fenómenos de señalización celular indispensables para la regeneración hepática de forma aislada y global, permitiendo en cierto modo desglosar el fenómeno de regeneración hepática, pero debido al amplio espectro de interacciones celulares y moleculares que se dan en la regeneración in vivo, todos los estudios in vitro, deben ser posteriormente validados in vivo.

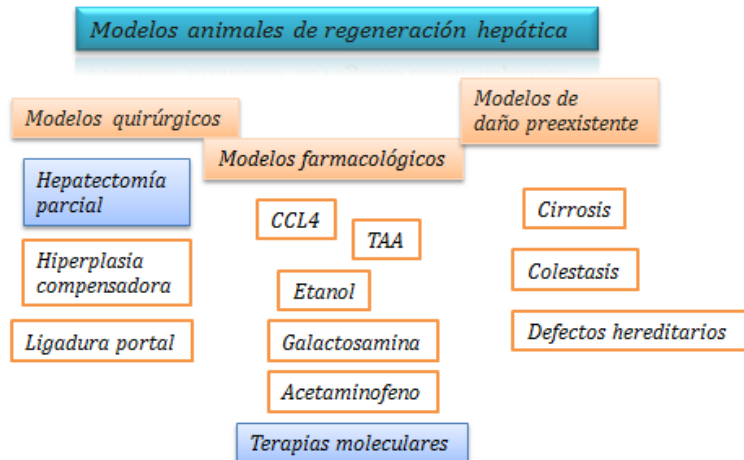


Figura 120. Modelos animales para el estudio de la regeneración hepática y respuesta del hígado frente a un daño
TAA: tiocetamida CCL4: tetracloruro de carbono

~ Hepatectomía del 70%

Las ventajas de inducir la regeneración hepática tras la hepatectomía del 70% de la rata es la uniformidad y consistencia de la anatomía de la rata, que permite al operador resear diferentes proporciones con un alto nivel de seguridad y reproductibilidad (por ejemplo, tras la hepatectomía 2/3, el volumen extirpado es siempre muy próximo al 68%). La resección hepática 2/3 es una intervención quirúrgica, que cuando está perfectamente estandarizada y desarrollada es bien tolerada por la rata sin mortalidad postoperatoria. Las modificaciones de la proporción de hígado resecado alteran la respuesta regenerativa del hígado, así, una hepatectomía mayor o menor de 2/3 está asociada a un proceso regenerativo más lento. Tras una resección de una cantidad mayor del 70%, como sería del 90%, acontecen los fenómenos asociados al fallo hepático agudo como la encefalopatía o coagulopatía y aumentando por tanto el ratio de mortalidad postoperatoria.

Los hepatocitos antes de la hepatectomía están en fase G0. Tras la agresión quirúrgica, de forma sincrónica pasan a fase G1. En estas especies animales el punto de máxima

síntesis de DNA acontece a las 24 horas tras la hepatectomía, permitiendo esto una ventana temporal de adecuada duración y tamaño como para permitir la investigación del espacio extracelular e intracelular de la rata y los eventos que gobiernan la transición del hepatocito adulto de la fase G0 a G1 y de G1 a S. Además el hígado restante o residual no está directamente manipulado en el momento de la hepatectomía e inicia el fenómeno regenerativo sin estar expuesto a necrosis o inflamación. En este modelo debe tenerse en cuenta que la inflamación o la sobreperfusión del hígado residual pueden ejercer una influencia reguladora en la proliferación del hepatocito^{114, 119}.

Los estudios en animales más grandes como el cerdo o el perro no son útiles para el estudio fisiopatológico, sobre todo por el precio y la disponibilidad. Sin embargo si lo son para el estudio hemodinámico posthepatectomía y para solventar problemas de técnica quirúrgica que podamos planteamos^{120, 121}.

Debemos por tanto, justificar la aplicación en nuestro estudio del modelo de hepatectomía del 70% basándonos en:

- ≈ Reproducibilidad.
- ≈ Seguridad.
- ≈ Coste.
- ≈ Disponibilidad.
- ≈ Correlación clínica con nuestra práctica habitual como cirujanos.

No obstante, debemos asumir que al utilizar un modelo animal estamos expuestos a una serie de limitaciones derivadas fundamentalmente de la anatomía y fisiología comparadas.

El uso de modelos de investigación en cirugía hepática basado en ratas está limitado por su pequeño tamaño y el conocimiento limitado de la anatomía hepática de la rata. Como en el ser humano, la vascularización y drenaje biliar de la rata se caracteriza por una gran variabilidad anatómica. Además la anatomía hepática de la rata y su correlación con la humana no es completamente conocida.

El mejor modelo de correlación anatómica murino-humano es el propuesto por Kongure y colaboradores que fue posteriormente modificado^{122, 123}. En este modelo todo el lóbulo lateral izquierdo correspondería al segmento II hepático. El lóbulo medial izquierdo correspondería al segmento III. Sin embargo, este modelo no tiene en consideración que el lóbulo lateral izquierdo presenta dos pedículos vasculo-biliares independientes, que son prerequisites para la consideración como segmento hepático.

Basado en conceptos de topografía y proporcionalidad, se llevaron a cabo una serie de modificaciones, de tal forma que el pequeño segmento superior del lóbulo lateral izquierdo correspondería al segmento II hepático y la porción más amplia e inferior del lóbulo lateral izquierdo sería considerada el segmento III hepático. De esta forma, el lóbulo medial izquierdo sería considerado como segmento IV, mientras que el lóbulo medial derecho correspondería a los segmentos V y VIII. En los animales, el drenaje venoso suprahepático del lóbulo lateral izquierdo y del lóbulo medial izquierdo forma un tronco común antes de

drenar en la vena cava. Concomitantemente, algunas ramas biliares del lóbulo medial izquierdo podrían drenar en ramas del lóbulo lateral izquierdo.

De esta forma resecciones aisladas de uno de estos lóbulos podría provocar colestasis o congestión del lóbulo adyacente¹²³.

Hígado de la rata	Hígado del ser humano
Hígado multilobulado	Parece ser una unidad anatómica
Tronco celíaco largo	Tronco celíaco corto
Vena cava inferior intrahepática	Vena cava inferior retroperitoneal
Ausencia de vesícula biliar	Presencia de vesícula biliar
Vía biliar a la izquierda de vena porta y larga trayectoria intrapancreática	Vía biliar a la derecha de la vena porta y corta trayectoria intrapancreática.
Circulación arterial colateral común (arteria hepato-esofágica)	Circulación arterial colateral infrecuente
Shunt porto-sistémicos frecuentes	Shunt porto sistémicos infrecuentes
Clara subdivisión del lóbulo caudado	Lóbulo caudado no subdividido
Trifurcación portal	Bifurcación portal
Hígado izquierdo y derecho de similar volumen	Volumen del hígado derecho superior al izquierdo
* Hígado de la rata Wistar macho tipo de 300 gramos	
Peso	13,31 +/- 0,98 (12-15) gramos
Diámetro antero-posterior	2,23 +/- 0,17 (2,2-2,5) cm
Diámetro latero-medial	7,66 +/- 0,16 (7,5-8,0) cm
Diámetro supero-inferior	3,95 +/- 0,12 (3,8- 4,2) cm
Vascularización	Diámetro Longitud (mm) (mm)
Vena cava Inferior	5,33 +/- 0,49 53,25 +/- 1,91 (50-55) (56)
Vena Porta	2,54 +/- 0,62 7,95 +/- 0,86 (4-9) (2-4)
Arteria Hepática propia	0,29 +/- 0,11 3,75 +/- 0,38 (3-4) (0,2-0,5)
Sistema Biliar y Vía Biliar Principal	0,85 +/-0,17 13,25 +/- 1,29 (12-16) (0,6-1,0)

Tabla anexa 1. Anatomía comparada hepática rata Wistar y ser humano¹²³.

~ Terapias moleculares

El factor de crecimiento del endotelio vascular, regula la angiogénesis y la inducción de factores de crecimiento en el hígado tras un daño hepático, como sabemos. El bevacizumab, que actúa inhibiendo el VEGF, es actualmente considerado como primera línea de tratamiento en los pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal.

Sin embargo y pese al gran entusiasmo que ha suscitado en cuanto a resultados se refiere, son escasos los estudios experimentales existentes que nos acercan a los posibles efectos que ejercen estas terapias moleculares en el hígado tras cirugía de resección.

	Humano	Rata Wistar
dosis	5mg/kg Cada 14días	5mg/kg (200ugr) Dosis única
Vía de administración	Intravenosa Infusión continua	Intraperitoneal En bolo
Vida media	20días(11-50d)	13días(15-20d)
Tiempo entre administración Bv y realización Cirugía	6-8semanas	1semana

Tabla anexa 2. Aplicación del Bevacizumab en el modelo murino. Comparación con el modelo humano.

Llevar a cabo un estudio de tales características en el humano sería muy tedioso y con una morbilidad no desdeñable, por la necesidad de toma de biopsias hepáticas para un estudio exacto del fenómeno de regeneración.

Por tanto, basándonos en la escasa literatura de investigación experimental existente sobre el tema y en el modelo humano de utilización del anticuerpo, hemos diseñado la metodología de aplicación del bevacizumab en nuestro modelo animal murino^{91,124-127}.

Una vez definidas y asumidas las limitaciones de nuestro proyecto, en lo que se refiere a aplicabilidad clínica del experimento, condiciones experimentales, elección del modelo experimental y correlación animal-humano, debemos pasar a discutir las variables elegidas para realizar el cálculo de las diferentes vertientes de la regeneración hepática.

.- Masa hepática regenerada

Con propósitos experimentales, la masa de hígado resecado y residual, pueden ser fácilmente determinados con balanzas de precisión. Obviamente, cuando se trata de estudios de práctica clínica, este método no es posible. De forma indirecta, mediante TC, se puede llegar en la clínica a una medición muy aproximada.

La masa hepática se calcula según la siguiente fórmula: *peso estimado en gramos*
 $= 0,81 \times (\text{Volumen hepático en ml}) + 372.$

El problema de esta fórmula, es que el volumen o peso hepático varía en función del

acúmulo de lípidos, glucógeno y células inflamatorias no residentes habituales del hígado, que puedan estar presentes tanto por un fenómeno de regeneración hepático, así como por actividad hiperplásica.

Así mismo, el hígado actúa como un depósito de sangre, de tal forma que los cambios en el flujo hepático podrían alterar el volumen o masa hepática y las determinaciones de diámetros. De esta forma, el cálculo de masa hepática regenerada, no puede ser utilizado como un marcador fiable de regeneración hepática y rara vez es incluido en los estudios como el único marcador.

En nuestro estudio hemos incluido como Índice de Regeneración el obtenido mediante la fórmula de Kwon.

.- Microscopía óptica

≈ *Tinción con Hematoxilina-Eosina*

Nos permite determinar variables como la lesión histológica y grado de inflamación después de una agresión al hígado (en este caso la hepatectomía), así como variables del tipo esteatosis. Es por tanto una técnica indispensable para evaluar la regeneración hepática a nivel tisular.

≈ *Incorporación de BrdU.*

La BrdU es un análogo de la timidina que se incorpora al igual que ésta al DNA durante la fase de síntesis. Esta incorporación puede ser detectada por inmunohistoquímica usando citometría de flujo o anticuerpos monoclonales. La BrdU, al igual que la timidina puede usarse tanto in vivo como in vitro.

La principal ventaja que ofrece esta técnica es la posibilidad de su uso en seres humanos, y el tiempo bastante más corto necesario para obtener resultados respecto de la timidina. Su uso in vitro requiere de una compleja y delicada recogida de muestras de incubación tisular, además de requerir un equipamiento caro y específico.

Al mismo tiempo, hemos podido objetivar que desde la administración de la 1ª inyección de BrdU hasta la determinación de la misma, existe un aclaramiento progresivo de ésta por el hígado en regeneración, de tal forma que la tinción es claramente menos rentable, cuanto mayor es este decalaje de tiempo.

De esta forma, explicamos que hay múltiples hepatocitos que han cumplido el ciclo celular de forma satisfactoria alcanzando la mitosis, en el intervalo de tiempo que va desde las 6 hasta las 24 horas posthepatectomía y que ya han aclarado la BrdU.

.- Estrés oxidativo

El incremento de los niveles del glutatión reducido (GSH) ocurre de forma temprana durante el proceso de regeneración hepática, siendo un importante indicativo, junto con el cociente GSH/GSSG, de una adecuada proliferación celular.

La medición de sustancias derivadas de la peroxidación lipídica (TBARS) y el estado energético celular evidenciado mediante el ATP, son claros indicativos del estrés oxidativo celular, por lo que consideramos de interés la inclusión de dichas variables en nuestro estudio^{107,108,109}.

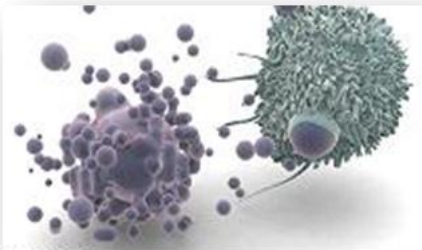


Figura 121. Fase final de la apoptosis celular. Monocito fagocitando célula apoptótica

.- Bioquímica. Perfil hepático

~ Transaminasas

Las transaminasas (aspartatoaminotransferasa, AST y alaninaaminotransferasa, ALT) son enzimas citoplasmáticas muy abundantes en hígado que participan en el metabolismo de los aminoácidos y realizan la conversión de un aminoácido en un ácido carboxílico. Cuando existe una lesión hepática son liberadas al torrente sanguíneo, de tal forma que la determinación de los niveles en plasma es un reflejo de la lesión hepática.

~ Bilirrubina

Los niveles de bilirrubina están ligados directamente con la función hepática (clasificación de Child-Pugh) y es por tanto de interés en nuestro estudio para relacionar la función hepática posthepatectomía con la regeneración del hígado, y poder comparar los animales que reciben el anticuerpo monoclonal con los que no.

≈ Urea y creatinina

La repercusión de la resección hepática en la función renal se ha relacionado en múltiples trabajos, y viene especialmente ligado a la pérdida hemática durante la cirugía, el procedimiento anestésico, y con la función hepática del hígado remanente¹²⁸.

≈ Fosfatasa Alcalina

Existe un incremento transitorio en los niveles de fosfatasa alcalina después de la resección hepática mayor¹²⁹, de tal forma que estudiar los niveles de esta enzima comparándola entre grupos que reciben o no el fármaco puede ser útil.

≈ Proteínas Totales

Los niveles de proteínas, y en especial los de albúmina, estarían directamente relacionados con la morbilidad y mortalidad posthepatectomía¹³⁰. Es por ello que fue esta variable incluida en nuestro estudio.

.- Citoquinas

La determinación de citoquinas juega un rol fundamental en el estudio de la regeneración hepática, especialmente en lo que a su cinética se refiere. La elección de TNF- α , IL-6 y TGF- β , viene fundamentada en que la primera es indetectable en plasma ante la ausencia de agresión y se incrementa con la cirugía, así como es una vía de activación que eleva los niveles de IL-6, que es la citoquina fundamental en la regeneración del hígado. La elección de TGF- β , viene determinada porque se trata de la principal citoquina involucrada en la transformación del crecimiento del lóbulo hepático regenerado, y también la primera con esta función en elevarse tras la agresión^{4,6}.

Los factores de crecimiento EGF y VEGF son esenciales en el control externo del ciclo celular estimulando la proliferación celular mediante el inicio de la mitosis, la supervivencia, migración y diferenciación celular, e incluso la apoptosis. Por ello creemos que es de gran interés su medición en nuestro estudio.

b. - De resultados

La cirugía hepática se ha convertido en una cirugía segura en los últimos 10-15 años, gracias a la mejora en los procedimientos diagnósticos preoperatorios, a una técnica quirúrgica más precisa y a la aparición de instrumental que reduce la complejidad técnica, aumentando la seguridad del paciente. De esta forma, la mortalidad postoperatoria de la cirugía hepática se ha reducido por debajo del 5%, estando directamente relacionada con la función hepática y el volumen hepático residual.

Pero ¿qué ocurre si unimos la exposición del paciente a los nuevos agentes citotóxicos y terapias biológicas, previa cirugía de resección hepática?

Son escasos los estudios experimentales que analizan los efectos de los antiangiogénicos sobre el hígado tras cirugía de resección, destacando el llevado a cabo por el grupo de Van Buren et al⁹¹ que analiza los efectos de la terapia antiVEGF y anti EGF sobre la regeneración hepática en un modelo murino sometido a hepatectomía del 66%. Van Buren y su grupo observan una ligera afectación en el fenómeno de regeneración

hepática en los animales tratados con anticuerpos antiVEGF, no así a los que se les administra anticuerpos antiEGFR.

Otros estudios experimentales presentes en la literatura, analizan fundamentalmente la regulación de metástasis hepáticas inducidas en un modelo murino tras la administración de anticuerpos antiVEGF, pero sin analizar en sí cómo afecta ésta terapia en el fenómeno de regeneración hepática^{80,90}.

Por otro lado varios son los estudios llevados a cabo en humanos, a destacar el de Gruenberger et al¹³² que publican los resultados de un estudio prospectivo en fase II, en el que evalúan el impacto del Bv sobre las complicaciones quirúrgicas tras resección por metástasis hepáticas de cáncer colorrectal. Cincuenta y seis pacientes recibieron Bv, capecitabina y oxaliplatino, y el bevacizumab se administró unas cinco semanas antes de la cirugía. No se observó incremento de las complicaciones quirúrgicas, sangrado, o alteración de la función hepática con respecto a los controles históricos. La tasa de respuesta obtenida fue del 73%. El estudio cuenta con varios

inconvenientes: primero, el número de pacientes incluidos es relativamente pequeño, y segundo, una evaluación de la regeneración hepática medida por TC, tan sólo tres meses después de la cirugía, es un período demasiado corto para una correcta evaluación de la capacidad regenerativa del hígado. Sin embargo, estos datos demuestran que el bevacizumab puede administrarse con seguridad de forma preoperatoria en la neoadyuvancia de las metástasis hepáticas de origen colorrectal.

En otro reciente estudio llevado a cabo por D'Angelica et al¹³³, no se han demostrado diferencias significativas en cuanto a la morbilidad peroperatoria ni aumento de las complicaciones postquirúrgicas en pacientes tratados con Bv preoperatoriamente.

El grupo de Reddy et al¹³⁴, también ha comprobado que no existe un incremento en la morbilidad en pacientes que reciben Bv en combinación con otros agentes quimioterápicos previa a la resección hepática, versus aquellos que reciben sólo agentes citotóxicos sin Bv, en un estudio retrospectivo con 96 pacientes, administrando el anticuerpo unas ocho

semanas previa a la cirugía.

En la Conferencia Europea contra el Cáncer, celebrada en Barcelona en 2007, se presentaron los resultados de un estudio internacional en fase IV en el que participaron 41 países (el estudio First BEAT¹³⁵: “Bevacizumab Expedited Access Trial”). Se trata de un registro no randomizado que incluye a 1965 pacientes, los cuales reciben tratamiento de primera línea con BV en 215 cirugías con intención curativa, observándose tan sólo una incidencia de un 4% de complicaciones en la cicatrización de la herida quirúrgica.

Estos estudios son muy alentadores y sugieren que el bevacizumab puede ser administrado con seguridad preoperatoriamente en combinación con otros quimioterápicos en el tratamiento de las metástasis hepáticas de origen colorrectal.

En nuestro estudio, de características experimentales, hemos querido hacer hincapié, en la influencia que presenta el Bevacizumab, como terapia antiangiogénica extensamente utilizada en la actualidad, en el fenómeno de regeneración hepática.

~ ¿qué efecto tiene el Bevacizumab en el hígado no sometido a cirugía de resección?

a.- Proliferación y estrés oxidativo

Uno de los puntos más importantes para valorar la regeneración hepática es la proliferación de las células parenquimatosas. Existen diversas fórmulas para evaluarla, aunque la más utilizada es la incorporación de BrdU, un análogo de la timidina, que se acopla a la célula en proliferación en fase G1 y S del ciclo celular. De esta forma tenemos un marcador fiable de proliferación hepática. Se considera que la incorporación de BrdU es progresiva, y que la máxima expresión de ésta suele producirse durante las primeras 24-48 horas posthepatectomía.

En nuestro estudio hemos podido objetivar un aumento de células BrdU positivas en los grupos a los que se les administra el antiangiogénico respecto a los grupos control Os6h y Os24h, al contrario de lo que cabría esperar como ocurre en el estudio experimental ya comentado de Van Buren et al⁹¹. A su vez, cuando realizamos la comparación de los grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada, también se observa un aumento de la proliferación

hepatocitaria en los grupos con una dosis de 400µgr de Bv.

Estos resultados nos orientan hacia una única respuesta: el perfil cinético de replicación del hepatocito se ve modificado ante la presencia de una “agresión externa”, en este caso el Bevacizumab, aumentando la transcripción de genes específicos de replicación, y por tanto encontrando mayor cantidad de hepatocitos en fase S del ciclo celular (BrdU +).

En cuanto al índice de estrés oxidativo sabemos que la relación GSH/GSSG es un parámetro clave del estado redox del glutatión celular, y provee una medida de la presencia de daño oxidativo¹³⁶. A medida que disminuye la proporción de GSH y/o incrementa la proporción de GSSG, disminuye dicho cociente, siendo reflejo fiel de daño oxidativo. En nuestro estudio hemos observado un aumento de cociente GSH/GSSG y por lo tanto una disminución del glutatión oxidado, en los grupos a los que se les administra el antiangiogénico (100,200 y 400µgr) respecto a los grupos control Os6h y Os24h. Si comparamos en función de la

dosis de Bv administrada, obtenemos menor índice de estrés oxidativo en el grupo Os24h 200µgr respecto al grupo Os 24h 100µgr.

Las sustancias derivadas del fenómeno de peroxidación lipídica (TBARS) y las moléculas de adenosín trifosfato (ATP) liberadas por la célula, nos muestran como sabemos, una medida indirecta del estado de estrés oxidativo del hepatocito. En concordancia con los resultados obtenidos con el índice de estrés oxidativo, se observa una disminución de TBARS en el grupo al que se le administra 200µgr de Bv siete días antes de la cirugía con posterior sacrificio a las 6h, respecto a su grupo control Os6h y una disminución del ATP liberado en el grupo Os6h 200µgr respecto al grupo CBv400µgr (sin cirugía).

Así, cuando añadimos Bevacizumab siete días antes de la cirugía (operación simulada) a dosis de 100,200 y 400µgr con posterior sacrificio del animal a las 6h y 24h, observamos un aumento de la proliferación hepatocitaria sin acompañarse de un aumento del estrés oxidativo en la mayor parte de los grupos.

b.- Perfil hepático

El nivel de necrosis hepatocelular medido por los marcadores necróticos-inflamatorios ALT y AST, nos muestra un aumento de la transaminasa ALT en los grupos a los que se les administra Bv 100, 200 y 400µgr siete días antes de la operación simulada con posterior sacrificio a las 6h, respecto al grupo no sometido a cirugía CBv 400µgr. No se observaron diferencias significativas de interés en los niveles de AST. Estos resultados traducen la agresión quirúrgica a la que son sometidos los animales a los que se les realiza una cirugía de movilización hepática y disección de pedículo (operación simulada).

Los niveles de GGT no mostraron diferencias entre los distintos grupos pero sí en cambio los de fosfatasa alcalina. Se observó una disminución de la FA en todos los grupos a los que se les administró el antiangiogénico a dosis de 100, 200 y 400µgr siete días antes de la cirugía con posterior sacrificio a las 6h y 24h respecto a los grupos control sin cirugía Os6h, Os24h y CBv400µgr. Sabemos que los niveles de FA se elevan ante una agresión hepática importante¹²⁹, y en nuestro caso el

antiangiogénico se comporta como un “factor protector”. No se observaron diferencias entre grupos en función de la dosis de Bv administrada.

Los niveles de bilirrubina, tampoco experimentaron diferencias significativas entre grupos, salvo el incremento transitorio de los niveles de bilirrubina tras la cirugía, que es un fenómeno visible en las analíticas postoperatorias habituales de una cirugía hepática¹³⁷ (más observado en los grupos sometidos a hepatectomía).

Los niveles de proteínas totales tras la cirugía, tampoco tuvieron más relevancia que la diferencia observada entre el grupo al que se le administra 200µgr de Bv una semana antes de la cirugía con posterior sacrificio a las 6h, respecto a su grupo control Os6h. En cuanto a los niveles de albúmina, tan sólo destacar la caída observada en el grupo al que se le administra 400µgr del antiangiogénico siete días previos a la cirugía con posterior sacrificio a las 24h, respecto al grupo al que se le administra 100µgr.

Por otro lado, ha sido demostrada la intensa relación que la cirugía hepatobiliar y el trasplante hepático tienen con la función

renal¹³⁸. En nuestro experimento, aunque existieron algunas diferencias estadísticamente significativas en los niveles de urea a las 6 y 24horas de la cirugía (operación simulada) entre ratas a las que se les administra el antiangiogénico y a las que no se les administra, no fueron relevantes desde el punto de vista clínico, pues no sobrepasaron los rangos estándar de normalidad.

c.- Citoquinas

La interleuquina 6 es la principal citoquina implicada en el fenómeno de regeneración hepática, con un pico máximo en las primeras 6h -24h y un descenso posterior a partir de las 48h. En nuestro estudio hemos obtenido varios valores de IL-6 igual a cero, sobre todo en los grupos de ratas a las que se les administran 400µgr de Bv, pero sin diferencias significativas con respecto a los grupos a los que no se les aplica el antiangiogénico. Esto podría interpretarse como un retraso en la expresión de dicha citoquina ante la administración de la terapia antiangiogénica.

Los niveles obtenidos de TNF α son similares en los distintos grupos de animales sin observarse diferencias estadísticamente significativas.

Tampoco se obtienen resultados relevantes para la citoquina TGF β , destacando una caída significativa de sus niveles en el grupo al que se le administra 200 μ gr de Bv siete días antes de la cirugía con posterior sacrificio a las 24h, respecto a su grupo control Os24h.

En cuanto a los factores de crecimiento epidérmico y del endotelio vascular (EGF, VEGF), no se observan diferencias significativas entre grupos para los valores obtenidos de EGF pero sí para algunos de VEGF. En los grupos a los que se les administra el antiangiogénico a dosis 100 y 400 μ gr siete días antes de la cirugía con posterior sacrificio a las 24h, se produce una elevación de los niveles del factor de crecimiento del endotelio vascular respecto al grupo sin cirugía CBv400 μ gr.

Otro dato de interés a observar en cuanto al comportamiento de ésta citoquina, es que presenta una mediana elevada sobre todo en los grupos de animales a los que se les

administra el doble de la dosis de Bevacizumab.

El VEGF puede producirse en las células que no están recibiendo suficiente oxígeno. Cuando una célula es deficitaria en oxígeno produce HIF (hipoxia-inducible factor) que a su vez estimula la producción de VEGF entre otras funciones. El VEGF circulante se une a sus receptores situados en las células endoteliales, desencadenando así una vía tirosina- kinasa que conduce a la angiogénesis.

Por lo tanto podríamos pensar ante estos resultados, que el hepatocito ante la presencia del antiangiogénico, que bloquea la unión de VEGF con sus receptores, entra en un estado de hipoxia que hace, de forma compensatoria, que la célula hepatocitaria produzca mayor cantidad de VEGF.

d.- Esteatosis, inflamación y lesión histopatológica hepáticas.

No hemos observado mayor esteatosis, grado de inflamación o lesión histopatológica hepáticas en los grupos de animales a los que se les administra la dosis basal, la mitad y el doble del antiangiogénico.

~ ¿Qué efecto tiene el Bevacizumab en el hígado sometido a hepatectomía del 70%?

a.- Índice de regeneración hepática

El índice de regeneración hepática que hemos calculado mediante al fórmula de Kown, no nos muestra diferencias entre los grupos sometidos a hepatectomía previa administración de Bevacizumab, respecto a los que no se les administra el antiangiogénico. Tan sólo en el grupo al que se le aplica la terapia antiangiogénica a dosis de 100µgr siete días antes de la hepatectomía con posterior sacrificio a las 6h, se ha observado una disminución del índice de regeneración hepatocitaria respecto a su grupo control Ht6h.

Así mismo, tampoco hemos observado diferencias entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

b.- Proliferación y estrés oxidativo

En nuestro estudio hemos podido objetivar un aumento significativo de células BrdU positivas en los grupos a los que se les administran 100, 200 y 400µgr de Bv siete días antes de la cirugía con posterior sacrificio a las 24h, respecto al grupo control

Ht 24h. De forma similar a lo observado en los grupos sometidos a una operación simulada, se produce un aumento de la proliferación hepatocitaria en aquellos animales a los que se les aplica la terapia antiangiogénica. No se observan diferencias entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

En cuanto al índice de estrés oxidativo medido por el cociente glutatión reducido/glutatión oxidado, no se observan diferencias significativas entre grupos, ni en función de la dosis de Bevacizumab administrada.

La energía celular liberada no es mayor en los grupos a los que se les administra la terapia antiangiogénica, pero sí observamos un incremento de las sustancias derivadas de la peroxidación lipídica en los grupos a los que se les administran 400 y 200µgr de Bv siete días antes de la hepatectomía con posterior sacrificio a las 6 y 24h respectivamente, respecto a los que se les administra la dosis basal del antiangiogénico.

c.- Perfil hepático

Hemos comprobado en nuestro estudio que no se produce un incremento significativo del nivel de las transaminasas ALT y AST en los grupos sometidos a hepatectomía del 70% y a los que se les administra el antiangiogénico.

Los niveles de GGT tampoco se modificaron, y en relación a la fosfatasa alcalina se encontró una diferencia significativa en los grupos a los que se les administró 100 y 400µgr de Bv (valores más bajos de FA), respecto al grupo sin antiangiogénico Ht6h.

Los niveles de bilirrubina, tampoco experimentaron diferencias significativas entre grupos, salvo el incremento transitorio de los niveles de bilirrubina tras la cirugía¹³⁷.

Así mismo, no se obtienen datos relevantes para los niveles de proteínas totales y albúmina.

La función renal no se ve modificada por la administración del antiangiogénico Bevacizumab.

d.- Citoquinas

Es de destacar que, la Il-6, principal citoquina implicada en la cinética de la regeneración hepática, presenta un pico

importante en los grupos a los que se les administran 400µgr de Bv siete días antes de la hepatectomía con posterior sacrificio a las 6 y 24h, aunque los resultados obtenidos no son estadísticamente significativos.

De forma paralela se obtienen niveles parecidos, aunque también sin significación estadística, para la citoquina TGFβ.

Por ello, y a pesar de la presencia del Bevacizumab, observamos que se conserva la cinética de regeneración hepática para las interleuquinas Il-6, TNFα y TGFβ.

En el trabajo experimental llevado a cabo por Van Buren et al⁹¹ se produce un bloqueo de la inducción de la IL-6 en los grupos de animales a los que se les administra la terapia anti-VEGFR-2.

En cuanto al factor de crecimiento VEGF, la mayor parte de los valores obtenidos para los diferentes grupos de animales son indetectables bajo la curva (representados como cero en el diagrama: Figura 96), al contrario de lo que observamos en los grupos operación simulada.

e.- Esteatosis, lesión histopatológica y grado de inflamación hepáticas

No hemos observado mayor esteatosis, grado de inflamación o lesión histopatológica hepáticas en los grupos de animales a los que se les administra la dosis basal, la mitad y el doble del antiangiogénico.

La mayor parte de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, carecen de apoyo científico en la literatura dada la escasez de estudios existentes respecto al tema.

Sí queremos destacar lo reseñado por LM Ellis en su trabajo “Surgical Resection after Downsizing of Colorectal Liver Metastasis in the Era of Bevacizumab”⁸⁵, en el que comenta que una de las razones por las que no hay estudios publicados que analicen el efecto de la terapia anti-VEGF en la regeneración hepática, es que en los modelos murinos no puede usarse la terapia con Bevacizumab puesto que es un anticuerpo específico que sólo reconocería la forma humana de los receptores de VEGF.

A la vista de los resultados obtenidos en nuestro experimento, podemos afirmar que el Bevacizumab puede usarse con seguridad en

los modelos murinos de experimentación animal para el estudio del fenómeno de regeneración hepática.

En el estudio experimental que hemos llevado a cabo, los dos brazos fundamentales de actuación que son el grado de toxicidad que presenta el Bevacizumab en un hígado no sometido a cirugía de resección, y el efecto del antiangiogénico sobre el hígado residual tras una hepatectomía 2/3, nos muestran como dato principal, un aumento en la proliferación hepatocitaria sin acompañarse del aumento del estrés oxidativo.

Nuestra hipótesis: el Bevacizumab es un “agente agresor” del hígado pero que a las dosis utilizadas y en los tiempos empleados no es capaz de producir una alteración global del fenómeno de regeneración hepatocitaria.

VIII.- CONCLUSIONES

El proceso regenerativo del hígado en el modelo experimental de hepatectomía 2/3 previa administración del antiangiogénico Bevacizumab a dosis de 100, 200 y 400 μ g sobre ratas Wistar, no se ve afectado respecto al grupo de animales a los que no se les administra la terapia antiangiogénica.

Para llevar a cabo dicha afirmación nos basamos en las siguientes conclusiones de nuestro experimento:

- 1.** Igual o similar Índice de Regeneración hepática entre los grupos a los que se les administra Bevacizumab y a los que no se les administra.
- 2.** Igual o incluso mayor número de hepatocitos en proliferación tras la hepatectomía del 70% previa administración de Bevacizumab.
- 3.** No incremento del Índice de estrés oxidativo (cociente GSH/GSSG elevado) ni sustancias derivadas de la peroxidación lipídica (TBARS). No diferencias en cuanto a la energía celular liberada (ATP) en los grupos con Bevacizumab respecto a los que no se les administra.
- 4.** No mayor daño hepatocelular posthepatectomía en los animales a los que se les aplica la terapia antiangiogénica.
- 5.** No aumento del grado de esteatosis, inflamación o lesión histopatológica hepáticas.
- 6.** El perfil cinético de la regeneración hepática representado por las citoquinas IL-6, TNF α , TGF β , no se ve alterado en los grupos de animales a los que se les administra el antiangiogénico.

APLICABILIDAD

CLINICA

IX.- APLICABILIDAD CLINICA

~ Muchos son los esfuerzos llevados a cabo en los últimos años para desarrollar un agente que bloquee los efectos del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), diana esencial en la tumorigénesis del cáncer.

~ El primer estudio en fase I acerca del uso del Bevacizumab comenzó en 1997⁸⁹. Son bastantes los trabajos clínicos desarrollados a posteriori para el estudio de su seguridad y eficacia.

~ La adición del Bevacizumab sólo o con otras terapias biológicas o agentes citotóxicos, ha mejorado las tasas de respuesta y ciertamente es posible que haya incrementado las tasas de resección, en pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal.

~ Sin embargo esto brinda una cuestión acerca de los efectos que éstas terapias moleculares dirigidas, con o sin quimioterapia citotóxica, presentan en la cicatrización de las heridas y en el fenómeno de regeneración hepática.

~ Con nuestro estudio experimental hemos querido aportar más información acerca del comportamiento del Bevacizumab sobre el fenómeno de regeneración hepática.

~ Por lo tanto ante un paciente al que es sometido a terapia antiangiogénica previa cirugía de resección mayor hepática, dentro de unos límites adecuados de tiempo, debemos de pensar que la regeneración

hepatocitaria se va a llevar a cabo dentro de la normalidad.

~ Quizás la administración extrínseca del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), sumado al producido por el hepatocito hipóxico, podría competir desplazar al Bevacizumab de los receptores VEGFR-1 y 2 y así reducir el intervalo de tiempo entre el último ciclo de terapia antiangiogénica y la cirugía hepática.

X.- BIBLIOGRAFIA

1. Ponfick VA. Ueber Leberresection und leberreaction. Verhandl Deutchs Gessellsch Chir. 1890;19:28.
2. Steer CJ. Liver regeneration. FASEB J. 1995; 9: 1396-400
3. Leevy CB. Abnormalities of liver regeneration: a review. Dig Dis. 1998; 16:88-98.
4. Kitamura T, Watanabe S, Sato N. Liver regeneration, liver cancer and cyclins. J Gastroenterol Hepatol. 1998; 13(Suppl):S96-9.
5. Friedman JM, Chung EY, Darnell JE Jr. Gene expression during liver regeneration. J Mol Biol. 1984; 179: 37-53.
6. Akerman P, Cote P, Yang SQ et al. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. AM J Physiol. 1992; 263:G579-85
7. Trautwein C, Rakemann T, Niehof M et al. Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. Gastroenterology. 1996; 110:1854-62.
8. Yamada Y, Webber EM, Kirillova I et al. Analisis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: Requierment for type 1 but not type 2 receptor. Hepatology. 1998; 28:959-70.
9. Tewari M, Dobrzanski P, Mohn KL et al. Rapid induction in regenerating liver of RL/IF-1 (an I κ B that inhibits NF- κ B, RelB-p50, and c-Rel-p50) and PHF, a novel κ B site-binding complex. Moll Cell Biol. 1992; 12:2898-908.
10. FitzGerald MJ, Webber EM, Donovan JR et al. Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. Cell Growth Differ. 1995; 6:417-27.
11. Cressman DE, Diamond RH, Taub R. Rapid activation of the STAT-3 transcription complex in liver regeneration. Hepatology. 1995; 21:1443-49.
12. Diehl AM, Yang SQ. Regenerative changes in C/EBP α C/EBP β expression modulate binding to the C/EBP site in the c-fos promoter. Hepatology. 1994; 19:447-56.
13. Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ et al. Deficient liver regeneration in mice lacking type 1 tumor necrosis factor receptor. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:1441-46.

14. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in Interleukin-6-deficient mice. *Science*. 1996; 274:1379-83.
15. Fausto N. Liver Regeneration: From Laboratory to Clinic. Review. *Liver transplantation*. 2001; 7(10): 835-44.
16. Streetz KL, Luedde T, Manns MP et al. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut*. 2000; 47: 309-12.
17. Hirano T, Nakajima K, Hibi M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997; 8:241-52.
18. Miki C, Iriyama K, Gunson BK et al. Influence of intraoperative blood loss on plasma levels of cytokines and endotoxin and subsequent graft liver function. *Arch Surg*. 1997; 132:136-41.
19. Kim YI, Hwang YJ, Song KE et al. Hepatocyte protection by a protease inhibitor against ischemia/reperfusion injury of human liver. *J Am Coll Surg*. 2002; 195:41-50.
20. Sakamoto T, Liu Z, Murase N et al. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology*. 1999; 29:403-11.
21. Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology*. 2000; 31:35-42.
22. Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI et al. Liver regeneration. *J Am Coll Surg*. 2003; 197:634-59. Review
23. Bradham CA, Plümpe J, Manns MP et al. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol*. 1998; 275:G387-92.
24. Schoen JM, Wang HH, Minuk GY et al. Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide*. 2001; 5 (5): 453-64
25. Rai RM, Lee FY, Rosen A et al. Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 13829-34.
26. Court FG, Wemyss-Holden SA, Denison AR et al. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg*. 2002; 89:1089-95
27. Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol* 2001; 19:32-40S.
28. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983; 219: 983-985.
29. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246:1306-1309.

30. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9:669-676.
31. Webber EM, Wu JC, Wang L et al. Overexpression of transforming growth factor-alpha causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice. *Am J Pathol.* 1994; 145:398-408.
32. Webber EM, Godowski PJ, Fausto N. In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology.* 1994; 19:489-97.
33. La Brecque DR, Wilson M, Fogerty S. Stimulation of HTC hepatoma cell growth in vitro by hepatic stimulator substance (HSS). Interactions with serum, insulin, glucagons, epidermal growth factor and platelet derived growth factor. *Exp Cell Res.* 1984; 160:419-29.
34. La Brecque DR. In vitro stimulation of cell growth by hepatic stimulator substance. *Am J Physiol.* 1982; 242:G289-95.
35. Gove CD, Hugues RD. Liver regeneration in relationship to acute liver failure. *Gut.* 1991; Suppl:S92-96
36. Zarnegar R, Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol.* 1995; 129:1177-80.
37. Tsubouchi H, Niitani Y, Hirono S et al. Levels of the human hepatocyte growth factor in serum of patients with various liver diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Hepatology.* 1991; 13:1-5
38. Bucher NL, Swaffield MN. Synergistic of glucagon and insulin in regulation of liver regeneration. *Adv Enzyme Regul.* 1975; 13:281-93.
39. Russell WE, Coffey RJ Jr, Ouellete AJ et al. Type beta transforming growth factor reversibly the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85:6126-30
40. Sanderson N, Factor V, Nagy P et al. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice result in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:2572-6.
41. Taub R. Liver regeneration 4: transcripcional control of liver regeneration. *FASEB J.* 1996; 10:413-27.

42. Diehl AM, Yang SQ, Wolfgang D et al. Differential expression of guanine nucleotide-binding proteins enhances cAMP synthesis in regeneration rat liver. *J Clin Invest*. 1992; 89:1706-12
43. Terada Y et al. Regulation of cyclin D1 expression and cell cycle progression by MAPK cascade. *Kidney Int*. 1999; 56:1258-61
44. Zimmermann. Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; (S4):6-10
45. Zakim D, Boyer TD, eds. *Hepatology. A textbook of liver disease*. Philadelphia: Saunders, 1990; 1.025-1.061.
46. LeCouter J, Moritz DR, Li B et al. Angiogenesis independent endothelial protection of liver. Role of VEGFR-1. *Science*. 2003; 299: 890-93
47. Diehl Am, Rai R. Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. *J Gastroenterol Hepatol*. 1996; 11: 466-70.
48. Ferrero A, Viganò L, Polastri R et al. Postoperative Liver Dysfunction and Future Remnant Liver: Where is the limit?. *World J Surg*. 2007; 31:1643-51.
49. Behrns KE, Tsiotos GG, DeSouza NF et al. Hepatic steatosis as a potencial risk factor for mayor hepatic resection. *J Gastrointest Surg*. 1998; 2:292-98.
50. Veteläinen R, van Vliet A, Gouma DJ al. Steatosis as a risk factor in liver surgery. A review. *Ann Surg*. 2007; 245:20-30.
51. Huguet C, Gavelli A, Chieco PA et al. Liver ischemia for hepatic resection: where is the limit?. *Surgery*. 1992; 111:251-59.
52. Belghiti J, Ogata S. Assessment of hepatic reserve for the indication of hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2005; 12: 1-3.
53. Vitale A, Saracino E, Boccagni P, Prolese A et al. Validation of the BCLC prognostic system in surgical hepatocellular cancer patients. *Transplan Proc*. 2009; 41(4):1260-1263.
54. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 74:1124-36.

55. Peralta C, Hotter G, Closa D et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology*. 1999; 29:126-32.
56. Sawada N. Hepatocytes from old rats retain responsiveness of c-myc expression to EGF in primary culture, but do not enter S phase. *Exp Cell Res*. 1989; 181: 584-88.
57. Schmucker D.L. Age related changes in liver structure and function. Implications for disease. A review. *Exp Gerontol*. 2005; 40:650-59.
58. Zhang HJ, Xu L, Drake VJ et al. Heat-induced liver injury in old rats is associated with exaggerated oxidative stress and altered transcription factor activation. *FASEB J*. 2003; 17: 2293-95.
59. Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA et al. Does oxidative damage to DNA increase with age?. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 10469-74
60. Tesis Doctoral: Sánchez-Hidalgo JM. Directores: Briceño Delgado FJ, López-Cillero P. Influencia de la edad en la regeneración hepática. Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina, Jul 2009.
61. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?. *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82:4-6.
62. Dvorak HF. Vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor : a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potencial target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 2002; 20:4368-4380.
63. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med*. 1999; 77:527-543.
64. Kumar R, Yoneda J, Bucana CCD, et al. Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. *Int J Oncol*. 1998; 12:749-757.
65. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999; 399:271-275.
66. Warren RS, Yuan H, Matli MR, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Bio Chem*. 1996; 271:29483-29488.
67. Galey S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 2000; 19:19-27.

68. Daniel J, Hicklin, Ellis LLM, et al. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in tumor growth and Angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2005; 23:1011-1027.
69. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastases in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol*. 1993; 143:401-9.
70. Uhr JW, Scheuermann Rh, Street NE, Vitetta ES. Cancer dormancy: opportunities for new therapeutics approaches. *Nat Med*. 1997; 3:505-9.
71. Tabernero J. The Role of VEGF and EGFR Inhibition: Implications for combining Anti-VEGF and EGFR Agents. *Mol Cancer Res*. 2007; 5:203-220.
72. Lee JY, Murphy SM, Scanlon EF. Effect of trauma on implantation of metastatic tumor in bone in mice. *J Surg Oncol*. 1994; 56:178-184.
73. Murphy MS, Goldschmidt RA, Rao LN, Ammirati M, Buchmann T, Scanlon EF. Influence of surgical trauma on experimental metastases. *Cancer*. 1989; 64:2035-44.
74. Skipper D, Jeffrey MJ, Cooper AJ, Alexander P, Taylor I. Enhanced growth of tumour cells in healing colonic anastomoses and laparotomy wounds. *Int J Colorectal Dis*. 1989, 4:172-7.
75. McNamara DA, Harmey JH, Walsh TN, Redmond HP and Bouchier-Hayes DJ. Significance of angiogenesis in cancer therapy. *Br J Surg*. 1998; 85:1044-1055.
76. Braun AH, Achterrath W, Wilke H, Vanhoefer U, Harstrick A and Preusser P. New Systemic Frontline Treatment for Metastatic Colorectal Carcinoma. *Cancer*. 2004; 100:1558-1570.
77. Kelly H, Golberg RM. Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence. *J Clin Oncol*. 2005; 23:4553-4560.
78. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350: 2335-2343.
79. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al. Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX 4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol*. 2007; 25:1539-1544.

80. Warren RS, Yuan H, Matfi MR, Gillet NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest*. 1995; 95:1789-1797.
81. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L et al. Phase II randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (Fu)/leucovorin (LV) with Fu/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21:60-65.
82. Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD et al. Combined analysis of efficacy: The addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23:3706-3712.
83. Grothey A, Sugrue MM, Purdie DM, Dong W, Sargent D, Hedrick E and Koloff M. Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in Metastatic Colorectal Cancer: Results from a Large Observacional Cohort Study (BRITE). *J Clin Oncol*. 2008; 26:5326-5334.
84. Miller KD, Wang M, Gralow J et al. A randomized phase III trial of paclitaxel versus paclitaxel plus bevacizumab as first-line therapy for locally recurrent or metastatic breast cancer: A trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group (E2100). Presented at the 2005 San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, TX, December 2005:3a.
85. Ellis LM, Curley SA, Grothey A et al. Surgical Resection after Downsizing of Colorectal Liver Metastasis en the Era of Bevacizumab. *J Clin Oncol*. 2005; 23:4853-4855.
86. Loupakis F, Bria E, Vaccaro V, Cuppone F, Milella et al. Magnitude of benefit of the addition of bevacizumab to first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer: meta-analysis of randomized clinical trials. *Clin Cancer Res*. 2010; 29:58.
87. Midgley R and Kerr D. Bevacizumab, current status and future directions. *Ann Oncol*. 2005; 16:999-1004.
88. Gordon MS, Margolin K, Talpaz M. Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol*. 2001; 19:843-850.
89. Margolin K, Gordon MS, Holmgren E et al. Phase Ib trial of intravenous recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor in combination with chemotherapy in

- patients with advanced cancer: Pharmacologic and long-term safety data. *J Clin Oncol.* 2001; 19:851-856.
90. Bruns CJ, Liu MD, Davis DW, Shaheen RM et al. Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases. *Cancer.* 2000; 89:488-499.
91. Van Buren G, Yang A, Dallas N et al. The effect of molecular therapeutics on liver regeneration in a murine model. *J Clin Oncol.* 2008; 26:1836-1842.
92. La Brecque DR, Feigenbaun A, Badur NR. Diurnal rythm. Effects on hepatic regeneration and hepatic regenerative stimulator substance. *Science.* 1978; 10(199):1082-84.
93. Moolten FL, Oakman NJ, Bucher NL. Accelerated response of hepatic DNA synthesis to partial hepatectomy in rats pretreated with growth hormone or surgical stress. *Cancer Res.* 1970; 30:2353-57.
94. Higgins DM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. *Arch Path Lab Med.* 1931; 12:186-202.
95. Lorente L, Aller MA, Rodríguez G, et al. Hepatectomías. En: Arias J (ed.). *Cirugía hepática experimental.* 1ª ed. Zaragoza, España: Kronos, 1993:329-53.
96. Hebel R, Stromberg MW. *Anatomy and embryology of the laboratory rat.* Editorial Biome VErlag Woerthsee. 1986
97. Weinbren, K. The portal blood supply and regeneration of the rat liver. *Br J Exp Pathol.* 1955; 36: 583-91.
98. Fisher B, Szuch P, Levine M et al. A portal blood factor as the tumoral agent in liver regeneration. *Science.* 1971; 171: 575-77.
99. Chamuleau RA, Bosman DK. Liver regeneration. *Hepatogastroenterology.* 1988; 35: 309-12.
100. Johnson HA. Liver regeneration and the "Critical mass" hypothesis. *Am J Pathol.* 1969; 57: 1-15.
101. Madrahimov N, Dirsch O, Broeslich C. Marginal Hepatectomy in the rat. From Anatomy to Surgery. *Ann Surg.* 2006; 244: 89-98.
102. Kwon Ah, Uetsuji S, Yamura M, Hioki K, Yamamoto M. Effect of administration of fibronectin or aprotinin on liver regeneration after experimental hepatectomy. *Ann Surg.* 1990; 211(3):295-300.

103. Lehner B, Sandner B, Marschallinger J, Lehn G et al. The dark side of BrdU in neural stem cell biology: Detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. *Cell and Tissue Research*. 2011; 345(3): 313-328 doi:10.1007/s00441-011-1213- Epub 2011 Aug 12.
104. Chang WK, Yang KD, Shaio MF. Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: involved in the endogenous redox reaction. *Clin Exp Immunol*. 1999; 117:482-488.
105. Jones DP. Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signalling. *J Intern Med*. 2010; 268 (5):432-448. doi: 10.1111/j.1365-2796.2010.02268.x
106. Nkabyo YS, Ziegler TR, Gu LH, Watson WH, Jones DP. Glutathione and thioredoxin redox during differentiation in human colon epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002; 283:G1352-1359.
107. Zong-Zhi H, Changjin C, Heping Y, Jenny O, et al. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *FASEB J*. 2001; 15(1):19-21.
108. Lepage G, Muñoz G, Champagne J, Roy CC. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1991; 197(2):277-283.
109. Richter C, Schweizer A, Cossarizza A, Franceschi C. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett*. 1996; 378(2):107-110.
110. González R, Ferrín G, Hidalgo AB, Ranchal I, López-Cillero P, et al. N-acetylcysteine, coenzyme Q10 and superoxide dismutase mimetic prevent mitochondrial cell dysfunction and cell death induced by d-galactosamine in primary culture of human hepatocytes. *Chem Biol Interact*. 2009; 181(1):95-106.
111. Diehl AM. Nutrition, hormones, metabolism and liver regeneration. *Semin Liver Dis* 1991; 11: 315-20.
112. Moolten FL, Oakman NJ, Bucher NL. Accelerated response of hepatic DNA synthesis to partial hepatectomy in rats pretreated with growth hormone or surgical stress. *Cancer Res*. 1970; 30:2353-57.
113. Francavilla A, Hagiya M, Porter KA et al. Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology*. 1994; 20:747-57.

114. Emond JC, Whittington PF, Broelsch CF. Overview of reduced size liver transplantation. *Clin Transplant*. 1991; 5:168-73.
115. Broelsch CE, Emond CJ, Whittington PF et al. Application of reduced size liver transplantation as split grafts, auxiliary orthotopic grafts, and living related segmental transplant. *Ann Surg*. 1990; 212:368-75.
116. Inonata Y, Kiuchi T, Kim I et al. Auxiliary partial orthotopic living donor liver transplantation as an aid for small for size grafts in larger recipients. *Transplantation*. 1999; 67:1514-19.
117. Schuppan D, Rhien M, Somasundevan R et al. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*. 2001; 21:351-72.
118. Rozga J. Animals models of liver regeneration. In: Souba WW, Wilmore DW, editors. *Surgical Research*. San Diego: Academic Press: 2001.p.703-07.
119. Sakamoto T, Ezure T, Lunz J et al. Concanavalin A simultaneously primes liver hematopoietic and epithelial progenitor cells for parallel expansion during liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology*. 2000; 32:256-67.
120. Ku Y, Tominaga M, Sugimoto T et al. Preoperative hepatic venous embolization for partial hepatectomy combined with segmental resection of major hepatic vein. *Br J Surg*. 2002; 89:63-69.
121. Gaglio PJ, Lin H, Dash S et al. Liver regeneration investigated in a non-human primate model (*Maceca mulatta*). *J Hepatol*. 2002; 37:625-32.
122. Martins PN, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int*. 2008; 28:3-11.
123. Martins PN, Neuhaus P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int*. 2007; 27:384-92.
124. Pharmacology and Pharmacodynamics of Bevacizumab as Monotherapy or in Combination with Cytotoxic Therapy in Preclinical Studies. *Cancer Res*. 2005; 65:671-680.
125. Redaelli CA, Semela D, Carrick FE, et al. Vascular endothelial growth factor on functional recovery after hepatectomy in lean and obese mice. *J Hepatol*. 2004; 40:305-312.
126. Stolz DB, Mars WM, Petersen BE, et al. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res*. 1999; 59:3954-3960.

127. Nodlinger B, Van Cutsem E, Gruenberger T, Glimelius B, et al. Combination of surgery and chemotherapy and the role of targeted agents in the treatment of patients with colorectal liver metastases: recommendations from an expert panel. *Ann Oncol.* 2009; 20:985-992.
128. Matsumata T, Yamamoto K, Shirabe K et al. Urinary excretion of prostaglandins and renal function after hepatic resection. *Hepatogastroenterology.* 1997; 44(15):774-78.
129. Pelton JJ, Hoffman JP, Eisenberg BL. Comparison of liver function tests after hepatic lobectomy and hepatic wedge resection. *Am Surg.* 1998; 64: 408-14.
130. Szubert A, Sarzyński J, Biejat Z et al. Risk factors for morbidity following liver surgery. *Med Sci Monit.* 2001; 7(Suppl 1):294-97.
131. Cascales M. Bases Celulares y Moleculares de la Regeneración Hepática. Instituto de España. 2008. Madrid.
132. Gruenberger B, Tamandl D, Schueller D et al. Perioperative Bevacizumab plus capecitabine and oxaliplatin does not increase surgical complications after resection of colorectal cancer liver metastases. *J Clin Oncol.* 2008; 26:1830-1835.
133. D'Angelica M, Kornprat P, Gonen M, et al. Lack of evidence after hepatectomy with perioperative use of bevacizumab: A matched case-control study. *Ann Surg Oncol.* 2007; 14:759-76. 5.
134. Reddy SK, Morse MA, Hurwitz HI et al. Addition of Bevacizumab to irinotecan and oxaliplatin based preoperative chemotherapy regimens does not increase morbidity after resection of colorectal liver metastases. *J Am Coll Surg.* 2008; 206:96-106.
135. Van Cutsem E, Rivera F, Berry S, Kretschmar A, Michael M et al. Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study. *Ann Oncol.* 2009.
136. Gilbert HF. Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods Enzymol.* 1995; 251:8-28.
137. Paluszkiwicz R, Zieniewicz K, Kalinowski P et al. Safety of living donor in pediatric liver transplantation--analysis of 100 consecutive donors *Hepatogastroenterology.* 2008; 55(88):2166-70.
138. Matsumata T, Yamamoto K, Shirabe K et al. Urinary excretion of Prostaglandins and renal function after hepatic resection. *Hepatogastroenterology.* 1997; 44(159): 774-78).

Indice de abreviaturas, tablas y figuras

***INDICE DE ABREVIATURAS**

A

- ADN/DNA: ácido desoxirribonucleico
- AEC: cromóforo 3-amino-9-etil-carbazol
- ALT: alanina aminotransferasa
- AP-1: Proteína de activación 1
- AST: aspartato aminotransferasa

B

- bFGF: Factor b de crecimiento de los fibroblastos
- Brb: Bilirrubina
- BrdU: Bromo desoxiuridina
- Bv: Bevacizumab

C

- CCl4: Tetracloruro de carbono
- CEBP β : CCAT/enhancer binding protein- β
- CIMPR: Receptor Cation-Independiente Manosa 6-Fosfato
- c-jun-NH2-kinasa Terminal:Isoforma 2 kinasa activada por estrés
- cNOS: Óxido nítrico sintetasa constitutiva
- Cr: Creatinina

E

- ECM:Matriz extracelular
- EGF: Factor de crecimiento epidérmico
- ERKs o p42/44 MAPKS: Isoforma kinasa de regulación extracelular
- EGF: epidermal growth factor / EGFR: epidermal growth factor receptor

F

-FA: Fosfatasa Alcalina

G

-G0: Fase quiescente del ciclo celular

-G1: Fase prereplicativa del ciclo celular

-G2: Fase postreplicativa

-GDP: Guanosín difosfato

-GSH: glutatión reducido

-GSSG: glutatión oxidado

-GTP: Guanosín trifosfato

H

-HDL: lipoproteínas de alta densidad

-HGF: Factor de crecimiento hepatocitario

-HPD: Hiperplasia directa compensadora

-HSC: Células estrelladas hepáticas

-HSS: Sustancia estimulante hepática

I

-IFN: Interferón

-IGFBP-1: insulin-like growth factor binding protein-1.

-I κ B: subunidad inhibitoria del complejo NF κ B

-IL-1: Interleukina 1

-IL-1 β : Interleukina 1 beta

-IL-6: Interleukina 6

-iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible

-I/R: isquemia reperfusión

J

-JNK: c jun N terminal kinasa

-JAK: Janus-kinasa

L

-LPS: Lipopolisacáridos

M

-M: Fase de mitosis del ciclo celular

-MAP: Proteína activada por mitógenos

-mRNA: ácido ribonucleico mensajero

N

-NFkB: factor nuclear kappa B

-NO: óxido nítrico

-NOSbc: Óxido nítrico sintetasa constitutiva de origen cerebral

-NOsec: Óxido nítrico sintetasa constitutiva de origen endotelial

O

-ODC: Ornitina decarboxilasa

P

-PC: Preacondicionamiento isquémico

-PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

-PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

-PGE2: prostaglandina E2

-PKA: Proteína kinasa

-p38 MAPK: . Isoforma 1 kinasa activada por estrés

-p42/44 MAPKs: Isoforma kinasa de regulación extracelular

-p46/p54 SAPK: Isoforma 2 kinasa activada por estrés

-prl: prolactina

R

-RLO: radicales libres de oxígeno

-RNA/ARN: ácido ribonucleico

S

- S: Fase de síntesis del ciclo celular
- SER: Sistema reticular endoplásmico
- Smad: Proteínas Smad
- STAT3: Factor de transcripción 3

T

- TAA: thioacetamida
- TGF- α : Factor transformador de crecimiento alfa
- TGF- β : Factor transformador de crecimiento beta
- TK: Tirosina-kinasa
- TNF: factor de necrosis tumoral.
- TNF-R: Receptor para factor de necrosis tumoral.
- T.U.N.E.L.: TdT – mediated dUTP – biotin Nick End Labeling

V

- VBP: Vía Biliar Principal
- VEGF: vascular endothelial growth factor / VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

- Tabla 1. Promotores e inhibidores de la regeneración hepática
- Tabla 2. Principales sustancias proangiogénicas y antiangiogénicas
- Tabla 3. Resumen descriptivo basal del estudio. Proliferación y estrés oxidativo grupo control
- Tabla 4. Resumen descriptivo basal del estudio. Perfil hepático grupo control
- Tabla 5. Resumen descriptivo basal del estudio. Interleuquinas grupo control
- Tabla 6. Resumen descriptivo basal. Grado de esteatosis grupo control
- Tabla 7. Resumen descriptivo basal. Grado de inflamación grupo control
- Tabla 8. Resumen descriptivo basal. Lesión histopatológica grupo control
- Tabla 9. Resumen descriptivo basal. Índice de regeneración hepática, proliferación y estrés oxidativo grupo estudio.
- Tabla 10. Resumen descriptivo basal. Perfil hepático grupo estudio
- Tabla 11. Resumen descriptivo basal. Interleuquinas grupo estudio
- Tabla 12. Resumen descriptivo basal. Grado de esteatosis grupo estudio
- Tabla 13. Resumen descriptivo basal. Grado inflamación grupo estudio
- Tabla 14. Resumen descriptivo basal. Lesión histopatológica grupo estudio
- Tabla 15. Comparación estadística proliferación hepatocitaria grupos control
- Tabla 16. Comparación estadística índice de estrés oxidativo grupos control
- Tabla 17. Comparación estadística peroxidación lipídica grupos control
- Tabla 18. Comparación estadística adenosín trifostato grupos control
- Tabla 19. Comparación estadística ALT grupos control
- Tabla 20. Comparación estadística AST grupos control
- Tabla 21. Comparación estadística FA grupos control

Tabla 22. Comparación estadística GGT grupos control

Tabla 23. Comparación estadística Bilirrubina total grupos control

Tabla 24. Comparación estadística Bilirrubina directa grupos control

Tabla 25. Comparación estadística Proteínas totales grupos control

Tabla 26. Comparación estadística Albúmina grupos control

Tabla 27. Comparación estadística Creatinina grupos control

Tabla 28. Comparación estadística Urea grupos control

Tabla 29. Comparación estadística IL-6 grupos control

Tabla 30. Comparación estadística TNF α grupos control

Tabla 31. Comparación estadística TGF β grupos control

Tabla 32. Comparación estadística EGF grupos control

Tabla 33. Comparación estadística VEGF grupos control

Tabla 34. Comparación estadística proliferación hepatocitaria grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 35. Comparación estadística índice de estrés oxidativo grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 36. Comparación estadística TBARS grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 37. Comparación estadística ATP grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 38. Comparación estadística ALT grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 39. Comparación estadística AST grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 40. Comparación estadística FA grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 41. Comparación estadística GGT grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 42. Comparación estadística Bilirrubina total grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 43. Comparación estadística Bilirrubina directa grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 44. Comparación estadística Proteínas totales grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 45. Comparación estadística Albúmina grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 46. Comparación estadística Creatinina grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 47. Comparación estadística Urea grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 48. Comparación estadística IL-6 grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 49. Comparación estadística TNF α grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 50. Comparación estadística TGF β grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 51. Comparación estadística EGF grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 52. . Comparación estadística VEGF grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 53. Comparación estadística del Índice de regeneración hepática grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 54. Comparación estadística de la proliferación hepatocitaria grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 55. Comparación estadística del Índice de estrés oxidativo grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 56. Comparación estadística de TBARS grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 57. Comparación estadística de ATP grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 58. Comparación estadística ALT grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 59. Comparación estadística de AST grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 60. Comparación estadística de GGT grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 61. Comparación estadística de FA grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 62. Comparación estadística de Bilirrubina total grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 63. Comparación estadística de Bilirrubina directa grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 64. Comparación estadística de Proteínas totales grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 65. Comparación estadística de Albúmina grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 66. Comparación estadística de Creatinina grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 67. Comparación estadística de Urea grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 68. Comparación estadística de IL-6 grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 69. Comparación estadística de TNF α grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 70. Comparación estadística de TGF β grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 71. Comparación estadística de EGF grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 72. Comparación estadística de VEGF grupos sometidos a hepatectomía

Tabla 73. Comparación estadística del Índice de regeneración hepática grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 74. Comparación estadística de la Proliferación hepatocitaria grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 75. Comparación estadística del Índice de estrés oxidativo grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 76. Comparación estadística de TBARS grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 77. Comparación estadística de ATP grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 78. Comparación estadística de ALT grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 79. Comparación estadística de AST grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 80. Comparación estadística de GGT grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 81. Comparación estadística de FA grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 82. Comparación estadística de Bilirrubina Total grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 83. Comparación estadística de Bilirrubina directa grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 84. Comparación estadística de Proteínas totales grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 85. Comparación estadística de Albúmina grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 86. Comparación estadística de Creatinina grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 87. Comparación estadística de Urea grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 88. Comparación estadística de IL-6 grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 89. Comparación estadística de TNF α grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 90. Comparación estadística de TGF β grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 91. Comparación estadística de EGF grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla 92. Comparación estadística de VEGF grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Tabla ANEXA 1. Anatomía comparada hepática rata Wistar y ser humano

Tabla ANEXA 2. Aplicación del Bevacizumab en el modelo murino

Figura 1.- Mito de Prometeo

Figura 2.- Iniciación y regulación multifactorial de la regeneración hepática

Figura 3.- Vía IL6 y STAT-3

Figura 4.- Reacción canalizada por la NOSintetasa

Figura 5.- Señalización por citoquinas y factores de crecimiento en la regeneración hepática

Figura 6.- Isoformas del VEGF y sus receptores

Figura 7.- Sistema de señalización intracelular acoplado a proteína G

Figura 8.- Sistema de señalización intracelular que activa receptores con actividad Tirosina- kinasa mediadores de la transcripción génica

Figura 9.- Sistema de señalización intracelular que activa receptores Janus-Kinasa, mediadores de la transcripción génica

Figura 10.- Modelo de sinusoide hepático

Figura 11.- Feed-back mediado por citoquinas en el inicio-terminación de la regeneración hepática

Figura 12.- Señalización apoptótica

Figura 13.- Resumen cronológico de la interacción molecular, celular y tisular que acontece en un hígado tras la hepatectomía

Figura 14.- Interacción celular durante el fenómeno de regeneración hepática

Figura 15.- Modelo de las funciones del VEGF en la célula endotelial y angiogénesis tumoral

Figura 16.- Inducción anestésica y preparación del campo quirúrgico

Figura 17. - Anatomía del hígado de la rata

Figura 18.- Primer tiempo. Liberación y movilización del hígado superior

Figura 19. - Segundo tiempo. Tiempo hilar

Figura 20.- Tercer tiempo. Tiempo venoso

Figura 21.- Resultado final de la hepatectomía del 70%

Figura 22. Grupos Operación Simulada

Figura 23. Grupos Hepatectomía Parcial

Figura 24. Grupos Control Basal con Bevacizumab

Figura 25. Grupos Operación Simulada con Bevacizumab

Figura 26. Grupos Hepatectomía Parcial con Bevacizumab

Figura 27. Grados de lesión histopatológica

Figura 28. Grados de esteatosis

Figura 29. Grados de inflamación

Figura 30. Bromodesoxiuridina

Figura 31. Forma liniangular y modelo tridimensional del glutatión

Figura 32. Muerte celular programada

Figura 33. Estructura tridimensional de la interleuquina TNF α

Figura 34. Estructura tridimensional de la interleuquina TNF β

Figura 35. Estructura tridimensional de la interleuquina 6

Figura 36. Diagrama comparando el número de células BrdU positivas entre grupos control

Figura 37. Diagrama comparando el índice de estrés oxidativo entre grupos control

Figura 38. Diagrama comparando TABRS entre grupos control

Figura 39. Diagrama comparando ATP entre grupos control

Figura 40. Diagrama comparando ALT entre grupos control

Figura 41. Diagrama comparando AST entre grupos control

Figura 42. Diagrama comparando FA entre grupos control

Figura 43. Diagrama comparando GGT entre grupos control

Figura 44. Diagrama comparando Bilirrubina total entre grupos control

Figura 45. Diagrama comparando Bilirrubina directa entre grupos control

Figura 46. Diagrama comparando Proteínas totales entre grupos control

Figura 47. Diagrama comparando Albúmina entre grupos control

Figura 48. Diagrama comparando Creatinina entre grupos control

Figura 49. Diagrama comparando Urea entre grupos control

Figura 50. Diagrama comparando IL-6 entre grupos control

Figura 51. Diagrama comparando TNF α entre grupos control

Figura 52. Diagrama comparando TGF β entre grupos control

Figura 53. Diagrama comparando EGF entre grupos control

Figura 54. Diagrama comparando VEGF entre grupos control

Figura 55. Diagrama comparando el número de células BrdU positivas entre grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 56. Diagrama comparando el índice de estrés oxidativo entre grupos control en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 57. Diagrama comparando TBARS entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 58. Diagrama comparando ATP entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 59. Diagrama comparando ALT entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 60. Diagrama comparando AST entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 61. Diagrama comparando FA entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 62. Diagrama comparando GGT entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 63. Diagrama comparando Bilirrubina total entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 64. Diagrama comparando Bilirrubina directa entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 65. Diagrama comparando Proteínas totales entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 66. Diagrama comparando Albúmina entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 67. Diagrama comparando Creatinina entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 68. Diagrama comparando Urea entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 69. Diagrama comparando IL-6 entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 70. Diagrama comparando TNF α entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 71. Diagrama comparando TGF β entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 72. Diagrama comparando EGF entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 73. Diagrama comparando VEGF entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 74. Diagrama de sectores que representa el grado de Esteatosis hepática de los grupos control

Figura 75. Diagrama de sectores que representa el grado de Lesión histopatológica de los grupos control

Figura 76. Diagrama de sectores que representa el Grado de inflamación hepatocitaria de los grupos control

Figura 77. Diagrama comparando el Índice de Regeneración hepática grupos sometidos a hepatectomía

Figura 78. Diagrama comparando la Proliferación hepatocitaria grupos sometidos a hepatectomía

Figura 79. Diagrama comparando el Índice de estrés oxidativo grupos sometidos a hepatectomía

Figura 80. Diagrama comparando TBARS grupos sometidos a hepatectomía

Figura 81. Diagrama comparando ATP grupos sometidos a hepatectomía

Figura 82. Diagrama comparando ALT grupos sometidos a hepatectomía

Figura 83. Diagrama comparando AST grupos sometidos a hepatectomía

Figura 84. Diagrama comparando GGT grupos sometidos a hepatectomía

Figura 85. Diagrama comparando FA grupos sometidos a hepatectomía

Figura 86. Diagrama comparando Bilirrubina total grupos sometidos a hepatectomía

Figura 87. Diagrama comparando Bilirrubina directa grupos sometidos a hepatectomía

Figura 88. Diagrama comparando Proteínas totales grupos sometidos a hepatectomía

Figura 89. Diagrama comparando Albúmina grupos sometidos a hepatectomía

Figura 90. Diagrama comparando Creatinina grupos sometidos a hepatectomía

Figura 91. Diagrama comparando Urea grupos sometidos a hepatectomía

Figura 92. Diagrama comparando IL-6 grupos sometidos a hepatectomía

Figura 93. Diagrama comparando TNF α grupos sometidos a hepatectomía

Figura 94. Diagrama comparando TGF β grupos sometidos a hepatectomía

Figura 95. Diagrama comparando EGF grupos sometidos a hepatectomía

Figura 96. Diagrama comparando VEGF grupos sometidos a hepatectomía

Figura 97. Diagrama comparando el Índice de regeneración hepática grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 98. Diagrama comparando la proliferación hepatocitaria grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 99. Diagrama comparando Índice de estrés oxidativo grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 100. Diagrama comparando TBARS grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 101. Diagrama comparando ATP grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 102. Diagrama comparando ALT grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 103. Diagrama comparando AST grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 104. Diagrama comparando GGT grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 105. Diagrama comparando FA grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 106. Diagrama comparando Bilirrubina total grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 107. Diagrama comparando Bilirrubina directa grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 108. Diagrama comparando Proteínas totales grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 109. Diagrama comparando Albúmina grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 110. Diagrama comparando Creatinina grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 111. Diagrama comparando Urea grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 112. Diagrama comparando IL-6 grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 113. Diagrama comparando TNF α grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 114. Diagrama comparando TGF β grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 115. Diagrama comparando EGF grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 116. Diagrama comparando VEGF grupos sometidos a hepatectomía en función de la dosis de Bevacizumab administrada

Figura 117. Diagrama de sectores que representa el grado Esteatosis hepática de los grupos a estudio

Figura 118. Diagrama de sectores que representa el grado de Lesión histopatológica de los grupos a estudio

Figura 119. Diagrama de sectores que representa el grado de Inflamación hepatocitaria de los grupos a estudio

Figura 120. Modelos animales para el estudio de la regeneración hepática

Figura 121. Fase final de la apoptosis celular. Monocito fagocitando célula apoptótica

Os6h	0,22								
Os24h	0,69								
Os6h 100	0,008	0,01							
Os6h 200	0,42	0,84		*					
Os6h 400	0,01	0,056		*	*				
Os24h 100	0,54		0,84						
Os24h 200	0,09		0,09				*		
Os24h 400	0,008		0,008				*	*	
CBv 400									
<i>P</i>	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 15. Comparación estadística proliferación hepatocitaria.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test “U de Mann-Whitney”

*Indica la “p” correspondiente a la comparación entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada. Véase apartado b.2

**Índice de estrés oxidativo
GSH/GSSG**

Os6h	0,42								
Os24h	1,00								
Os6h 100	0,008	0,008							
Os6h 200	0,03	0,008		*					
Os6h 400	0,01	0,008		*	*				
Os24h 100	0,01		0,008						
Os24h 200	0,008		0,008				*		
Os24h 400	0,008		0,008				*	*	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 16. Comparación estadística índice de estrés oxidativo.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	0,84								
Os24h	0,056								
Os6h 100	0,42	0,15							
Os6h 200	0,056	0,03		*					
Os6h 400	0,032	0,01		*	*				
Os24h 100	0,69		0,22						
Os24h 200	0,15		0,69				*		
Os24h 400	0,42		0,23				*	*	
CBv 400									
<i>P</i>	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 17. Comparación estadística sustancias de peroxidación lipídica.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	0,84								
Os24h	0,69								
Os6h 100	0,15	0,056							
Os6h 200	0,032	0,09		*					
Os6h 400	0,31	0,22		*	*				
Os24h 100	0,09		0,22						
Os24h 200	0,056		0,54				*		
Os24h 400	0,056		0,056				*	*	
CBv 400									
<i>P</i>	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 18. Comparación estadística ATP entre grupos.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico.)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	0,008								
Os24h	0,84								
Os6h 100	0,008	0,09							
Os6h 200	0,008	0,15		*					
Os6h 400	0,008	1,00		*	*				
Os24h 100	0,056		0,09						
Os24h 200	0,31		0,54				*		
Os24h 400	0,69		0,69				*	*	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 19. Comparación estadística de la transaminasa ALT.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

*Indica la "p" correspondiente a la comparación entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada. Véase apartado b.2

Os6h	1,00								
Os24h	0,84								
Os6h 100	0,54	0,84							
Os6h 200	0,69	0,84		*					
Os6h 400	1,00	0,69		*	*				
Os24h 100	0,24		0,05						
Os24h 200	0,54		0,008				*		
Os24h 400	0,69		0,22				*	*	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 20. Comparación estadística de la transaminasa AST.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	0,69								
Os24h	1,00								
Os6h 100	0,008	0,01							
Os6h 200	0,008	0,01		*					
Os6h 400	0,01	0,03		*	*				
Os24h 100	0,008		0,008						
Os24h 200	0,008		0,008				*		
Os24h 400	0,032		0,03				*	*	
CBv 400									
<i>P</i>	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 21. Comparación estadística fosfatasa alcalina.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)
P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	0,31								
Os24h	0,31								
Os6h 100	0,31	1,00							
Os6h 200	0,31	1,00		*					
Os6h 400	0,31	1,00		*	*				
Os24h 100	0,31		1,00						
Os24h 200	0,31		1,00				*		
Os24h 400	0,31		1,00				*	*	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 22. Comparación estadística GGT.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	0,31								
Os24h	0,69								
Os6h 100	0,69	0,69							
Os6h 200	0,31	1,00		*					
Os6h 400	0,31	1,00		*	*				
Os24h 100	0,31		0,69						
Os24h 200	0,31		0,69				*		
Os24h 400	0,69		1,00				*	*	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 23. Comparación estadística Bilirrubina total.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

*Bilirrubina directa
mgr/dl*

<i>Os6h</i>	0,31								
<i>Os24h</i>	0,69								
<i>Os6h 100</i>	0,69	0,69							
<i>Os6h 200</i>	0,31	1,00		*					
<i>Os6h 400</i>	0,31	1,00		*	*				
<i>Os24h 100</i>	0,31		0,69						
<i>Os24h 200</i>	0,31		0,69				*		
<i>Os24h 400</i>	0,69		1,00				*	*	
<i>CBv 400</i>									
<i>P</i>	<i>Bv400</i>	<i>Os6h</i>	<i>Os24h</i>	<i>Os6h 100</i>	<i>Os6h 200</i>	<i>Os6h 400</i>	<i>Os24h 100</i>	<i>Os24h 200</i>	<i>Os24h 400</i>

Tabla 24. Comparación estadística bilirrubina directa.

(*Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico*)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

**Proteínas totales
gr/dl**

Os6h	0,01									
Os24h	0,15									
Os6h 100	0,056	0,15								
Os6h 200	0,15	0,03		*						
Os6h 400	0,03	0,84		*	*					
Os24h 100	0,42		1,00							
Os24h 200	0,15		0,84				*			
Os24h 400	0,42		0,54				*	*		
CBv 400										
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400	

Tabla 25. Comparación estadística proteínas totales.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)
P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Albúmina
gr/dl

Os6h	0,421								
Os24h	0,056								
Os6h 100	0,09	0,15							
Os6h 200	0,09	0,42		*					
Os6h 400	0,15	0,54		*	*				
Os24h 100	0,056		0,84						
Os24h 200	0,01		0,15				*		
Os24h 400	0,008		0,09				*	*	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 26. Comparación estadística albúmina.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	0,31								
Os24h	0,42								
Os6h 100	0,22	0,84							
Os6h 200	0,15	0,69		*					
Os6h 400	0,22	0,69		*	*				
Os24h 100	0,84		0,42						
Os24h 200	0,54		0,69				*		
Os24h 400	0,54		0,84				*	*	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 27. Comparación estadística creatinina

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	0,03								
Os24h	0,056								
Os6h 100	0,22	0,09							
Os6h 200	0,84	0,09		*					
Os6h 400	0,03	0,42		*	*				
Os24h 100	0,15		0,01						
Os24h 200	1,00		0,22				*		
Os24h 400	0,056		1,00				*	*	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 28. Comparación estadística urea.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	0,84								
Os24h	0,01								
Os6h 100	0,31	0,54							
Os6h 200	0,28	0,41		*					
Os6h 400	0,09	0,15		*	*				
Os24h 100	0,69		0,056						
Os24h 200	0,01		1,00				*		
Os24h 400	0,22		0,54				*	*	
CBv 400									
<i>P</i>	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 29. Comparación estadística IL-6.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

*Indica la "p" correspondiente a la comparación entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada. Véase apartado b.2

TNF α
pg/ml

Os6h	0,69								
Os24h	0,31								
Os6h 100	0,54	0,15							
Os6h 200	0,42	0,42		*					
Os6h 400	0,84	0,69		*	*				
Os24h 100	0,69		0,69						
Os24h 200	0,31		1,00				*		
Os24h 400	0,55		0,55				*	*	
CBv 400									
<i>P</i>	<i>Bv400</i>	<i>Os6h</i>	<i>Os24h</i>	<i>Os6h 100</i>	<i>Os6h 200</i>	<i>Os6h 400</i>	<i>Os24h 100</i>	<i>Os24h 200</i>	<i>Os24h 400</i>

Tabla 30. Comparación estadística TNF α .

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	0,54								
Os24h	0,84								
Os6h 100	0,01	0,41							
Os6h 200	0,09	0,69		*					
Os6h 400	0,31	1,00		*	*				
Os24h 100	0,15		0,09						
Os24h 200	0,01		0,01				*		
Os24h 400	0,056		0,09				*	*	
CBv 400									
<i>P</i>	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 31. Comparación estadística TGFβ.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)
P: nivel de significación estadística, Test “U de Mann-Whitney”

EGF
pg/ml

Os6h	0,31								
Os24h	0,056								
Os6h 100	0,19	0,55							
Os6h 200	0,69	0,31		*					
Os6h 400	0,09	0,31		*	*				
Os24h 100	0,90		0,19						
Os24h 200	0,90		0,11				*		
Os24h 400	0,69		0,31				*	*	
CBv 400									
<i>P</i>	<i>Bv400</i>	<i>Os6h</i>	<i>Os24h</i>	<i>Os6h 100</i>	<i>Os6h 200</i>	<i>Os6h 400</i>	<i>Os24h 100</i>	<i>Os24h 200</i>	<i>Os24h 400</i>

Tabla 32. Comparación estadística EGF.
(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)
P: nivel de significación estadística, Test “U de Mann-Whitney”

VEGF
pg/ml

Os6h	0,19								
Os24h	0,06								
Os6h 100	0,41	0,11							
Os6h 200	0,22	0,06		*					
Os6h 400	0,09	0,06		*	*				
Os24h 100	0,01		0,28						
Os24h 200	0,31		0,55				*		
Os24h 400	0,008		0,28				*	*	
CBv 400									
<i>P</i>	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 33. Comparación estadística VEGF.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)
P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,03					
Os6h 400	*	*		0,90	0,032				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*					0,69	
Os24h 400	*		*					0,01	0,008
CBv 400									
<i>P</i>	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 34. Comparación estadística proliferación hepatocitaria.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

*Indica la "p" correspondiente a la comparación entre grupos control sin Bevacizumab y a los que se les administra el antiangiogénico. Véase apartado b.1

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,84					
Os6h 400	*	*		0,15	0,42				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*				0,008		
Os24h 400	*		*				0,69	0,008	
CBv 400									
<i>P</i>	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 35. . Comparación estadística índice de estrés oxidativo.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Peroxidación lipídica
nm/gr

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,03					
Os6h 400	*	*		0,056	0,54				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*				0,42		
Os24h 400	*		*				0,15	0,54	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 36. Comparación estadística sustancias de peroxidación lipídica.
(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)
P: nivel de significación estadística, Test “U de Mann-Whitney”

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,54					
Os6h 400	*	*		0,69	0,84				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*					0,008	
Os24h 400	*		*					1,00	0,01
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 37. Comparación estadística ATP.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

**Transaminasa ALT
U/L**

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,008					
Os6h 400	*	*		0,09	0,42				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*				0,54		
Os24h 400	*		*				0,31	0,42	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 38. Comparación estadística de la transaminasa ALT.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

*Indica la "p" correspondiente a la comparación entre grupos control sin Bevacizumab y a los que se les administra el antiangiogénico. Véase apartado b.1

**Transaminasa AST
U/L**

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,09					
Os6h 400	*	*		0,09	0,54				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*				0,69		
Os24h 400	*		*				1,00	0,84	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 39. Comparación estadística de la transaminasa AST.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,54					
Os6h 400	*	*		1,00	0,84				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*				0,15		
Os24h 400	*		*				0,42	0,69	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 40. Comparación estadística fosfatasa alcalina.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)
P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		1,00					
Os6h 400	*	*		1,00	1,00				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*				1,00		
Os24h 400	*		*				1,00	1,00	
CBv 400									
<i>P</i>	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 41. Comparación estadística GGT.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Bilirrubina Total
mgr/dl

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,69					
Os6h 400	*	*		0,69	1,00				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*				1,00		
Os24h 400	*		*				0,69	0,69	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 42. Comparación estadística bilirrubina total.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

**Bilirrubina Directa
mgr/dl**

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,69					
Os6h 400	*	*		0,69	1,00				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*					1,00	
Os24h 400	*		*					0,69	0,69
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 43. Comparación estadística bilirrubina directa.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)
P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

**Proteínas totales
gr/dl**

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,15					
Os6h 400	*	*		0,48	0,09				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*				0,84		
Os24h 400	*		*				0,84	0,69	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 44. Comparación proteínas totales.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)
P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*			0,69				
Os6h 400	*	*			0,31	0,69			
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*					0,056	
Os24h 400	*		*					0,01	0,69
CBv 400									
<i>P</i>	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 45. Comparación estadística albúmina.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		1,00					
Os6h 400	*	*		0,84	0,84				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*				0,54		
Os24h 400	*		*				0,69	0,84	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 46. Comparación estadística creatinina.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*			0,31				
Os6h 400	*	*			0,54	0,15			
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*					0,42	
Os24h 400	*		*					0,008	0,31
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 47. Comparación estadística urea.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)
P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,90					
Os6h 400	*	*		0,54	0,55				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*				0,056		
Os24h 400	*		*				0,15	0,54	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 48. Comparación estadística de IL-6.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

*Indica la "p" correspondiente a la comparación entre grupos control sin Bevacizumab y a los que se les administra el antiangiogénico. Véase apartado b.1

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,42					
Os6h 400	*	*		0,42	1,00				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*				0,69		
Os24h 400	*		*				0,73	0,73	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 49. Comparación estadística TNF α .

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,55					
Os6h 400	*	*		0,55	0,84				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*				0,19		
Os24h 400	*		*				0,69	0,19	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 50. Comparación estadística TGFβ.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,95					
Os6h 400	*	*		0,41	0,15				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*				0,88		
Os24h 400	*		*				0,73	0,73	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 51. Comparación estadística EGF.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Os6h	*								
Os24h	*								
Os6h 100	*	*							
Os6h 200	*	*		0,90					
Os6h 400	*	*		0,19	0,54				
Os24h 100	*		*						
Os24h 200	*		*				0,03		
Os24h 400	*		*				1,00	0,01	
CBv 400									
P	Bv400	Os6h	Os24h	Os6h 100	Os6h 200	Os6h 400	Os24h 100	Os24h 200	Os24h 400

Tabla 52. Comparación estadística VEGF.

(Os 6h y 24h: operación simulada con sacrificio a las 6 y 24h; Os 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab; CBv 400: grupo control sin cirugía con sacrificio a los 7 días tras la administración del antiangiogénico)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,008							
Ht 6h 200	0,54		*					
Ht 6h 400	0,31		*	*				
Ht 24h 100		0,55						
Ht 24h 200		0,06				*		
Ht 24h 400		0,73				*	*	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 53. Comparación estadística del índice de regeneración hepática.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test “U de Mann-Whitney”

*Indica la “p” correspondiente a la comparación entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada. Véase apartado c.2

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,22							
Ht 6h 200	0,73		*					
Ht 6h 400	0,69		*	*				
Ht 24h 100		0,01						
Ht 24h 200		0,01				*		
Ht 24h 400		0,02				*	*	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 54. Comparación estadística proliferación hepatocitaria.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,31							
Ht 6h 200	0,09		*					
Ht 6h 400	0,31		*	*				
Ht 24h 100		0,19						
Ht 24h 200		0,41				*		
Ht 24h 400		0,28				*	*	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 55. Comparación estadística del índice de estrés oxidativo.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

**Peroxidación lipídica
nm/gr**

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,056							
Ht 6h 200	0,15		*					
Ht 6h 400	0,15		*	*				
Ht 24h 100		0,84						
Ht 24h 200		0,15				*		
Ht 24h 400		0,84				*	*	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 56. Comparación estadística sustancias de peroxidación lipídica.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,22							
Ht 6h 200	0,94		*					
Ht 6h 400	0,31		*	*				
Ht 24h 100		0,19						
Ht 24h 200		0,41				*		
Ht 24h 400		0,28				*	*	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 57. Comparación estadística de la energía celular liberada entre grupos.
(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)
P: nivel de significación estadística, Test “U de Mann-Whitney”

**Transaminasa ALT
U/L**

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,15							
Ht 6h 200	0,95		*					
Ht 6h 400	0,73		*	*				
Ht 24h 100		0,28						
Ht 24h 200		1,00				*		
Ht 24h 400		0,73				*	*	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 58. Comparación estadística de la transaminasa ALT.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

*Indica la "p" correspondiente a la comparación entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada. Véase apartado c.2

Ht 6h									
Ht 24h									
Ht 6h 100	0,42								
Ht 6h 200	0,73		0,43						
Ht 6h 400	0,90		0,90	0,34					
Ht 24h 100		0,55							
Ht 24h 200		1,00					0,69		
Ht 24h 400		0,28					0,15	0,15	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400	

Tabla 59. Comparación estadística de la transaminasa AST.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

GGT

U/L

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	1,00							
Ht 6h 200	1,00		*					
Ht 6h 400	1,00		*	*				
Ht 24h 100		1,00						
Ht 24h 200		0,73				*		
Ht 24h 400		1,00				*	*	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 60. Comparación estadística GGT.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,008							
Ht 6h 200	0,95		*					
Ht 6h 400	0,01		*	*				
Ht 24h 100		0,03						
Ht 24h 200		0,41				*		
Ht 24h 400		0,11				*	*	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 61. Comparación estadística fosfatasa alcalina.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

**Bilirrubina total
mgr/dl**

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,69							
Ht 6h 200	0,55		*					
Ht 6h 400	1,00		*	*				
Ht 24h 100		0,73						
Ht 24h 200		1,00				*		
Ht 24h 400		0,43				*	*	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 62. Comparación estadística bilirrubina total.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

**Bilirrubina directa
mgr/dl**

Ht 6h									
Ht 24h									
Ht 6h 100	0,69								
Ht 6h 200	0,55		*						
Ht 6h 400	1,00		*	*					
Ht 24h 100		1,00							
Ht 24h 200		0,90					*		
Ht 24h 400		0,73					*	*	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400	

Tabla 63. Comparación estadística bilirrubina directa.
 (Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)
 P: nivel de significación estadística, Test “U de Mann-Whitney”

*Proteínas totales
gr/dl*

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,84							
Ht 6h 200	0,73		*					
Ht 6h 400	0,90		*	*				
Ht 24h 100		0,19						
Ht 24h 200		0,28				*		
Ht 24h 400		0,28				*	*	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 64. Comparación estadística proteínas totales.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,54							
Ht 6h 200	0,55		*					
Ht 6h 400	0,19		*	*				
Ht 24h 100		0,41						
Ht 24h 200		0,73				*		
Ht 24h 400		1,00				*	*	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 65. Comparación estadística albúmina.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,69							
Ht 6h 200	0,41		*					
Ht 6h 400	0,90		*	*				
Ht 24h 100		0,90						
Ht 24h 200		0,41				*		
Ht 24h 400		0,41				*	*	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 66. Comparación estadística creatinina.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,54							
Ht 6h 200	0,90		*					
Ht 6h 400	0,55		*	*				
Ht 24h 100		0,90						
Ht 24h 200		0,19				*		
Ht 24h 400		0,55				*	*	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 67. Comparación estadística urea.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,54							
Ht 6h 200	1,00		*					
Ht 6h 400	0,41		*	*				
Ht 24h 100		0,92						
Ht 24h 200		0,92				*		
Ht 24h 400		0,28				*	*	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 68. Comparación estadística de la citoquina IL-6.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

*Indica la "p" correspondiente a la comparación entre grupos en función de la dosis de Bevacizumab administrada. Véase apartado c.2

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,69							
Ht 6h 200	0,54		*					
Ht 6h 400	0,69		*	*				
Ht 24h 100		0,42						
Ht 24h 200		0,69				*		
Ht 24h 400		0,54				*	*	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 69. Comparación estadística citoquina TNF α .

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

TGFβ
pg/ml

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,69							
Ht 6h 200	0,55		*					
Ht 6h 400	0,55		*	*				
Ht 24h 100		0,41						
Ht 24h 200		0,19				*		
Ht 24h 400		0,41				*	*	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 70. Comparación estadística de la citoquina TGFβ.
 (Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)
P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,22							
Ht 6h 200	0,09		*					
Ht 6h 400	0,15		*	*				
Ht 24h 100		0,90						
Ht 24h 200		0,90				*		
Ht 24h 400		1,00				*	*	
P	<i>Ht 6h</i>	<i>Ht 24h</i>	<i>Ht 6h 100</i>	<i>Ht 6h 200</i>	<i>Ht 6h 400</i>	<i>Ht 24h 100</i>	<i>Ht 24h 200</i>	<i>Ht 24h 400</i>

Tabla 71. Comparación estadística de la citoquina EGF.
(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)
P: nivel de significación estadística, Test “U de Mann-Whitney”

VEGF
pg/ml

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	0,28							
Ht 6h 200	0,55		*					
Ht 6h 400	1,00		*	*				
Ht 24h 100		0,28						
Ht 24h 200		1,00				*		
Ht 24h 400		1,00				*	*	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 72. Comparación estadística de la citoquina VEGF.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		0,15					
Ht 6h 400	*		0,056	0,69				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,41		
Ht 24h 400		*				1,00	0,15	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 73. Comparación estadística del índice de regeneración hepática.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"
 *Indica la "p" correspondiente a la comparación entre grupos sometidos a hepatectomía sin Bevacizumab y a los que se les administra el antiangiogénico. Véase apartado c.1

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		0,28					
Ht 6h 400	*		0,54	1,00				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,22		
Ht 24h 400		*				0,19	0,11	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 74. Comparación estadística de la proliferación hepatocitaria.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		0,31					
Ht 6h 400	*		1,00	0,15				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,15		
Ht 24h 400		*				0,22	0,15	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 75. Comparación estadística índice de estrés oxidativo.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		0,056					
Ht 6h 400	*		0,008	0,032				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,03		
Ht 24h 400		*				0,54	0,95	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 76. Comparación estadística de sustancias derivadas de la peroxidación lipídica.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h									
Ht 24h									
Ht 6h 100	*								
Ht 6h 200	*		0,15						
Ht 6h 400	*		0,42	0,84					
Ht 24h 100		*							
Ht 24h 200		*					0,22		
Ht 24h 400		*					0,95	0,22	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400	

Tabla 77. Comparación estadística ATP.
 (Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)
 P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

**Transaminasa ALT
U/L**

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		0,06					
Ht 6h 400	*		0,73	0,20				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,15		
Ht 24h 400		*				0,15	0,42	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 78. Comparación estadística de la transaminasa ALT.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

*Indica la "p" correspondiente a la comparación entre grupos sometidos a hepatectomía sin Bevacizumab y a los que se les administra el antiangiogénico. Véase apartado c.1

**Transaminasa AST
U/L**

Ht 6h									
Ht 24h									
Ht 6h 100	*								
Ht 6h 200	*		0,43						
Ht 6h 400	*		0,90	0,34					
Ht 24h 100		*							
Ht 24h 200		*					0,69		
Ht 24h 400		*					0,15	0,15	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400	

Tabla 79. Comparación estadística de la transaminasa AST.
 (Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)
 P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		1,00					
Ht 6h 400	*		1,00	1,00				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*					0,69	
Ht 24h 400		*					1,00	0,69
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 80. Comparación estadística GGT.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Fosfatasa alcalina
U/L

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		0,01					
Ht 6h 400	*		0,01	0,02				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,056		
Ht 24h 400		*				0,42	0,15	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 81. Comparación estadística fosfatasa alcalina.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

*Bilirrubina total
mgr/dl*

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		0,90					
Ht 6h 400	*		0,73	0,68				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,69		
Ht 24h 400		*				0,69	0,42	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 82. Comparación estadística bilirrubina total.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

*Bilirrubina directa
mgr/dl*

Ht 6h									
Ht 24h									
Ht 6h 100	*								
Ht 6h 200	*		0,90						
Ht 6h 400	*		0,73	0,68					
Ht 24h 100		*							
Ht 24h 200		*					1,00		
Ht 24h 400		*					0,69	0,69	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400	

Tabla 83. Comparación estadística bilirrubina directa.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

*Proteínas totales
gr/dl*

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		0,73					
Ht 6h 400	*		0,90	0,48				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,42		
Ht 24h 400		*				1,00	0,54	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 84. Comparación estadística proteínas totales.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		0,90					
Ht 6h 400	*		0,28	0,34				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,31		
Ht 24h 400		*				0,09	0,42	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 85. Comparación estadística albúmina.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		0,55					
Ht 6h 400	*		0,41	0,057				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,056		
Ht 24h 400		*				0,22	0,15	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 86. Comparación estadística creatinina.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		0,90					
Ht 6h 400	*		1,00	0,68				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,15		
Ht 24h 400		*				0,42	0,42	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 87. Comparación estadística urea.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		0,19					
Ht 6h 400	*		0,19	0,34				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,84		
Ht 24h 400		*				0,15	0,31	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 88. Comparación estadística de la citoquina IL-6.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

*Indica la "p" correspondiente a la comparación entre grupos sometidos a hepatectomía sin Bevacizumab y a los que se les administra el antiangiogénico. Véase apartado c.1

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		0,84					
Ht 6h 400	*		0,84	0,84				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,69		
Ht 24h 400		*				0,54	1,00	
<i>P</i>	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 89. Comparación estadística de la citoquina TNF α .

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200,400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		1,00					
Ht 6h 400	*		0,41	0,48				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,31		
Ht 24h 400		*				0,95	0,056	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 90. Comparación estadística de la citoquina TGFβ.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

Ht 6h								
Ht 24h								
Ht 6h 100	*							
Ht 6h 200	*		1,00					
Ht 6h 400	*		1,00	0,69				
Ht 24h 100		*						
Ht 24h 200		*				0,69		
Ht 24h 400		*				0,84	1,00	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400

Tabla 91. Comparación estadística de la citoquina EGF.
(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)
P: nivel de significación estadística, Test “U de Mann-Whitney”

Ht 6h									
Ht 24h									
Ht 6h 100	*								
Ht 6h 200	*		0,48						
Ht 6h 400	*		0,34	0,68					
Ht 24h 100		*							
Ht 24h 200		*					0,22		
Ht 24h 400		*					0,54	1,00	
P	Ht 6h	Ht 24h	Ht 6h 100	Ht 6h 200	Ht 6h 400	Ht 24h 100	Ht 24h 200	Ht 24h 400	

Tabla 92. Comparación estadística VEGF.

(Ht 6h y 24h: hepatectomía del 70% con sacrificio posterior a las 6 y 24h; Ht 6h y 24h 100,200, 400: 7 días antes de la cirugía se administran respectivas dosis de Bevacizumab)

P: nivel de significación estadística, Test "U de Mann-Whitney"

