



# El papel del AMPc, del estrés del retículo endoplasmático y de las adipocitoquinas en el trasplante hepático

Mónica B. Jiménez Castro

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



# **El Papel del AMPc, del estrés del retículo endoplasmático y de las adipocitoquinas en el trasplante hepático**

Tesis Doctoral presentada por

**Mónica B. Jiménez Castro**

para optar al título de  
DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Director de Tesis:  
Dra. Carmen Peralta Uroz

Tutor:  
Dra. Laura Baldomà Llavines

Barcelona, Enero 2014





FACULTAT DE FARMÀCIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

**El Papel del AMPc, del estrés del retículo endoplasmático y de las adipocitoquinas en el trasplante hepático**

Memoria presentada por Mónica B. Jiménez Castro para optar al título de doctor por la Universidad de Barcelona

La presente tesis doctoral ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Carmen Peralta Uroz

Dra. Carmen Peralta Uroz  
Directora

Dra. Laura Baldomà Llavines  
Tutora

Mónica B. Jiménez Castro  
Doctoranda

Barcelona, 2014



*“Nuestro mayor orgullo no ha de ser el no haber fracasado nunca, sino en cambio el habernos puesto de pie cada vez que hayamos caído”.*

***Kung Fu-Tse***



**A mi Madre, Alberto  
y Anna**



## *Agradecimientos*

Quisiera utilizar estas páginas para agradecer a todas las personas que han contribuido de alguna manera con la realización de esta tesis, así que espero no olvidarme de nadie.

Primero que todo, me gustaría agradecer muy sinceramente a mi directora de Tesis, la Dra. Carmen Peralta, por haber confiado en mí y darme la oportunidad de haber podido realizar esta tesis bajo su supervisión, por todo su esfuerzo, paciencia y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia y su motivación para enseñarme a no ceder y a no conformarme han sido fundamentales para mi formación como investigadora pero sobre todo como persona. Ella ha inculcado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener una formación completa. A su manera, ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, así como sentirme en deuda con ella por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado esta Tesis Doctoral.

Agradezco a la Dra. Laura Baldomà, por haber aceptado ser mi tutora en la realización de esta tesis, por su orientación, amabilidad y gentil ayuda. Y a la Dra. Josefa Badia por su gentil atención, disposición y amabilidad igualmente con los trámites necesarios para la finalización de esta tesis.

Quiero agradecer a la Dra. Araní Casillas, mi maestra desde que entre en el grupo de investigación. Las palabras se me quedan cortas para expresarte todo el agradecimiento que te tengo. Debo agradecerte por enseñarme la técnica más importante de esta tesis, sin tu empeño nunca hubiese sido capaz de realizar un trasplante. Siempre has tenido la paciencia, motivación y alegría para enseñarme no solo a nivel profesional, sino a nivel personal. Tu visión y optimismo me han ayudado en momentos de debilidad. Te considero como una de mis mejores amigas y estaré orgullosísima de que también me consideres digna de tu amistad. No todo el mundo puede decir lo mismo de sus compañeros de trabajo. Por esto soy una mujer afortunada.

A la Dra. Marta Massip por su siempre gentil disposición, su cálida amabilidad y su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, que ayudan a formarte como persona e investigador.

A mis compañeras del grupo de investigación, Maria, Mariana y Laia, porque todo lo conseguido, ha sido en realidad el resultado de una labor en equipo que sin su participación no hubiese sido posible. Quiero darles las gracias a todas por su disposición constante de ayudar y les deseo muchos éxitos en sus carreras como Investigadoras.

Gracias también al Dr. Ramón Gomis, al Dr. Juan Rodés y al Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) por haberme aceptado como becaria pre doctoral y brindarme todo su apoyo, proporcionándome los recursos necesarios para poder desarrollar y finalizar la presente Tesis Doctoral. Agradezco también a todo el personal científico, técnico y becarios, y especialmente a su personal administrativo por su trato siempre amable y eficiente. Es un orgullo formar parte de tan excelente institución.

Mi agradecimiento también al personal del Estabulario de la Facultad de Medicina (Campus Casanova) de la Universidad de Barcelona. Muchas gracias a Pep, Ignacio, Loli, Sole e Iván por todo, su valiosa ayuda y buen trato hicieron que el Estabulario fuera un lugar muy agradable para trabajar durante el tiempo de realización de esta Tesis.

Quiero manifestar también mi profundo agradecimiento a la Sociedad Española de Trasplante Hepático (SETH) y a la a la Fundació Catalana de Trasplantament (FSCT) Barcelona, por el invaluable apoyo que me otorgaron a través de la concesión de las becas para estudios de Doctorado, sin las cuales no hubiera sido posible la realización de esta Tesis.

Quisiera ahora agradecer a mis amigos en Colombia que aunque en la distancia siempre han estado ahí, apoyándome y alentándome de una u otra manera para culminar esta Tesis, son los verdaderos amigos, la manera que tiene dios de disculparse por los familiares... así que a ustedes, mis amigos... salud!!!!

A mi familia que es el soporte de mi vida, a mi Madre, quien siempre me ha enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Me has dado todo lo que soy como persona y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio, tu confianza en mí y tu apoyo me han impulsado a estar hoy aquí. Cuanta admiración siento por ti, ojala yo sea la mitad de buena madre para Anna de lo que has sido tú para mí.

A mi esposo Alberto, quisiera agradecerle por su amor, paciencia, y comprensión. Por ser tal y como es. Por su apoyo incondicional y su fuerza para motivarme día a día. Es la persona que más directamente ha sufrido las consecuencias del trabajo realizado. Realmente contigo consigo el equilibrio que me permite dar el máximo de mí. Nunca te podré estar suficientemente agradecida.

Y por último, pero quizás la más importante, para mi muñeca, Anna. Por las horas en cirugía y delante del ordenador haciéndome compañía y alentándome con sus pataditas. Su nacimiento ha coincidido con el final de la Tesis. Ella es lo mejor que nunca me ha pasado, y ha venido a este mundo para darme el último empujón para terminar el trabajo. Es sin duda mi referencia para el presente y para el futuro.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento porque esta Tesis también es de ustedes.

# Contenido

---

<b>Introducción</b> .....	<b>21</b>
1. El hígado.....	21
1.1 Generalidades.....	21
1.2 Organización del hígado .....	22
1.2 Sistema vascular hepático .....	24
1.2 Células hepáticas.....	25
2. El trasplante hepático .....	27
2.1 Problemática del trasplante hepático.....	28
2.2 Estrategias para aumentar el número de donantes .....	28
2.3 Disfunción y retrasplante hepático.....	32
3. La lesión por isquemia-reperfusión hepática.....	33
3.1 Introducción .....	33
3.2 Relevancia clínica de la lesión por isquemia-reperfusión en el trasplante hepático.....	33
3.3 Patofisiología de la lesión hepática por isquemia-reperfusión.....	35
3.4 Mediadores implicados en la lesión hepática por isquemia-reperfusión .....	35
4. El hígado esteatósico .....	45
4.1 Definición y prevalencia .....	45
4.2 Implicación de la esteatosis hepática en la cirugía hepática .....	46
4.3 Lesión por isquemia-reperfusión en el hígado esteatósico .....	46
5. Estrategias terapéuticas para disminuir la lesión por isquemia-reperfusión .....	50
5.1 Soluciones de preservación.....	50
5.2 Estrategias farmacológicas.....	52
5.3 Terapia génica .....	56
5.4 Estrategias quirúrgicas .....	57
6. El preconditionamiento isquémico .....	58
6.1 Bases moleculares del preconditionamiento isquémico.....	59
6.2 Papel del preconditionamiento isquémico en la lesión por isquemia-reperfusión hepática .....	61
6.3 Preconditionamiento isquémico y esteatosis hepática.....	63
6.4 Aplicación clínica del preconditionamiento isquémico .....	64
6.5 Estrategias futuras para disminuir la lesión por isquemia- reperfusión hepática asociada al trasplante de injertos esteatósicos.....	66
7. Adenosin monofosfato-3',5' ciclico (AMPC).....	66

7.1 El AMPc y la lesión por isquemia-reperfusión hepática. ....	67
8. El ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) y el PPAR $\gamma$ .....	68
8.1 El TUDCA y la lesión por isquemia-reperfusión hepática.....	68
8.2 El PPAR $\gamma$ y la lesión por isquemia-reperfusión hepática.....	69
9. El receptor tipo Toll-4 (TLR4).....	71
9.1 El TLR4 y la lesión por isquemia-reperfusión hepática. ....	72
10. Las adipocitoquinas: Adiponectina, visfatina y resistina.....	73
10.1 La adiponectina y la lesión por isquemia-reperfusión hepática.....	73
10.2 La visfatina, la resistina y la lesión por isquemia-reperfusión hepática. ....	75
<b>Objetivos .....</b>	<b>77</b>
<b>Material y Métodos .....</b>	<b>79</b>
1. Animales de Experimentación .....	79
2. Modelo experimental .....	81
2.1 Trasplante hepático ortotópico .....	81
2.2 Precondicionamiento isquémico.....	85
3. Diseño Experimental.....	86
3.1 Estudio 1 .....	86
3.2 Estudio 2 .....	91
3.3 Estudio 3 .....	96
4. Recogida y procesamiento de las muestras.....	100
5. Determinaciones bioquímicas .....	100
5.1 Trasaminasas.....	100
5.2 Ensayo colorimétrico de MDA.....	101
5.3 Actividad de la mieloperoxidasa .....	101
5.4 Ensayo inmunoenzimático de nitrotirosinas.....	102
5.5 Ensayo colorimétrico de nitritosy nitratos.....	103
5.6 Niveles de glutation .....	103
5.7 Actividad de la xantina deshidrogenasa y xantina oxidasa .....	104
5.8 Actividad de la superóxido dismutasa .....	105
5.9 Análisis de nucleotidos .....	105
5.10 Actividad de la caspasa 3.....	105
5.11 Ensayo inmunoenzimático del TNF .....	106
5.12 Determinación de Interleuquina-1 .....	106
5.13 Determinación de Interleuquina-6 .....	107
5.14 Ensayo inmunoenzimático para las adipocitoquinas: adiponectina, visfatina y resistina .....	107
5.13 Proteínas totales .....	107

6. Técnicas de biología molecular .....	108
6.1 Western blot de la eNOS e iNOS .....	108
6.2 Western blot para la vía del UPR del estrés del retículo endoplasmático...	109
6.3 Western blot del PPAR $\gamma$ .....	110
6.4 Western blot de la vía del TLR4, el PI3K y el Akt.....	111
6.5 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de las adipocitoquinas: Adiponectina, visfatina y resistina.....	112
7. Técnicas histológicas.....	113
7.1 Estudio histológico del tejido hepático .....	113
7.2 Tinción inmunohistoquímica TUNEL .....	113
7.3 Tinción inmunohistoquímica de nitrotirosinas .....	114
7.4 Tinción inmunohistoquímica de adiponectina y resistina.....	115
7.5 Tinción inmunohistoquímica de Ki-67 .....	115
8. Estudio estadístico .....	116
<b>Resultados .....</b>	<b>117</b>
1. Estudio 1 .....	117
2. Estudio 2.....	139
3. Estudio 3.....	155
<b>Discusión.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>175</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.1</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>205</b>



# *Abreviaturas*

---

**AC:** Adenilil ciclasa  
**ADP:** Adenosina difosfato  
**AICAR:** 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleosido  
**ALT:** Alanina aminotransferasa  
**AMP:** Adenosina monofosfato  
**AMPc:** Adenosín monofosfato-3',5' cíclico  
**AMPK:** Proteína quinasa dependiente de AMP  
**ANOVA:** Análisis de la varianza  
**AP-1:** Proteína activadora 1  
**Ara-A:** adenina 9-β-D-arabinofuranosido  
**AST:** Aspartato aminotransferasa  
**AT1R:** Receptor de la Ang II de tipo 1  
**AT2R:** Receptor de la Ang II de tipo 2  
**ATF-1:** Factor activador de la transcripción 1  
**ATF-2:** Factor activador de la transcripción 2  
**ATF-4:** Factor activador de la transcripción 4  
**ATF-6α:** Factor activador de la transcripción 6α  
**ATP:** Trifosfato de adenosina  
**BSA:** Albúmina de suero bovino  
**CaM:** Calmodulina  
**CDNB:** 1-cloro-2,4-dinitrobenceno  
**cG-S:** Guanilato ciclasa  
**CHOP:** Proteína homóloga-10 C/EBP  
**CI:** Clampaje intermitente  
**CINC:** Quimioatrayente de neutrófilos inducido por citoquinas 1  
**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono  
**CREB:** Elemento de respuesta a AMPc  
**CREM:** Elemento modulador de respuesta a AMPc  
**DAB:** Diaminobenzidina  
**DAG:** Diacilglicerol  
**DbcAMP:** Dibutiril adenosina-monofosfato cíclico  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**DPI:** Disfunción primaria del injerto  
**DTT:** Ditiotreitól

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético  
**eIF2 $\alpha$ :** Factor de iniciación en eucariontes  $\alpha$   
**ENA-78:** Proteína activadora de neutrófilos derivada del epitelio 78  
**eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial  
**ERK 1/2:** Proteína quinasa regulada por señales extracelulares 1/2  
**ET:** Endotelina  
**FAD:** Flavina adenina dinucleótido  
**FBP:** Fructosa 1,6-bisfosfato  
**FPI:** Fallo primario del injerto  
**GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos  
**GRP78:** Proteína regulada por glucosa 78  
**GSH:** Glutati6n  
**GSH-éster:** Glutati6n éster  
**GSHPx:** Glutati6n peroxidasa  
**GSSG:** Glutati6n disulfuro  
**GST:** Glutati6n transferasa  
**GW9662:** 2-cloro-5-nitro-N-fenilbenzamine  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Per6xido de hidr6geno  
**HCl:** Ácido clorhídrico  
**HIF-1:** Factor inducible por hipoxia 1  
**HMGB1:** Proteína de alta movilidad del grupo B1  
**HMW:** Peso molecular alto  
**HO-1:** Heme oxigenasa-1  
**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resoluci6n  
**HSE:** Elemento de choque térmico  
**HSF:** Factor de transcripci6n de choque térmico  
**HSP:** Proteína de choque térmico  
**HTBA:** Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio  
**HTK:** Histidina-Tript6fano-Cetoglutarato  
**H&E:** Hematoxilina y Eosina  
**I/R:** Isquemia-Reperfusi6n  
**ICAM-1:** Molécula de adhesi6n intercelular 1  
**IFN $\beta$ :** Interfer6n beta  
**IFN $\gamma$ :** Interfer6n gamma  
**IgG:** Inmunoglobulina G  
**IGL-1:** Soluci6n de Preservaci6n Instituto George Lopez  
**IL-1:** Interleuquina 1  
**IL-6:** Interleuquina 6  
**IL-8:** Interleuquina 8  
**IL-10:** Interleuquina 10  
**IL-12:** Interleuquina 12  
**IL-13:** Interleuquina 13  
**IL-18:** Interleuquina 18  
**IL-1ra:** Antagonista del receptor de la IL-1

**iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible  
**IRF3:** Factor de transcripción regulatorio de interferón  
**I/R:** Isquemia/reperfusión  
**JNK:** Quinasa c-Jun N-terminal  
**LBP:** proteína de unión a LPS  
**LMW:** Bajo peso molecular  
**L-NAME:** N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro  
**LPS:** Lipopolisacárido  
**LTB4:** Leucotrieno B4  
**MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos  
**MCP:** Proteína quimiotáctica de monocitos  
**MDA:** Malondialdehído  
**MEF2C:** Factor potenciador del miocito  
**MIP:** Proteína inflamatoria de macrófagos  
**MMW:** Peso molecular medio  
**MPO:** Mieloperoxidasa  
**MPT:** Transición a la permeabilidad mitocondrial  
**MyD88:** Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88  
**NAD<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada  
**NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida  
**NADP<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada  
**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida  
**NBT:** Nitroazul de tetrazolio  
**NF $\kappa$ B:** Factor nuclear kappa  $\beta$   
**NO:** Óxido nítrico  
**NOS:** Óxido nítrico sintasa  
**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Nitrito  
**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:** Nitrato  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Radical superóxido  
**OH:** Radical hidroxilo  
**ONT:** Organización Nacional de Trasplante  
**OONO<sup>-</sup>:** Peroxinitrito  
**p38 MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógeno p38  
**PAF:** Factor activador de plaquetas  
**PAMP:** Patrones moleculares asociados a patógenos  
**PBEF:** Promotor estimulante de las colonias de células pre-B  
**PBS:** Tampón fosfato salino  
**PC:** Precondicionamiento  
**PDE:** Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos  
**PEG:** Polietilenglicol  
**PERK:** Proteína quinasa del retículo endoplasmático  
**PGI<sub>2</sub>:** Prostaciclina  
**PI3K:** Fosfatidil inositol 3-quinasa  
**PKA:** Proteína quinasa A

**PKB/Akt:** Proteína quinasa B  
**PKC:** Proteína quinasa C  
**PLC:** Fosfolipasa C  
**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
**PPARs:** Receptores activadores de la proliferación de peroxisomas  
**PPAR $\alpha$ :** Receptor activador de la proliferación de peroxisomas alfa  
**PPAR $\gamma$ :** Receptor activador de la proliferación de peroxisomas gamma  
**PVDF:** Polifluoruro de vinilideno  
**RBP4:** Proteína de transporte del retinol 4  
**RLO:** Radicales libres de oxígeno  
**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real  
**SA-HRP:** Peroxidasa-estreptavidina.  
**SAM:** S-adenosilmetionina  
**SAPK:** Proteína quinasa activada por estrés  
**SD:** Rata Sprague Dawley  
**SDS:** Dodecilsulfato de sodio  
**siRNA:** RNA interferente corto  
**SOD:** Superóxido dismutasa  
**SQ22536:** 9-(tetrahidro-2-furanyl)-9H-purin-6-amino  
**STAT3:** Transductor de señal y activador de la transcripción 3  
**STAT6:** Transductor de señal y activador de la transcripción 6  
**TBA:** Ácido tiobarbitúrico  
**TBS:** Solución salina tamponada con Tris  
**TCA:** Ácido tricloroacético  
**TH:** Trasplante hepático  
**TIRAP:** Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR  
**TLR:** Receptores tipo Toll  
**TLR1:** Receptor tipo toll 1  
**TLR4:** Receptor tipo toll 4  
**TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina  
**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa  
**TNF- $\beta$ :** Factor de necrosis tumoral beta  
**TNF:** Factor de necrosis tumoral  
**TRAF2:** Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral 2  
**TRAF6:** Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral 6  
**TRAIL:** Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF  
**TRAM:** Molécula adaptadora relacionada con TRIF  
**TRIF:** Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR inductor de IFN $\beta$   
**TTBS:** Solución salina tamponada con Tris que contiene Tween 20  
**TUDCA:** Ácido tauroursodeoxicólico  
**TUNEL:** Del inglés "Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin Nick-End Labeling"  
**UCP2:** Proteína desacoplante-2 mitocondrial  
**UDCA:** Ácido ursodesoxicólico

**UPR:** Respuesta a proteínas desplegadas

**UW:** Universidad de Wisconsin

**VCAM-1:** Molécula de adhesión celular vascular 1

**WS:** Rata Wistar

**X/XOD:** Xantina/Xantina Oxidasa

**XBP-1:** Proteína de unión 1 caja X

**XHD:** Xantina deshidrogenasa

**XOD:** Xantina oxidasa



## 1. El hígado

### 1.1 Generalidades

El hígado es una glándula accesoria del aparato gastrointestinal, representa del 2 al 5% del peso corporal en adultos y se encuentra situado en el lado superior derecho de la cavidad abdominal, por debajo del diafragma. Es un órgano de importancia vital con múltiples y complejas funciones metabólicas (**Tabla 1**). Además del papel del hígado en la detoxificación de productos de desecho del metabolismo, también actúa regulando el metabolismo energético al procesar los nutrientes que provienen de la digestión a fin de distribuirlos al resto de los tejidos. Otras funciones del hígado indican un papel central en la regulación de múltiples procesos bioquímicos y homeostáticos como: la síntesis y secreción de bilis; la síntesis de proteínas y lipoproteínas plasmáticas y factores de coagulación; la detoxificación de fármacos y toxinas; y además, funciones metabólicas como son la síntesis de glucógeno, la gluconeogénesis y también el almacenamiento de glucógeno y de algunas vitaminas y lípidos [1-3].

<b>FUNCIONES PRINCIPALES DEL HIGADO</b>
<b>Metabolismo de carbohidratos</b> Captación de glucosa Síntesis y almacenamiento de glucógeno Glucogenólisis y gluconeogénesis
<b>Metabolismo lipídico</b> Oxidación de ácidos grasos Síntesis de lipoproteínas, colesterol, triglicéridos y fosfolípidos Cetogénesis
<b>Metabolismo proteico</b> Degradación de aminoácidos Síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y urea
<b>Metabolismo del grupo hemo</b> Síntesis del grupo hemo y de porfirinógenos
<b>Formación y secreción de bilis</b>
<b>Inactivación de diversas sustancias</b> Como tóxicos, esteroides y otras hormonas
<b>Síntesis de proteínas plasmáticas</b> Albumina y proteínas de fase aguda
<b>Inmunidad</b> A través de células de Kupffer

**Tabla 1.** Resumen de algunas de las principales funciones del hígado

## 1.2 Organización del hígado

Como la mayoría de las glándulas exocrinas, el hígado está dividido anatómicamente en lóbulos y lobulillos más pequeños mediante una serie de tabiques de tejido conjuntivo. Se reconocen cuatro lóbulos de distintos tamaños, el lóbulo derecho, situado a la derecha del ligamento falciforme; el lóbulo izquierdo, situado a la izquierda del ligamento falciforme y extendido sobre el estomago; el lóbulo cuadrado, visible solamente en la cara inferior del hígado encontrándose limitado por el surco umbilical a la izquierda, el vesicular a la derecha y el hilio del hígado por detrás y por último el lóbulo caudato o lóbulo de Spiegel, situado entre el borde posterior del hilio hepático por delante y la vena cava por detrás.

El hígado está recubierto exteriormente por una capa de células mesoteliales. Por debajo se encuentra una cápsula de tejido conectivo delgado denominada cápsula de Glisson, que a nivel del hilio (surco transversal situado en la cara inferior del hígado) se extiende ramificándose y penetrando en el parénquima hepático. El parénquima hepático está constituido por grupos de células epiteliales, hepatocitos y por un sistema ramificado de conductos. Se puede observar un patrón repetido de áreas más o menos hexagonales en las que los cordones de hepatocitos se disponen de forma radial alrededor de una vena central. En los ángulos de estas zonas poligonales hay una pequeña área triangular formada por tejido conjuntivo que contiene un conducto biliar, una rama de la arteria hepática y una rama de la vena porta. Este complejo se denomina triada portal. Las ramas laterales de estos vasos confluyen en los sinusoides hepáticos, capilares venosos que reciben sangre de la vena porta y de la arteria hepática y que ocupan los espacios que quedan entre los cordones de hepatocitos y drenan en la vena central (**Figura 1**). Por lo tanto, las células hepáticas están expuestas a un gran volumen de sangre que fluye por los sinusoides debido a la marcada porosidad de las paredes de los sinusoides. Los sinusoides hepáticos se encuentran revestidos por dos tipos de células, las células endoteliales típicas y las células de Kupffer. El espacio que existe entre los cordones de hepatocitos y la pared del sinusoides se denomina espacio de Disse, y contiene un sistema de fibras de colágeno con funciones de soporte. En el interior de los cordones de hepatocitos existe una red de canalículos biliares, donde es secretada la bilis producida de forma continua por las células hepáticas, que desembocan en conductos biliares mayores situados en las triadas portales [1,2].

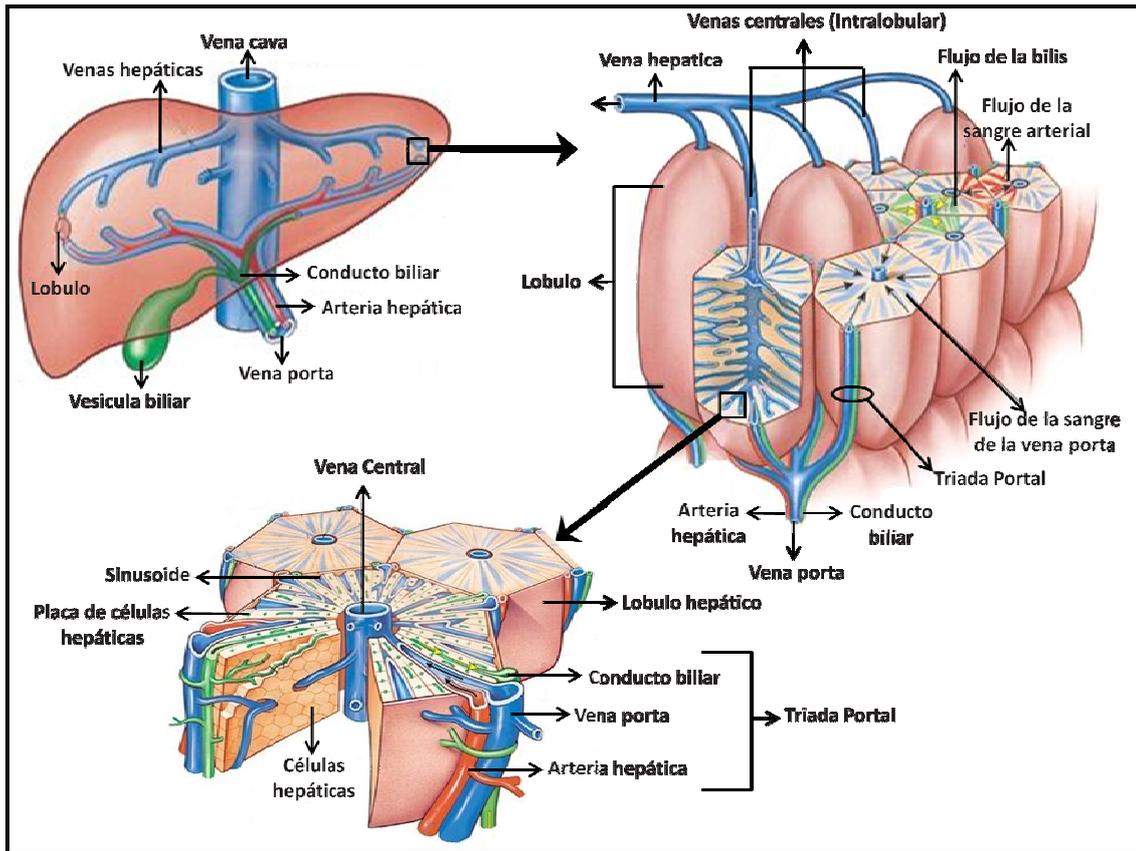


Figura 1. Estructura histológica del hígado.

Actualmente se considera el acino hepático como la unidad estructural y funcional básica del hígado (Figura 2). El acino hepático consiste en un área romboidal de hepatocitos cuyo centro es una triada portal y los extremos son dos venas centrales [1-3]. A medida que la sangre arterial se acerca más a las venas centrales, la sangre disminuye su calidad nutritiva, por lo que se distinguen tres zonas en cada acino: La zona 1 linda con el centro del acino y es la primera en recibir oxígeno; la zona 2 se encuentra en el medio y la zona 3 al lado de la vena centrolobulillar, donde hay mayor proporción de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y sustancias de desecho, y es la región más expuesta a las toxinas [1].

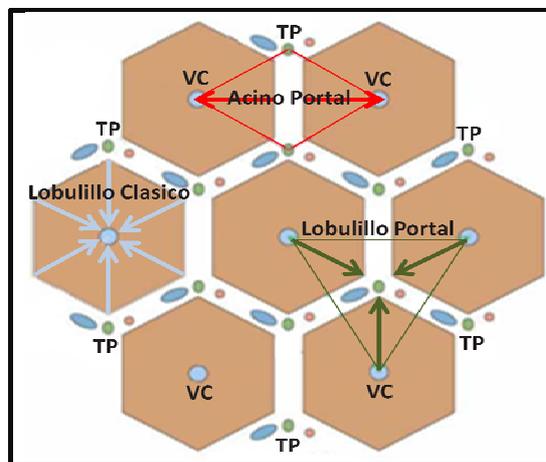
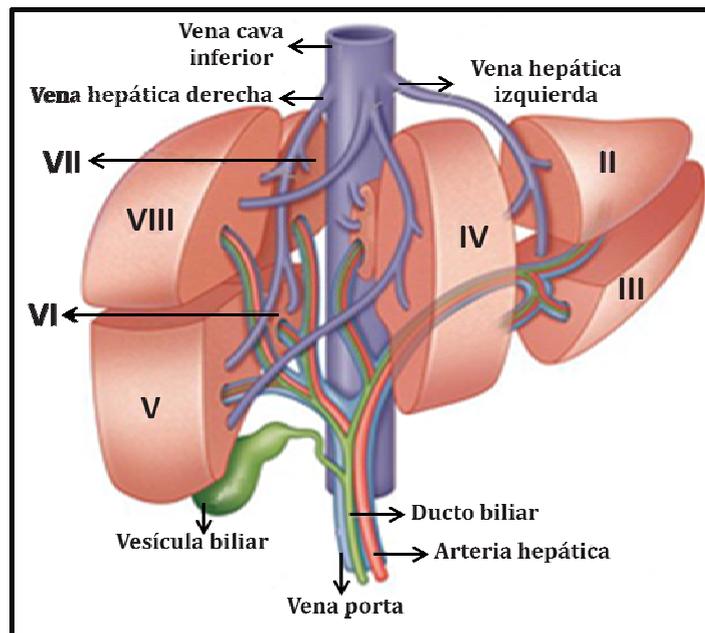


Figura 2. El acino hepático. VC, vena porta; TP, triada portal.

Así mismo, el hígado se puede dividir siguiendo un criterio funcional. Al llegar al hígado, la vena porta se bifurca en dos ramas que dividen el hígado en dos partes, izquierda y derecha. Cada mitad tiene un aporte sanguíneo independiente, tanto desde la vena porta como desde la arteria hepática; de la misma manera, el drenaje biliar también es independiente. Cada una de las dos ramas de la vena porta se bifurca en dos, dividiendo el hígado en cuatro sectores, que a su vez se dividen en 8 segmentos (**Figura 3**). Cada segmento tiene su propio pedículo vascular y biliar, así como su drenaje venoso. Esta división del hígado en segmentos facilita la realización de ciertas intervenciones hepáticas que incluyen resecciones hepáticas, así como técnicas aplicadas al trasplante hepático como son la técnica del Split y la realización de trasplantes desde un donante vivo [2,3].



**Figura 3.** Esquema de la segmentación del hígado en su cara diafragmática. El trayecto de las principales venas hepáticas indica su relación con las fisuras. D, fisura derecha; P, fisura principal o sagital; I, fisura izquierda

### 1.3 Sistema vascular hepático

A diferencia de cualquier otro órgano, el hígado recibe sangre de dos vías diferentes: la vena porta (aproximadamente 75% del aporte sanguíneo del hígado), que transporta la sangre proveniente del territorio esplácnico (intestino, páncreas y bazo) con un bajo contenido de oxígeno pero rica en sustancias absorbidas por el intestino, así como también en hormonas y otros elementos que se producen en el intestino, bazo y en el páncreas; y la arteria hepática (aproximadamente el 25% del aporte sanguíneo hepático), que transporta sangre rica en oxígeno procedente del corazón (**Figura 4**). Tanto la sangre proveniente de la vena porta como de la arteria hepática, finalmente alcanzará los sinusoides hepáticos, que es el lugar donde tiene lugar el intercambio entre la sangre y los hepatocitos. Los sinusoides hepáticos tienen una anchura superior a la de los capilares sanguíneos, y aunque su pared está formada por células endoteliales, hay zonas que permiten el acceso directo

del plasma sanguíneo a los hepatocitos. Cada célula de los cordones hepáticos dispuestos radialmente está en contacto, al menos por un costado, con la sangre que fluye por los sinusoides.

La sangre de los sinusoides hepáticos fluye desde la rama de la vena porta a la entrada de los sinusoides hacia la vena central del lobulillo hepático, que desemboca en las vénulas hepáticas y finalmente en la vena cava inferior justo por debajo del diafragma. De esta manera, las características de la sangre que llega a cada hepatocito son diferentes dependiendo de su distancia de la vena portal, menos oxigenada cuanto más alejada de ésta, y trae como consecuencia, una gran heterogeneidad funcional entre los hepatocitos. Probablemente, todos los hepatocitos tienen capacidad para realizar todas las funciones, pero sin embargo, presentan diferencias tanto en su estructura como en su actividad enzimática dependiendo de la concentración de oxígeno y de solutos de la sangre de la zona del lobulillo hepático donde se encuentran ubicados [1-3].

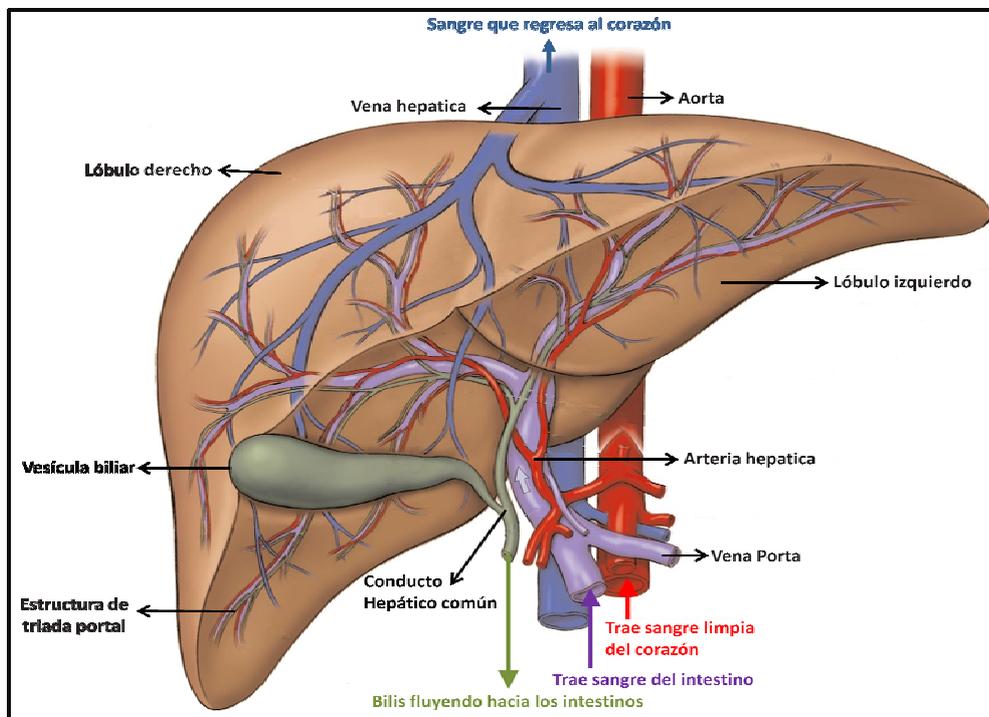


Figura 4. Irrigación sanguínea del hígado.

## 1.4 Células hepáticas

- **Hepatocitos**

Los hepatocitos son las células que forman el parénquima hepático y representan aproximadamente el 90% de la masa hepática total. A nivel metabólico son una de las células más complejas y diversas que existen, y llevan a cabo una gran variedad de funciones, entre las que se incluyen: la obtención, almacenamiento y liberación a la circulación sanguínea de un gran número de nutrientes, entre ellos los glúcidos, las proteínas, las vitaminas y los lípidos; la síntesis de proteínas

plasmáticas, lipoproteínas, ácidos grasos, colesterol, fosfolípidos, y glucosa; la digestión y absorción de las grasas alimenticias a través de la secreción de la bilis; y la detoxificación de compuestos endógenos y exógenos tóxicos para el organismo [3].

Los hepatocitos poseen forma poliédrica cuyo diámetro varía entre 15-30  $\mu\text{m}$ , y se disponen en cordones entre los sinusoides hepáticos, de modo que cada hepatocito está en contacto directo con los hepatocitos adyacentes, el canalículo biliar y el sinusoides hepático (espacio de Disse). La parte del hepatocito que está en contacto con el sinusoides recibe el nombre de región sinusoidal, y a través de ésta los hepatocitos realizan su función endocrina, es decir, la síntesis de proteínas y otros compuestos que liberan al sinusoides; mientras que la parte del hepatocito en contacto con los hepatocitos adyacentes recibe el nombre de región lateral, y a través de ésta realizan su función exocrina, es decir, la secreción de bilis al canalículo biliar presente en esta región [2,3].

A causa de la alta tasa metabólica, los hepatocitos tienen un gran número de orgánulos citoplasmáticos. Entre ellos destacan a) el retículo endoplasmático (RE) donde se sintetizan proteínas, se realiza el metabolismo lipídico, el metabolismo de la glucosa y la degradación del grupo hemo; b) el aparato de Golgi, donde tiene lugar la síntesis de proteínas, la glicosilación de proteínas, el reciclaje de receptores y la secreción de bilis y; c) las mitocondrias, donde tiene lugar la fosforilación oxidativa y la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) [2].

- **Células endoteliales**

Las células endoteliales constituyen las paredes de los sinusoides hepáticos y están separadas de los hepatocitos por el espacio de Disse, creando un compartimiento extravascular hacia el cual los hepatocitos proyectan microvellosidades, para aumentar la superficie de contacto entre el hepatocito y el espacio vascular. Estas células poseen características únicas y actúan como barreras entre la corriente de la sangre por un lado y los hepatocitos en el otro. Entre las células endoteliales sinusoidales existen poros o fenestraciones de gran tamaño, de manera que permiten el intercambio de fluidos y macromoléculas (incluso proteínas) entre los sinusoides y el espacio de Disse. Una sola célula endotelial puede tener cientos de fenestraciones y éstas son estructuras dinámicas que responden a diferentes estímulos; calcio, serotonina, nicotina, impulsos neuronales, alcohol, endotoxinas, entre otras [1-3]. Las células endoteliales participan activamente en la inflamación, de manera que frente a determinados estímulos pueden liberar diversos mediadores como interleuquinas y óxido nítrico (NO) [3].

- **Células de Kupffer**

Las células de Kupffer son los macrófagos del hígado y pertenecen al sistema fagocítico mononuclear. Tienen forma irregular y se encuentran situadas en la superficie de las células endoteliales, emitiendo prolongaciones que se extienden hacia la luz de los sinusoides y entre las células endoteliales subyacentes. Contienen numerosos lisosomas muy desarrollados y vesículas pinocíticas, ya que su principal característica es su capacidad fagocítica. Actuando como barrera

protectora por su capacidad de eliminar por endocitosis diversas sustancias potencialmente dañinas para el organismo como microorganismos, endotoxinas, complejos inmunes, lípidos, entre otros. Así mismo, las células de Kupffer pueden reconocer y fagocitar eritrocitos envejecidos o lesionados, y eliminan de la sangre los bacilos que intentan introducirse en la circulación portal después de su paso por los intestinos. La activación de las células de Kupffer puede estar provocada por diferentes estímulos, entre ellos las endotoxinas. Una vez activadas, generan mediadores citotóxicos como son citoquinas, radicales libres de oxígeno (RLO) y proteasas [3].

- **Células estrelladas**

Las células estrelladas, también conocidas como células de Ito, están localizadas en el espacio de Disse, en estrecho contacto con las células endoteliales, y constituyen el principal almacén de vitamina A del organismo. Además sintetizan proteínas de la matriz extracelular (colágenos de distintos tipos), son mediadores importantes de procesos de reparación del tejido hepático (cicatrización) en diversas patologías hepáticas y poseen capacidad para promover y amplificar la respuesta inflamatoria [3].

En condiciones fisiológicas, comprenden alrededor del 15% del número total de células hepáticas. Su principal función es el almacenamiento y la homeostasis de la vitamina A y otros retinoides, que se almacenan como gotas lipídicas citoplasmáticas en forma de ésteres de retinilo. Las células estrelladas regulan el flujo sanguíneo sinusoidal y producen apolipoproteínas, prostaglandinas, factores de crecimiento y citoquinas, las cuales contribuyen a la homeostasis de la matriz extracelular [4].

## **2. El trasplante hepático**

El hígado se puede ver afectado por un gran número de enfermedades de fase aguda o crónica que impidan que realice correctamente sus funciones. En ocasiones estas enfermedades son tan graves que limitan la capacidad del hígado para mantener la homeostasis del organismo. El trasplante hepático está indicado en las enfermedades hepáticas progresivas en las que no sean posibles otras medidas terapéuticas, y en las que la supervivencia esperada sea inferior a la que se conseguiría con el trasplante [5,6]. Entre las enfermedades susceptibles de trasplante hepático encontramos la insuficiencia hepática por hepatitis crónica o cirrosis de cualquier etiología, la insuficiencia hepática aguda grave, algunos tumores hepáticos, las anomalías hepáticas congénitas, las enfermedades genéticas o los trastornos metabólicos cuya deficiencia reside en el hígado y, por último, el fracaso del hígado trasplantado [6]. En los últimos años, el trasplante hepático ha evolucionado de ser un procedimiento experimental con éxito moderado antes de 1980, hasta convertirse en una operación estándar con tasas de supervivencia muy altas para pacientes que anteriormente tenían mal pronóstico ante una enfermedad hepática avanzada e irreversible. Los avances más importantes que han contribuido a esta evolución son la introducción de nuevos fármacos inmunosupresores que combaten de forma eficaz el rechazo inmunológico, la mejora de

la técnica quirúrgica y los avances producidos en la obtención y preservación del injerto, sobre todo a raíz de la utilización de la solución de Universidad de Wisconsin (UW) como solución de preservación hepática [6-8].

## 2.1 Problemática del trasplante hepático

No obstante y pese a todos los avances que han contribuido al establecimiento del trasplante hepático como una técnica rutinaria en la práctica clínica, hay todavía bastantes dificultades por resolver. Actualmente la principal limitación del trasplante hepático es la falta de donantes. Si bien es cierto que la tasa de donaciones en España es la más alta del mundo según la Organización Nacional de Trasplante (ONT), el número de pacientes en lista de espera de un hígado supera al número de donantes [9]. Por lo tanto, es muy importante optimizar los recursos disponibles en este campo. Este problema se puede abordar de la siguiente forma: por un lado aumentar el número de injertos disponibles para ser trasplantados; y por el otro lado intervenir para que el injerto trasplantado funcione correctamente evitando así, recurrir al retrasplante lo que supondría el desaprovechamiento de un órgano [10,11].

## 2.2 Estrategias para aumentar el número de donantes

- **Evaluación y ampliación de las variables de aceptación de órganos**

No todos los órganos disponibles se aceptan para trasplante. Los órganos son sometidos a una valoración individual y una vez conocidas sus características, son aceptados o no para ser trasplantados según unos criterios preestablecidos en la práctica clínica. Debido a la experiencia acumulada con el paso de los años, y a la falta de órganos disponibles para trasplante hepático. Los centros hospitalarios han debido ampliar los criterios de aceptación de un órgano para ser trasplantado. De este modo, la edad máxima y media de los donantes de hígado ha ido ampliándose con los años y este factor ya no es considerado limitante a la hora de seleccionar como aceptable un órgano para ser trasplantado [12-15]. De la misma forma, enfermedades crónicas padecidas por el donante, como la hipertensión arterial o la diabetes mellitus que anteriormente provocaban que los órganos fueran descartados para trasplante, no son consideradas actualmente como criterios de rechazo de órganos para trasplante [2,12-16].

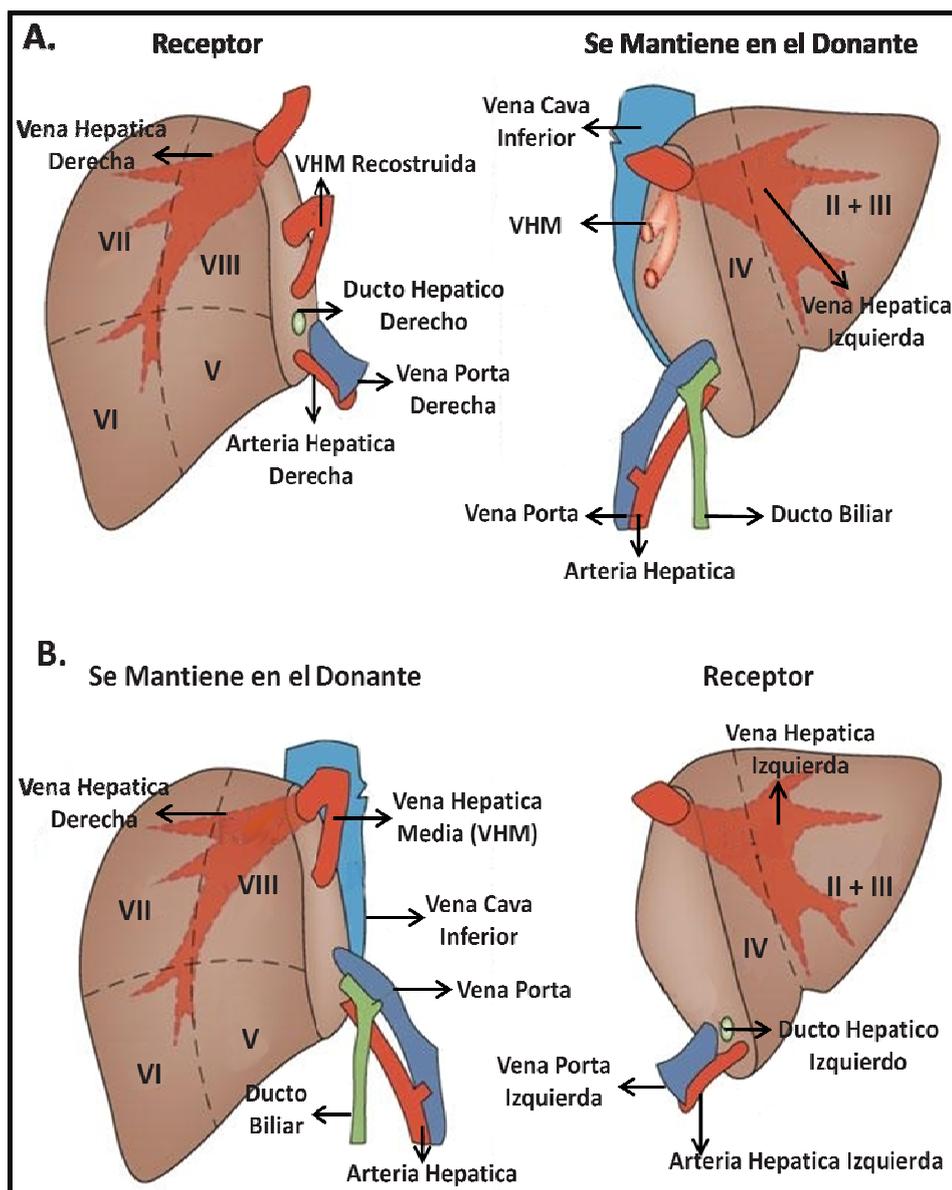
La falta de órganos para trasplante ha derivado en la aceptación de órganos que presentan una mayor susceptibilidad a la lesión por isquemia/reperfusión (I/R), la cual es inherente a todo tipo de trasplante hepático. Cuando se utilizan para el trasplante injertos hepáticos procedentes de donantes de más de 70 años de edad, la supervivencia del receptor es baja [17]. Además, estos donantes presentan un índice de esteatosis mayor, lo cual exacerba el daño inducido por I/R. El donante a corazón parado fue en el inicio del trasplante hepático la única fuente de órganos hasta que se aceptó el concepto de muerte cerebral. Actualmente se distinguen dos tipos de donantes a corazón parado, controlados y no controlados. Muchos centros descartan el uso de los donantes no controlados (en los que el fallecimiento del donante ocurre en una situación fuera del control

hospitalario) puesto que en este tipo de donantes no se puede conocer con exactitud el tiempo en el que el órgano permanece en el interior del organismo sin irrigación sanguínea antes de su extracción (tiempo de isquemia caliente) y las distintas experiencias en trasplante no son muy alentadoras [18-20]. Sin embargo, numerosos estudios muestran que el trasplante de hígado procedente de donantes controlados (en los que el fallecimiento del donante tiene lugar bajo control hospitalario y por lo tanto se puede minimizar el tiempo de isquemia caliente) da lugar a resultados semejantes a los obtenidos con donantes cadavéricos aunque con un mayor riesgo de complicaciones biliares [21-28]. Por lo tanto, la experiencia en trasplante de hígado con donantes a corazón parado es todavía muy limitada. La utilización de injertos hepáticos esteatósicos para trasplante conlleva un mayor riesgo de disfunción o fallo del injerto comparado con injertos hepáticos sin esteatosis. La esteatosis hepática agrava el problema de la falta de órganos ya que se sabe que entre todos los hígados que no son considerados como aptos para trasplante por sus condiciones patológicas, más del 50% son hígados esteatósicos, de ahí que la esteatosis sea la causa del mayor número de órganos no aptos para trasplante, acentuando así la problemática del banco de órganos [17].

- **Técnicas de trasplante hepático alternativas a la convencional**

Con la intención de practicar el trasplante hepático a un mayor número de pacientes, se han optimizado diversas técnicas de trasplante alternativas a la convencional como el caso de la técnica de Split, el trasplante dominó y el trasplante hepático procedente de donante vivo [2,10].

**Donante vivo.** La técnica del trasplante de donante vivo consiste en la utilización como injertos de segmentos hepáticos que provienen de un donante vivo. Al principio, esta técnica fue utilizada para receptores pediátricos [29] y en 1994 se realizó el primer trasplante hepático a un adulto procedente del lóbulo derecho de un donante vivo [30]. En el trasplante pediátrico de adulto a niño, se trasplanta el lóbulo lateral izquierdo o el izquierdo completo, dependiendo del peso del receptor (**Figura 5**). En el caso del trasplante de donante vivo de adulto a adulto, se han obtenido buenos resultados utilizando el injerto derecho completo ya que este representa aproximadamente el 60% de la masa hepática; en receptores de poco peso se utiliza el lóbulo izquierdo y el izquierdo extendido para receptores de mayor peso [31]. Actualmente esta modalidad quirúrgica representa una alternativa válida y segura en centros con experiencia en cirugía hepática llegando a representar el 25% del total de los trasplantes realizados [32]. Uno de los beneficios de los injertos de tamaño reducido a partir de donante vivo es obtener un injerto de buena calidad con un tiempo isquémico corto, ya que la cirugía del donante puede ser programada para coincidir en tiempo con la cirugía del receptor. Por otro lado, el mayor problema concerniente a la aplicación del trasplante hepático de donante vivo es la disparidad del tamaño del injerto, lo cual implica una posterior regeneración del injerto hepático de tamaño reducido [33-36].



**Figura 5.** Técnica de trasplante de donante vivo. A. Trasplante hepático del lóbulo derecho. B. Trasplante hepático de lóbulo izquierdo

**Técnica de Split.** La técnica de Split o bipartición hepática permite la realización de dos trasplantes hepáticos a partir de un único hígado donante. La técnica quirúrgica está basada en la anatomía segmentaria hepática según *Couinaud* (**Figura 6**). En su inicio esta técnica fue desarrollada por equipos de cirugía pediátrica ante la escasez de donantes de este sector de la población y la necesidad de un escaso volumen hepático, que en líneas generales no sobrepasaba el 20% de la masa hepática de un hígado adulto. De esta forma esta técnica se comenzó a realizar utilizando un mismo injerto que se implantaba en un receptor pediátrico y en otro adulto. Con posterioridad se comenzó a utilizar esta técnica para realizar el trasplante a dos receptores adultos, uno de ellos de peso inferior a 60 kg. La frecuencia de esta técnica ha aumentado en los últimos años con resultados satisfactorios [37-39].

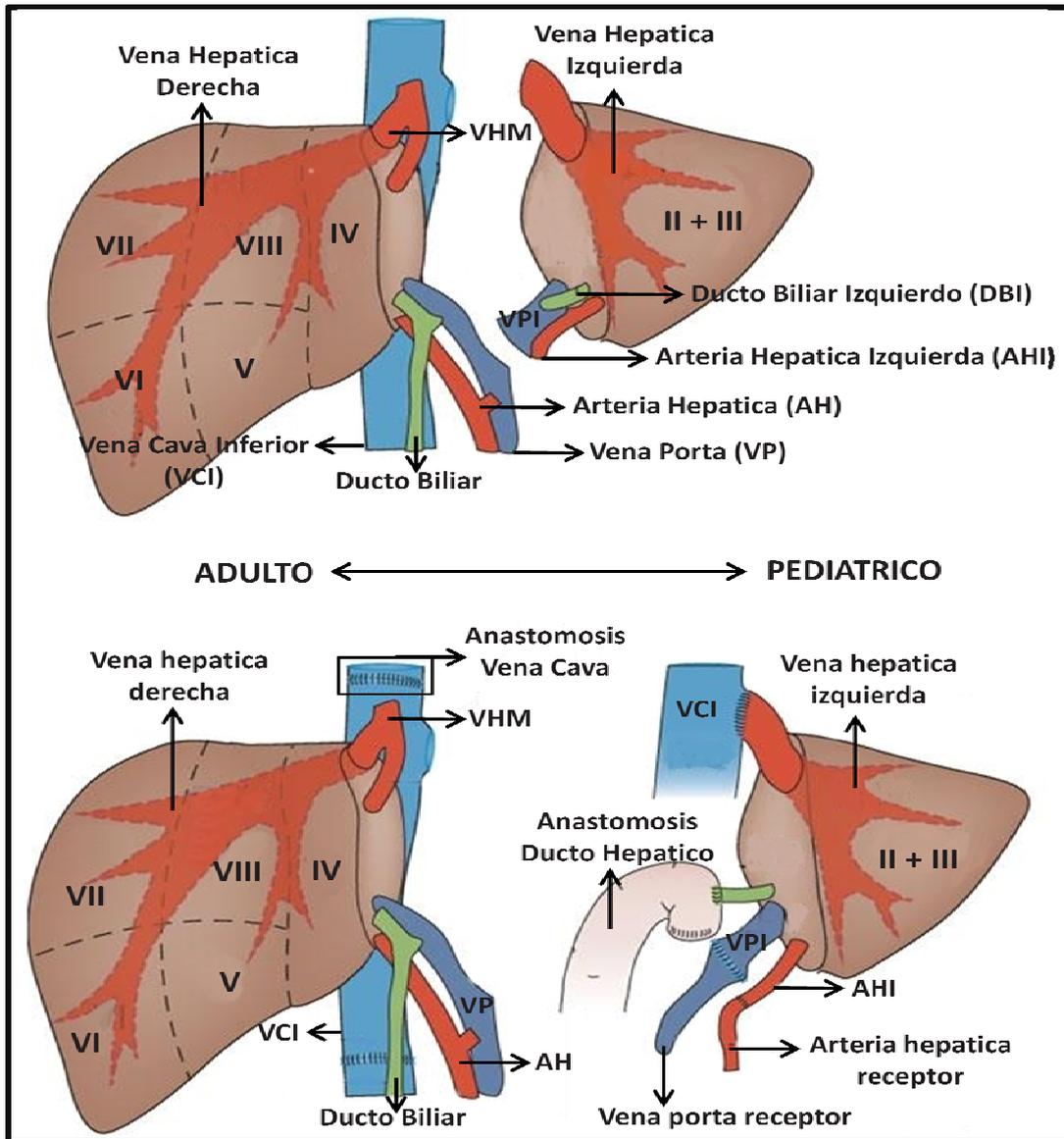


Figura 6. Técnica de trasplante alternativo Split

**Trasplante dominó.** Pacientes con un hígado de estructura y función correcta son sometidos en algunas ocasiones al trasplante del órgano para controlar el avance de un trastorno metabólico que afecta gravemente a su salud, es lo que sucede en pacientes con polineuropatía amiloidótica familiar [40,41]. La polineuropatía amiloidótica familiar es una enfermedad metabólica crónica, en la que el hígado posee una estructura y función correcta salvo la síntesis anómala de una proteína denominada transferrina, que provoca el depósito de sustancia amiloide en varios órganos, pero sobre todo en el sistema nervioso autónomo. Los síntomas de la enfermedad comienzan a manifestarse entre la segunda y tercera década de la vida, aunque en algunos casos tarda incluso 75 años en aparecer. La utilización de estos injertos procedentes de un donante con polineuropatía amiloidótica familiar estaría indicada en receptores de edad avanzada o en aquellos con tumores hepáticos de mal pronóstico en los que la supervivencia esperada tras el trasplante sea menor que el tiempo de desarrollo de los síntomas de polineuropatía amiloidótica familiar [42,43].

El desarrollo de algunas de estas técnicas ha sido posible debido a la capacidad de regeneración del hígado ante el daño tisular, que a diferencia de otros tejidos con capacidad de regeneración, no depende de un grupo de células germinales (células stem) sino que se produce por la proliferación de las células hepáticas maduras [2,44]. Diversos estudios han mostrado que la respuesta regenerativa del hígado es proporcional a la cantidad de hígado y tiene como resultado la recuperación del tamaño original del mismo al poco tiempo.

Pese a los esfuerzos realizados por aumentar la donación de órganos y aunque las estrategias adoptadas han permitido aumentar el número de órganos disponibles para ser trasplantados, éstas siguen siendo insuficientes para resolver el problema de la falta de órganos.

### **2.3 Disfunción y retrasplante hepático**

Todos los avances llevados a cabo en los últimos años han permitido mejorar significativamente el pronóstico del trasplante hepático, aumentando la supervivencia de los receptores y han convertido al trasplante hepático en la terapia de elección en niños y adultos con enfermedades hepáticas avanzadas sin tratamiento alternativo. Pero, pese a las mejoras introducidas en la técnica del trasplante hepático, la disfunción del injerto sigue siendo la complicación más importante tras un trasplante hepático.

Cuando esta disfunción ocurre inmediatamente posterior al trasplante hepático, sin causa alguna conocida, se habla de disfunción primaria del injerto (DPI) [45,46]. La DPI se puede subdividir en dos grupos: “pobre función inicial del injerto”, que hace referencia a los hígados que logran mantener una función suficiente para evitar la muerte del paciente, y el “fallo primario del injerto (FPI), que engloba a los hígados que no logran mantener con vida al paciente a menos que éste sea retrasplantado.

La lesión por I/R es la causa más común de FPI tras el trasplante [47,48]. El tratamiento de elección para el FPI es el retrasplante. El FPI es la segunda causa de retrasplante después de las complicaciones técnicas y el rechazo inmunológico, siendo responsable del 81% de los retrasplantes durante la primera semana después del trasplante hepático [17]. Aunque el retrasplante es factible si se obtiene otro hígado compatible, este hecho supone el desaprovechamiento de hígados para trasplante, acentuando aun más el problema de la falta de órganos.

En el trasplante de hígados marginales, la lesión de I/R se agrava, aumentando los casos de malfunción primaria y retrasplante tras la intervención quirúrgica [20,49-54]. El desarrollo de estrategias encaminadas a minimizar los efectos adversos del proceso de I/R en el trasplante hepático podría por un lado aumentar los órganos disponibles para el trasplante al permitir la utilización de los hígados marginales y por otro aumentar el número de pacientes que se recuperen exitosamente tras un trasplante hepático, reduciendo el número de retrasplantes y evitando de ese modo el desaprovechamiento de órganos.

### **3. La lesión por isquemia-reperfusión hepática**

#### **3.1 Introducción**

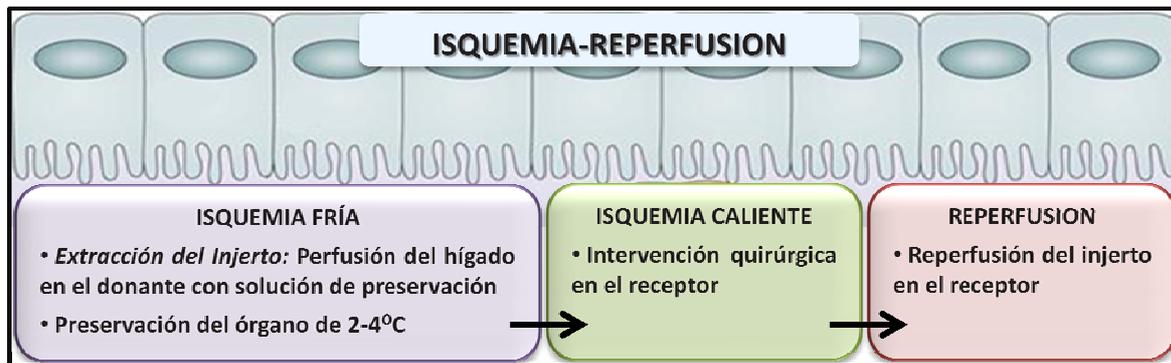
La lesión por isquemia-reperfusión (I/R) es un proceso complejo que se inicia cuando el hígado se ve privado temporalmente de flujo sanguíneo (isquemia hepática). Al restablecerse el flujo sanguíneo al hígado (reperfusión hepática) se agrava la lesión inducida por la isquemia (lesión por I/R). Esta lesión tisular tiene por tanto dos componentes fundamentales: la lesión por isquemia debido a la hipoxia, y la lesión por reperfusión provocada principalmente por la síntesis de diversos mediadores inflamatorios [55]. La lesión por I/R fue reconocida como un desorden patológico clínicamente relevante por Toledo-Pereyra et al. en 1975 realizando estudios en trasplante hepático experimental [56].

En la práctica clínica tiene lugar la isquemia normotérmica y la isquemia fría, dependiendo de la temperatura a la cual está sometido el hígado cuando tiene lugar la isquemia hepática. Así pues, se habla de isquemia normotérmica si el hígado se mantiene a 37°C durante el tiempo en el cual se ve privado del flujo sanguíneo. La lesión por I/R normotérmica es clínicamente relevante en cirugía hepática, trasplante hepático, shock hipovolémico, algunos tipos de daño tóxico hepático, enfermedad veno-oclusiva y síndrome de Budd-Chiari. Por otro lado, la isquemia fría hace referencia a la situación en la cual el hígado es sometido a una temperatura de 4°C cuando se ve privado de forma temporal del aporte sanguíneo. La lesión por I/R fría ocurre durante la preservación del hígado antes del trasplante y se aplica intencionalmente para reducir la actividad metabólica del injerto mientras el órgano espera a ser implantado en el receptor. Existen muchas similitudes entre la patología y los mecanismos patogénicos de la lesión por isquemia normotérmica y fría, pero también hay diferencias en los tipos celulares implicados. En los años 80s se demostró que la I/R fría específicamente causaba daño a las células endoteliales sinusoidales. La lesión en las células endoteliales favorece la adhesión leucocitaria y de plaquetas, lo cual induce fallos en la microcirculación hepática. En numerosos modelos experimentales se ha demostrado que el grado de lesión en las células endoteliales se correlaciona con la duración de la isquemia fría. A diferencia de lo que ocurre en condiciones de isquemia fría, la I/R normotérmica afecta a todos los tipos celulares hepáticos, tales como hepatocitos, células endoteliales, macrófagos, leucocitos adherentes y plaquetas [57].

#### **3.2 Relevancia clínica de la lesión por I/R en el trasplante hepático**

El procedimiento estándar para el trasplante hepático se inicia con la extracción del hígado del donante. Antes de su extracción el hígado es perfundido con la solución de preservación UW, a una temperatura de 4°C. En este momento comienza la fase de isquemia fría. A continuación el hígado es extraído del donante y colocado en solución de preservación a baja temperatura (2-4°C), con la finalidad de ralentizar al máximo el metabolismo hepático hasta su posterior implante en el

receptor. Este periodo de isquemia fría suele durar en la práctica clínica de 6 a 8 horas. Tras este periodo de isquemia fría, el órgano es sometido a un periodo de isquemia caliente o normotérmica, que se prolonga desde que el órgano es situado en la cavidad abdominal del receptor hasta que se restablece el flujo sanguíneo en el hígado trasplantado. Este periodo de isquemia normotérmica corresponde al tiempo empleado en realizar la anastomosis de los vasos sanguíneos hepáticos en la intervención quirúrgica. Al restablecerse el flujo sanguíneo en el órgano comienza la fase de reperfusión [47] (**Figura 7**).



**Figura 7.** Isquemia-Reperfusion en el trasplante hepático

Estos periodos de isquemia fría y caliente, y posterior reperfusión que tienen lugar en el trasplante hepático provocan la activación de toda una serie de mecanismos que dan lugar a la denominada lesión de I/R [58,59]. La gravedad de la lesión por I/R tiene que ver con la duración del procedimiento, tiempos de isquemia, episodios de hipotensión intraoperatorios y el grado de isquemia esplácnica. Además de lo anterior, la insuficiencia renal en el receptor, la realización de retrasplante, y la politransfusión se han considerado como factores de riesgo [45]. Las alteraciones metabólicas que tienen lugar durante el trasplante (aumento de lactato, citrato, hiperpotasemia, RLO, etc.) serán mayores cuanto peor sea la situación general del receptor, y podrían ser causa de disfunción hepática, ya que muchas de estas sustancias deben ser metabolizadas por el nuevo hígado. También puede ser causa de disfunción hepática los problemas técnicos intraoperatorios que ocasionan una isquemia normotérmica prolongada [60-65].

La lesión por I/R persiste como una complicación seria en la práctica clínica ya que está asociada con el riesgo de disfunción del injerto y fallo hepático después de la cirugía en el trasplante hepático; además de la insuficiencia pulmonar y del fallo multiorgánico que en ocasiones acompañan a estos cuadros [17,66,67]. Además, pese a los esfuerzos realizados por aumentar la donación de órganos y a pesar de las estrategias adoptadas que han permitido aumentar el número de órganos disponibles para ser trasplantados, éstas siguen siendo insuficientes para resolver el problema de la falta de órganos. El principal obstáculo para que las estrategias que tienen como objetivo aumentar el número de donantes sean más efectivas es la lesión por I/R. Las técnicas de trasplante hepático alternativas a la convencional conllevan un inherente periodo de I/R y con ello, sus posibles efectos adversos. Por otro lado, para que los órganos marginales puedan ser utilizados para trasplante en la clínica de manera rutinaria, sería necesario reducir el alto riesgo de disfunción o fallo que presentan los órganos marginales tras la intervención quirúrgica. Por lo tanto minimizar

los efectos adversos de la lesión por I/R podría aumentar el número de órganos disponibles para trasplante y el de pacientes que se recuperen exitosamente de un trasplante hepático. El primer paso para lograr este objetivo sería el completo entendimiento de los mecanismos implicados en la lesión por I/R [17,68].

### 3.3 Patofisiología de la lesión hepática por I/R

Si bien, en la literatura, la lesión por I/R se ha dividido en dos fases, la lesión causada por la isquemia y la lesión debida a la reperfusión, la separación de los eventos celulares que ocurren en cada fase no es absoluta, ya que el daño celular en el órgano hipóxico se acentúa después de la restauración del aporte de oxígeno, lo que sugiere que los eventos que suceden en la reperfusión, son la consecuencia de aquellos que se inician durante la isquemia. Además se ha visto que la reperfusión de un hígado expuesto a un periodo de isquemia breve no induce ningún daño detectable, un hallazgo indicativo de que la reperfusión por sí sola no es perjudicial [68].

- **Isquemia**

Durante la isquemia, se interrumpe el aporte de oxígeno al órgano y se detiene la cadena respiratoria mitocondrial, lo que comporta una depleción en los niveles de ATP. La degradación de ATP estimula la glucólisis anaeróbica con la consiguiente formación de ácido láctico y fallo en la homeostasis celular que se caracteriza por la pérdida de gradiente de los iones de sodio y de calcio a través de las membranas celulares. Estos fenómenos inducen una alteración en la permeabilidad e integridad de la membrana citoplasmática y de los orgánulos citoplasmáticos, lo cual produce edema intracelular y alteraciones en las células de Kupffer y células endoteliales, pudiendo desencadenar en la muerte celular [68].

- **Reperfusión**

La reperfusión (restablecimiento del flujo sanguíneo) del hígado previamente isquémico trae consigo dos procesos beneficiosos para el tejido isquémico, por una parte se restable el aporte de energía recuperando los niveles de ATP deplecionados durante la isquemia y por otra la eliminación de los metabolitos tóxicos formados durante la fase previa, que tienen repercusión a nivel sistémico y local. Desde este punto de vista, la reperfusión podría considerarse como un prerrequisito para la recuperación de la lesión isquémica. Se ha establecido que la lesión hepática causada por la reperfusión tiene lugar en dos etapas. La primera se iniciaría inmediatamente después de la reperfusión con una duración de entre 4 y 6 horas conocida como fase inicial o aguda, y después tendría lugar una segunda fase que se alargaría durante 2 ó 3 días, conocida como fase tardía o subaguda [69-72].

Tras la reperfusión se inicia toda una serie de fenómenos inflamatorios en los que están implicados múltiples mediadores de la inflamación, plaquetas, leucocitos y el endotelio vascular, los cuales al interactuar derivan en la lesión por reperfusión. A título de ejemplo, entre los mediadores

inflamatorios descritos en la lesión por I/R hepática destacan los RLO, interferón beta (IFN $\beta$ ), interferón gamma (IFN $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ ), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 12 (IL-12), interleuquina 18 (IL-18), leucotrieno B4 (LTB4), ácido 12-hidroxicosatraenoico (12-HETE), y el factor activador de plaquetas (PAF). Además, también se ha demostrado la participación de interleuquinas con propiedades antiinflamatorias tales como interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 13 (IL-13), e interleuquina 10 (IL-10). Los mediadores inflamatorios son modulados a nivel transcripcional. Estudios sobre transducción de señales en I/R hepática han descrito un papel notorio para diferentes factores de transcripción como factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), proteína activadora 1 (AP-1), receptor activador de la proliferación de peroxisomas alfa (PPAR $\alpha$ ), factor nuclear proteína de alta movilidad del grupo B1 (HMGB1), transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6), factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), y factor de transcripción de choque térmico (HSF). La lesión por reperfusión también implica a las quinasas intracelulares que activan factores de transcripción, como proteínas quinasa activadas por estrés (SAPK), quinasa c-Jun N-terminal (JNK) o proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK) [68].

La acumulación de neutrófilos está regulada por la participación tanto de citoquinas, factores del complemento, moléculas de adhesión y quimioquinas que permiten el reclutamiento, adhesión y transmigración de neutrófilos. Algunas moléculas de adhesión celular conocidas por su papel en I/R hepática comprenden E-selectina, P-selectina, L-selectina, integrinas  $\beta$ 1, integrinas  $\beta$ 2, molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1). De la misma manera, se ha sugerido la participación de quimioquinas, entre las que se han mencionado la interleuquina 8 (IL-8) y sus homólogos, el quimioatrayente de neutrófilos inducido por citoquinas 1 (CINC), la proteína activadora de neutrófilos derivada del epitelio 78 (ENA-78), la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP) 1 y 2, la quimioquina derivada de queratinocitos y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP) 1, 2, y 3 [68].

Por último, la disfunción microcirculatoria resulta de una serie de eventos que involucra la interacción de células intravasculares (por ejemplo neutrófilos) con células no parenquimales, (como las células endoteliales y las células de Kupffer) y que es mediada por la síntesis y liberación de moléculas de adhesión, citoquinas, factores del complemento, RLO, NO y endotelinas (ET) [68].

Lo anteriormente expuesto evidencia la multitud de mediadores y factores implicados en la lesión por I/R hepática. En la **Figura 8** se indican algunos de los mecanismos involucrados. Además, las interrelaciones entre las vías de señalización participantes son muy complejas y aún no es posible hablar con total certeza de los eventos que suceden desde que se inicia la reperfusión hasta que tiene lugar el malfuncionamiento o FPI hepático, pues las diversas investigaciones que abordan el tema no han logrado converger en sus resultados, tal vez en parte por la gran diversidad de modelos y diseños experimentales con los que se trabaja.



reperfusión. Finalmente, la teoría de la necroapoptosis postula que un proceso puede empezar con una señal común de muerte celular y culminar en muerte celular necrótica o en apoptosis, dependiendo de los niveles energéticos celulares.

- **Radicales libres de oxígeno**

Los radicales libres se definen como moléculas, átomos, o iones que contienen uno o más electrones desapareados en su estructura. Por ello son sustancias inestables y poseen una gran capacidad reactiva. Pueden captar o ceder electrones muy fácilmente, generando reacciones en cadena hasta dar lugar a compuestos más estables. La reacción de un radical libre con un no-radical puede generar un radical libre diferente que puede ser más o menos reactivo que el original. Como consecuencia, las reacciones producidas por los radicales libres provocan reacciones en cadena que pueden extender el daño considerablemente. Los radicales libres que contienen oxígeno se denominan radicales libres de oxígeno (RLO). Entre los RLO destacan: radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y el peroxinitrito ( $OONO^{\cdot}$ ). El  $H_2O_2$  no es estrictamente un RLO ya que no tiene un electrón libre, pero se considera junto con los RLO por su capacidad de formar radicales hidroxilo.

Los RLO pueden producir lesión a través de la modificación o daño a nucleótidos, carbohidratos o lípidos, pero parece que los efectos más nocivos se producen a través de su acción sobre las membranas celulares ya sea, a nivel de enzimas, receptores de membrana, mecanismos de transporte o modificando las propiedades de lípidos o proteínas de dichas membranas. También pueden desencadenar los procesos de peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados, afectando directamente las propiedades físicas de la membrana y provocando una depleción de estos ácidos grasos esenciales [73,74].

El estrés oxidativo que acompaña a la lesión por I/R hepática es la consecuencia de un desequilibrio entre sustancias pro-oxidantes y anti-oxidantes. Entre los mecanismos que generan sustancias pro-oxidantes destacan la generación mitocondrial, la generación por parte de los fagocitos y la del sistema xantina deshidrogenasa/xantina oxidasa (XDH/XOD). En cuanto a los sistemas antioxidantes se destaca la superóxido dismutasa (SOD) y el glutatión (GSH) como sistemas enzimáticos y no-enzimáticos respectivamente. En la lesión por I/R se ven afectados los sistemas antioxidantes que podrían eliminar los RLO. En este sentido la I/R provoca una disminución de los niveles de SOD y GSH, cosa que agrava aún más los efectos nocivos de los RLO.

Estudios realizados con inhibidores del sistema xantina/xantina Oxidasa (X/XOD) tales como el alopurinol, apuntaban a este sistema como el principal generador de RLO en hepatocitos implicándolo además en el daño pulmonar asociado al trasplante hepático. Por otro lado, otros resultados obtenidos en modelos experimentales de hígado perfundido aislado e isquemia normotérmica han puesto en tela de juicio la importancia del sistema X/XOD, e indican que la mitocondria podría ser la fuente principal de RLO. Sin embargo, algunos datos ponen en duda la

relevancia patofisiológica del estrés oxidativo intracelular (RLO generados por el sistema X/XOD o por las mitocondrias) durante la reperfusión. Datos obtenidos en un modelo murino de I/R normotérmica in vivo, constatan que la mitocondria no parece participar activamente en el estrés oxidativo inducido por la reperfusión. Además, otros estudios han demostrado que un aumento en el estrés oxidativo después de 30 y 60 minutos de isquemia fue atenuado a través de la inactivación de las células de Kupffer, pero no por una dosis alta de alopurinol. En la misma línea, otras investigaciones señalan que son los neutrófilos, o las células de Kupffer las principales fuentes generadoras de RLO. Sin embargo esta última hipótesis también se ha sometido a la controversia. De hecho, la eliminación de las células de Kupffer en el trasplante hepático no modificó los efectos nocivos de la I/R y los neutrófilos activados no son esenciales en el daño por reoxigenación [17].

La variedad de resultados respecto a los mecanismos de generación de RLO en la I/R hepática es clara. Con el objeto de clarificar la importancia del sistema X/XOD frente a la mitocondria, debe tomarse en cuenta las diferencias existentes en los modelos experimentales evaluados, incluyendo los tiempos de isquemia. De esta manera, el sistema X/XOD desempeña un papel crucial en el daño hepático por I/R solamente en condiciones en las cuales ocurre una formación importante de XOD, como por ejemplo a las 16 horas de isquemia fría. Sin embargo, este sistema de generación de RLO no parece ser crucial a periodos isquémicos más cortos tales como 6 horas de isquemia fría. Hay que tener en cuenta además, que incluso después de periodos prolongados de isquemia, en los cuales existe una relevante formación de XOD, esta enzima puede estar desempeñando un papel minoritario comparado con la mitocondria [17].

Por otro lado, también deben considerarse los fármacos usados para inhibir el sistema X/XOD, ya que, el alopurinol por ejemplo, parece tener más de un mecanismo de acción. El alopurinol no es solamente un inhibidor potente de la XOD, sino que también parece mejorar la disfunción mitocondrial inducida por la isquemia. De la misma manera, es de importancia señalar que la implicación de los hepatocitos y/o de las células de Kupffer como fuentes productoras de RLO depende del periodo de isquemia y de la temperatura (4°C y a 37°C) a la cual se somete el hígado durante la isquemia, lo cual probablemente conduce a diferentes mecanismos de lesión en la I/R [17].

- **Óxido nítrico**

El óxido nítrico (NO), es una molécula gaseosa que actúa como mensajero intra y extracelular, producida por una familia de enzimas llamadas NO-sintasas (NOS) que convierten la L-Arginina, en presencia de oxígeno, en L-citrulina. Se han caracterizados dos isformas del enzima: la forma constitutiva, dependiente de calciocalmodulina, y la forma inducible por citoquinas que es independiente del calcio. De la NOS constitutiva se han descrito dos tipos, una típicamente endotelial (eNOS) y la otra forma típicamente de origen neuronal (nNOS). De la forma inducible (iNOS), en cambio, sólo se ha encontrado una forma. Los tres tipos de NOS se expresan en el hígado, aunque parece que la nNOS no juega un papel relevante [75].

La eNOS se expresa de forma constitutiva en las células endoteliales arteriales y venosas del hígado, actuando como regulador del flujo sanguíneo. Aunque su expresión es constitutiva, y su actividad es dependiente de los niveles intracelulares de calcio, también se induce en respuesta a estímulos extracelulares como son la adenosina o la bradiquinina [76]. Por el contrario, la producción de NO derivado de la iNOS se determina a nivel transcripcional. Los estímulos principales para esta transcripción son las citoquinas inflamatorias, como son el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  o los lipopolisacárido (LPS) [77,78]. Se ha encontrado producción de NO derivado de iNOS en prácticamente todas las células hepáticas, incluidas las células de Kupffer, los hepatocitos o las células endoteliales cuando se ven sometidas a diferentes estímulos.

En la lesión por I/R es difícil establecer una distinción entre mediadores que ejercen efectos beneficiosos o perjudiciales. El NO ejerce un efecto beneficioso frente al daño por I/R en diferentes órganos, tejidos y células, mientras que otros estudios no destacan efecto alguno del NO, e incluso señalan una acción perjudicial de este mediador vasoactivo en el daño por I/R hepática. Estos efectos diferenciales del NO se pueden explicar por las diferencias en las enzimas productoras de NO, en los modelos experimentales de I/R hepática utilizados y en la dosis y el tiempo en que se administran los diferentes moduladores farmacológicos de NO [17].

En este contexto, algunos estudios sugieren que aunque la producción de eNOS tendría efectos beneficiosos en I/R hepática, la producción de iNOS, podría contribuir al daño hepático. El NO derivado de la isoforma eNOS, puede disminuir los desórdenes de la microcirculación durante las primeras horas de reperfusión. En contraste, el NO derivado de la iNOS no puede ser generado hasta varias horas después de la reperfusión debido a que esta isoforma requiere inducción transcripcional. El exceso en la producción de NO derivada de la iNOS puede ser perjudicial porque puede reaccionar con los RLO produciendo OONO<sup>-</sup> una molécula altamente oxidativa que puede conducir a peroxidación de los lípidos de membrana, daño hepático y muerte celular. Además, hay estudios que proponen que el NO derivado de la iNOS induce la liberación de citocromo c y de caspasas favoreciendo los procesos pro-apoptóticos. Sin embargo, también existen controversias en relación al papel del NO derivado de la iNOS ya que otros investigadores han sugerido que el NO derivado de la iNOS es beneficioso porque induce la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 e inactiva caspasas [17].

Además, para entender los diferentes resultados en relación al papel del NO en la lesión por I/R hepática, es importante clarificar si la fuente de NO es endógena o exógena. En este sentido, mientras que se ha demostrado que el NO endógeno puede reducir la acumulación de neutrófilos, la suplementación exógena de NO no modificó este parámetro pero se asoció con una inhibición en la producción de ET [17].

- **Acumulación de neutrófilos**

La activación de neutrófilos está implicada en la disfunción microvascular y el daño parenquimal asociado a la I/R hepática. Actualmente, se desconoce cómo se acumulan los neutrófilos en el

hígado. La teoría clásica propone que el aumento en la expresión de moléculas de adhesión, tales como ICAM-1 y P-selectina son primordiales para la acumulación de neutrófilos y el consiguiente daño hepático asociado a la I/R. Oponiéndose a esta teoría, también hay resultados que demuestran que la acumulación de neutrófilos observada en el hígado después de la I/R no depende de la sobre-expresión de ICAM-1 o P-selectina [17,79].

Para explicar si la acumulación de neutrófilos depende o no de las moléculas de adhesión, hay que tener en cuenta la teoría propuesta por Jaeschke. Esta teoría propone que aunque la P-selectina y el ICAM-1 parecen ser relevantes en la adherencia de los neutrófilos en las vénulas postsinusoidales; la acumulación de neutrófilos en los sinusoides no depende de integrinas B2, de ICAM-1, ni de selectinas. En estos sinusoides, los neutrófilos se acumulan gracias a factores mecánicos como la vasoconstricción, el daño y el edema de las células que forman la pared vascular, y una reducida flexibilidad de la membrana del neutrófilo sin la necesidad de un aumento en la expresión en las moléculas de adhesión [17,79].

En la etapa de reperfusión, si el daño vascular es considerable, se elimina la barrera de células endoteliales y los neutrófilos tienen entonces acceso directo a los hepatocitos. Sin embargo, si las células endoteliales están dañadas pero aún están presentes, puede requerirse entonces la transmigración. En estas condiciones, terapias anti-ICAM pueden reducir pero no previenen la lesión por I/R. Respecto al papel de la P-selectina, las células endoteliales no contienen cuerpos de Weibel Palade ni tampoco sobrerregulan transcripcionalmente niveles importantes de P-selectina. Por otra parte, durante la I/R, un cierto número de intervenciones dirigidas contra las selectinas reducen la acumulación hepática de neutrófilos y el daño celular. La causa de estos hallazgos no puede ser debido a una reducción del “rolling” dependiente de P-selectina en los sinusoides. Y para explicarlo, se ha sugerido que la mayoría de los modelos de I/R hepática incluyen algún grado de isquemia intestinal, la cual conduce a la acumulación de neutrófilos en órganos remotos incluyendo al hígado. Así, pues el bajo número de neutrófilos en el hígado tras el bloqueo farmacológico de las selectinas puede ser un efecto secundario debido a la protección que ejerce la terapia anti-selectina en el daño intestinal por reperfusión [17,79].

- **Citoquinas**

Las citoquinas son un grupo de proteínas no estructurales reguladas a nivel transcripcional y producidas por una amplia variedad de células en respuesta a diferentes estímulos, que promueven y regulan la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Actúan sobre diferentes tipos celulares, y a menudo, tienen efectos diferentes sobre la misma célula diana. Inician su acción al unirse a receptores específicos de la membrana de la célula diana. La célula diana sobre la que actúan puede ser la misma célula que secreta la citoquina (acción autocrina), una célula próxima (acción paracrina) o bien una célula distante a la que llega a través de la circulación (acción endocrina). La expresión de los receptores de las citoquinas está regulada por citoquinas, que permiten la amplificación positiva o retroalimentación negativa.

En un proceso de I/R hepática se encuentran implicadas numerosas citoquinas que modulan la respuesta inflamatoria. Entre estas citoquinas se encuentran la IL-10, que es una citoquina anti-inflamatoria producida por linfocitos y macrófagos, que modula la respuesta de otras citoquinas y quimoquinas en diversos modelos de inflamación. Se sabe que la IL-10 suprime la activación de los macrófagos, mediante la inhibición de la síntesis de citoquinas proinflamatorias y de la generación de RLO, durante la fase aguda de la inflamación. En diferentes modelos de I/R hepática se ha observado que existe liberación de IL-10, y se piensa que ésta puede tener un papel esencial en la supervivencia de los animales [80,81]. La administración de IL-10 reduce la lesión hepática de I/R asociada al trasplante [82].

Otra citoquina implicada en la I/R hepática es la IL-6. Algunos autores han observado que el daño por reperfusión disminuye al administrar IL-6 recombinante o se agrava en ratones deficientes en IL-6 [83,84]. Su liberación está asociada con el inicio de la respuesta regenerativa del hígado [85]. Por otro lado, la IL-6 puede tener efectos anti-inflamatorios regulando el mRNA de TNF- $\alpha$  durante la reperfusión [83].

Las citoquinas que también tienen un papel relevante en la lesión local asociada a la I/R hepática son el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ , ambas con potentes acciones pro-inflamatorias. Ambas inducen la síntesis de quemoquinas como la IL-8 y regulan la expresión de moléculas de adhesión, favoreciendo la acumulación de neutrófilos. Además se ha observado en diferentes modelos de I/R que ambas citoquinas están implicadas en la producción de RLO; y que el TNF- $\alpha$  bajo determinadas circunstancias puede inducir directamente la muerte de los hepatocitos por apoptosis [86-88]. Por otra parte, hay que tener en cuenta que en la I/R hepática, el TNF es protector o perjudicial dependiendo del tipo celular y de las condiciones experimentales o patológicas. Por ejemplo, se ha constatado el papel clave del TNF en procesos de regeneración hepática, inherente en resecciones hepáticas y en el trasplante hepático con injertos de tamaño reducido (trasplante pediátrico y de donante vivo).

- **NF $\kappa$ B**

Los efectos diferenciales en los mediadores inflamatorios, explicados hasta el momento, se pueden extrapolar también a los factores de transcripción implicados en la lesión por I/R hepática. A título de ejemplo, el NF $\kappa$ B puede regular diferentes vías de señalización y por ello tiene el potencial de ser tanto pro- como anti-apoptótico. Actualmente no está claro si en la I/R hepática, los efectos beneficiosos del NF $\kappa$ B frente a la apoptosis prevalecen o no frente a su papel perjudicial en la inflamación. La inhibición del NF $\kappa$ B en I/R hepática reduce la acumulación de neutrófilos y el daño hepatocelular. Estos datos sugieren la implicación del NF $\kappa$ B en la respuesta inflamatoria asociada a la I/R hepática. Sin embargo, otros resultados evidencian que la activación de NF $\kappa$ B es primordial en la regeneración hepática, reduce la apoptosis y el daño por I/R asociado al trasplante hepático [17].

- **MAPKs**

Las MAPKs que incluyen la proteína quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK 1/2), la p38 MAPK y la JNK, convierten estímulos extracelulares en señales intracelulares [89].

En el contexto de la lesión hepática por I/R, numerosos estudios apuntan que la activación de p38 MAPK y JNK induce apoptosis y necrosis [89-95]. Sin embargo, otras investigaciones indican que la activación de las MAPKs aumenta la tolerancia de los hepatocitos y las células endoteliales frente al insulto isquémico [96-99]. Por otro lado, aunque la activación de la ERK 1/2 se asocia a proliferación celular, también existen estudios que indican su implicación en el daño hepático por I/R [100,101]. Estas diferencias en el papel de las MAPKs en la lesión por I/R hepática dependen de las condiciones experimentales de estudio y de las isoformas de MAPKs que se activan tras la I/R ya que pueden tener efectos totalmente opuestos [98].

- **Muerte celular**

Además de los diferentes resultados encontrados en la literatura sobre el papel de los mediadores inflamatorios implicados en la lesión por I/R y sus mecanismos de acción, también existen controversias en el tipo de muerte celular asociada a la I/R hepática. Algunos investigadores han evidenciado que la mayor parte del daño parenquimal es causada por alteraciones necróticas masivas. En contraste, otros autores han demostrado que la inhibición específica de la apoptosis previene el daño parenquimal y aumenta la supervivencia tras periodos prolongados de isquemia. Si bien durante mucho tiempo se ha asumido que la muerte celular necrótica y apoptótica son procesos diferentes, esta suposición puede no ser válida actualmente [17,79]. A continuación se resume brevemente la información básica acerca de las vías de señalización de muerte celular en los hepatocitos, con el propósito de entender la vía común que conduce tanto a necrosis como a apoptosis.

La apoptosis ocurre a través de dos vías principales. La primera, referida como vía intrínseca (mitocondrial), es activada por una variedad de factores de estrés como por ejemplo, daño al DNA, activación de p53, deprivación de factores de crecimiento, o desórdenes metabólicos. La segunda, es la vía extrínseca que se activa a través de receptores de muerte celular (**Figura 9**). Es bien conocido que uno de los más importantes reguladores de la vía intrínseca es la familia de proteínas Bcl-2. La familia Bcl-2 incluye miembros pro-apoptóticos tales como Bax, Bak, Bad, Bid y miembros anti-apoptóticos como Bcl-2, Bcl-Xl y Bcl-W. Tras la señal de muerte celular, las proteínas pro-apoptóticas sufren modificaciones post-transcripcionales que derivan en su activación y traslocación a la mitocondria. Entonces, la membrana mitocondrial exterior se vuelve permeable, conduciendo a la liberación de Citocromo C, el cual promueve la activación de la Caspasa 9, que a su vez activa a la caspasa 3, desencadenando finalmente la apoptosis [17,79].

En la vía extrínseca, una variedad de mediadores incluyendo TNF- $\alpha$ , ligando Fas, y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) se unen a sus respectivos receptores de muerte

celular, lo cual causa oligomerización del receptor y la asociación de varias proteínas adaptadoras, incluyendo la proteína de dominio de muerte asociada a Fas, la proteína de dominio de muerte asociada al receptor de TNF- $\alpha$ , y el factor asociado al receptor de TNF- $\alpha$ . La proteína de dominio de muerte asociada a Fas y la proteína de dominio de muerte asociada al receptor de TNF- $\alpha$  promueven la activación proteolítica de la procaspasa 8 para convertirse en Caspasa 8 con actividad catalítica. En hepatocitos la caspasa 8 interactúa con la vía intrínseca y rompe Bid, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2, generando la forma tBid, la cual se transloca a la mitocondria, causando permeabilización mitocondrial y liberación de los efectores mitocondriales de apoptosis, tales como citocromo c [17].

En los hepatocitos la señalización dependiente de TNF- $\alpha$  y de Fas induce el inicio de la transición a la permeabilidad mitocondrial (MPT). La MPT ocurre a partir de la apertura de un poro en la membrana interior mitocondrial, conocido como poro de transición a la permeabilidad. La MPT conlleva a edema mitocondrial, ruptura de la membrana exterior mitocondrial, y liberación del Citocromo C y otras proteínas mitocondriales [17,79].

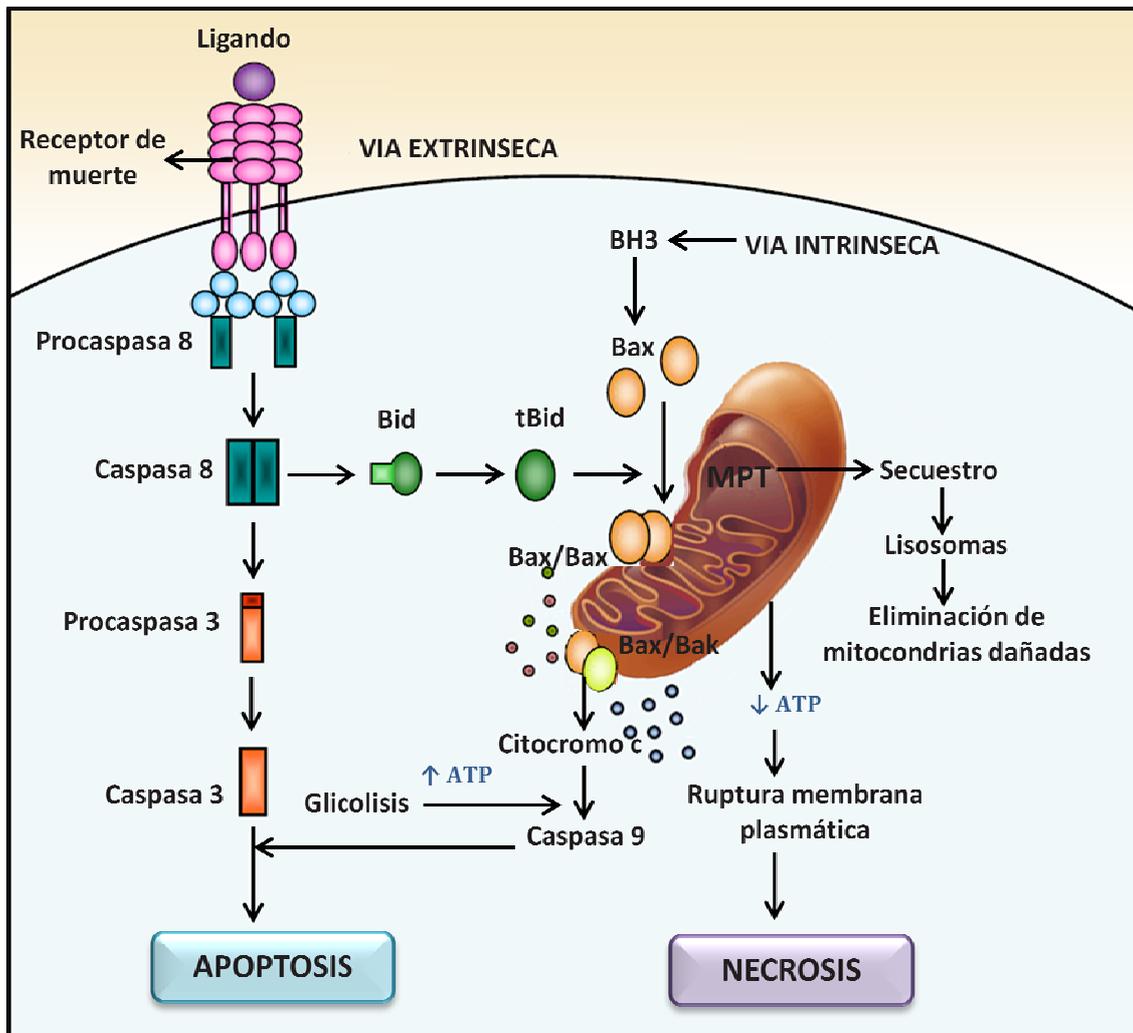


Figura 9. Necrosis y Apoptosis en la I/R hepática.

Se pueden considerar otros mecanismos de liberación del Citocromo C. En algunos modelos experimentales, la interacción de tBid con Bax o Bak, forma canales en la membrana mitocondrial exterior liberando citocromo c y otras proteínas. Siempre que el ATP se encuentre disponible a partir de la glicólisis y haya mitocondrias aun intactas, el citocromo c activa caspasas y otras enzimas ejecutoras de apoptosis. Si el daño en las mitocondrias y la depleción de ATP es considerable, se bloquea la activación de las caspasas y culmina con la ruptura de la membrana plasmática y el inicio de la muerte celular por necrosis (**Figura 9**). Así pues, el término “Necrapoptosis” se utiliza para describir un proceso que empieza con una señal de muerte celular común y el cual culmina ya sea en lisis celular (muerte celular necrótica) o en reabsorción celular programada (apoptosis), dependiendo de factores tales como la disminución de los niveles celulares de ATP [17,79].

## 4. El hígado esteatósico

### 4.1 Definición y prevalencia

Un hígado normal (sin esteatosis), posee aproximadamente un contenido de grasa de un 5% de su peso total, siendo los fosfolípidos las grasas más abundantes, y en menor medida triglicéridos y colesterol no esterificado. La acumulación de grasa es considerada patológica cuando el contenido de grasa hepática, consistente principalmente en triglicéridos, excede el 5% del peso del hígado. En un hígado esteatósico la grasa se acumula en el citoplasma de los hepatocitos y en el de las células endoteliales de los sinusoides hepáticos. Así pues, la esteatosis hepática se puede caracterizar cuantitativamente y cualitativamente [102]. La evaluación cuantitativa se basa en el porcentaje de hepatocitos que muestran vacuolas lipídicas en su citoplasma. Normalmente se clasifica como leve cuando menos de un 30% de los hepatocitos contienen grasa, moderada si contienen grasa entre un 30% y un 60% de los hepatocitos, y severa si contienen vacuolas lipídicas más de un 60% de los hepatocitos. La evaluación cualitativa divide la esteatosis en dos tipos: macrovesicular, cuando los hepatocitos contienen una única vacuola de gran tamaño que suele desplazar el núcleo del hepatocito hacia la periferia, y microvesicular, si el hepatocito contiene múltiples vacuolas pequeñas de grasa en el citoplasma. Las circunstancias más habituales asociadas a esteatosis hepática son la obesidad, la diabetes tipo II, la ingesta de alcohol, la alimentación parenteral, enfermedades metabólicas y ciertos tipos de hepatitis infecciosas [103]. La esteatosis hepática es la enfermedad crónica del hígado más común en el mundo y afecta a todos los grupos raciales, étnicos y de edad. Varios estudios han reportado una prevalencia del 10% al 20% de esteatosis en la población delgada, 60% a 74% entre la población obesa y más de 90% en los obesos mórbidos. Aproximadamente 3% de los niños delgados están afectados y la prevalencia se incrementa hasta un 53% entre los niños obesos. Se espera que la prevalencia de esteatosis hepática en la población, se incremente dramáticamente en un futuro cercano debido al aumento de la obesidad entre la población de los países occidentales [102].

## 4.2 Implicación de la esteatosis hepática en la cirugía hepática

El hígado esteatósico supone un riesgo añadido en la cirugía hepática ya que estos hígados toleran peor que los no esteatósicos la lesión por I/R. La esteatosis hepática es un hallazgo histológico común en biopsias de hígado humano, y se estima que más del 20% de los pacientes programados para resección hepática presentan algún grado de esteatosis [102]. La esteatosis hepática en las resecciones está asociada a deficientes resultados post-operatorios, caracterizados por una vulnerabilidad a la lesión por I/R y a un fallo en la regeneración hepática [104,105].

En posibles donantes de hígado, la prevalencia de esteatosis hepática es del 26% [49]. La presencia de esteatosis moderada aumenta la incidencia de fallo primario y disminuye la supervivencia del paciente después de un trasplante hepático [102]. Sin embargo, en muchos casos es necesario recurrir a estos injertos debido a que el aumento en la demanda de órganos para trasplante no puede cubrirse con hígados en estado óptimo para ser trasplantados. Además, la esteatosis hepática agrava el problema de la falta de órganos ya que se sabe que entre todos los hígados que no son aptos para trasplante por sus condiciones patológicas, más del 50% son hígados esteatósicos, de ahí que la esteatosis sea la causa del mayor número de órganos no aptos para trasplante, acentuando así la problemática del banco de órganos [49,68]. Debido al aumento de la obesidad en la población, se espera por tanto que la prevalencia de esteatosis aumente igualmente y por lo tanto en la cirugía hepática, haciendo evidente una vez más la necesidad de desarrollar estrategias protectoras para minimizar los efectos adversos de la lesión por I/R en los hígados esteatósicos. Esto disminuiría por lo tanto el riesgo de disfunción o fallo primario tras la cirugía hepática y se aumentaría el número de injertos disponibles para ser trasplantados. Para lograrlo, es imprescindible el estudio de los mecanismos que conducen a la mayor susceptibilidad de un hígado esteatósico ante la lesión por I/R.

## 4.3 Lesión por I/R en el hígado esteatósico

Como se ha mencionado anteriormente, los hígados esteatósicos toleran peor que los no esteatósicos la lesión por I/R [17,49,79,103]. Sin embargo, las causas de la mayor susceptibilidad de los hígados esteatósicos frente a la lesión por I/R no están totalmente definidas. La literatura recoge como posibles causas los eventos que se describen a continuación.

- **Alteraciones en la microcirculación**

Las alteraciones en la microcirculación se han propuesto como un factor importante en la tolerancia reducida de los hígados grasos a la lesión por I/R. La acumulación de grasa en el citoplasma de los hepatocitos está asociada con un aumento en el volumen celular, que puede resultar en una obstrucción parcial o total del espacio sinusoidal hepático, causando un aumento en la resistencia intraportal hepática y una disminución del flujo sanguíneo que reciben los hepatocitos con infiltración grasa [106]. En humanos y modelos animales se ha demostrado que en el hígado graso se produce una disminución de aproximadamente el 50% del flujo sanguíneo sinusoidal, respecto a

los hígados normales lo que podría inducir un estado de hipoxia crónica [107-112]. Esta disminución en el flujo sanguíneo se debe al aumento de tamaño de los hepatocitos debido a la presencia de vacuolas lipídicas en su citoplasma y a un estrechamiento de la luz sinusoidal que conlleva una inadecuada perfusión con las soluciones de preservación durante la extracción del hígado. La luz sinusoidal se ve además afectada por la liberación de glóbulos de grasa (susceptibles de sufrir peroxidación) durante la preservación del injerto y por pequeños trombos de fibrina y elementos celulares que están en la sangre después de la reperfusión [109-112]. Estas alteraciones en la microcirculación podrían amplificar los efectos negativos producidos por la I/R; de esta forma, el edema celular y la adherencia de leucocitos que ocurre durante una I/R en combinación con la reducción del espacio sinusoidal pueden contribuir a causar una lesión hepática grave.

- **Peroxidación lipídica**

Estudios realizados en ratas Zucker sometidas a isquemia normotérmica indican que los hígados esteatósicos presentan menos tolerancia frente al estrés oxidativo con respecto a los hígados no esteatósicos [113]. En diferentes modelos de hígado graso sometidos a isquemia normotérmica o a trasplante hepático se muestra que la mayor susceptibilidad de los hígados esteatósicos frente a la lesión por I/R puede deberse a la elevada sensibilidad de este tipo de hígado a los RLO [113-118]. Durante la reperfusión la generación mitocondrial de RLO aumenta considerablemente, esto conduce a que las estructuras mitocondriales se vean expuestas al ataque de los RLO generados tanto fuera como dentro de estos orgánulos, conduciendo eventualmente a la disfunción mitocondrial y al fallo en la síntesis de ATP [118-120]. Es bien conocido que los hígados esteatósicos sintetizan menos ATP tras la reperfusión [118]. Además, diversos estudios muestran que durante la reperfusión se produce un aumento en la peroxidación lipídica en los hígados esteatósicos, con respecto a los hígados no esteatósicos. La causa de este aumento en la peroxidación lipídica podría ser debido a que en los hígados esteatósicos hay una mayor cantidad de sustrato fácilmente oxidable [121]. En condiciones basales, los sistemas antioxidantes del hígado son suficientes para contrarrestar la peroxidación lipídica que se produce en el hígado. Sin embargo, en hígados esteatósicos sometidos a I/R, la peroxidación de lípidos se ve muy incrementada y los sistemas antioxidantes del hígado se ven sobresaturados. La disminución de fosfolípidos como consecuencia de la peroxidación lipídica conduce a la alteración de la membrana plasmática [122]. Además los productos de la peroxidación lipídica, como por ejemplo el malondialdehído, podrían actuar como atrayentes de neutrófilos e inducir necrosis celular [123,124].

Diversos trabajos se han enfocado en minimizar el estrés oxidativo al que son sometidos los hígados esteatósicos [114,116,117]. Algunos de estos estudios en ratas Zucker obesas, modelo bien caracterizado de obesidad inducida por dieta, indican que la administración de tocoferol, que tiene propiedades antioxidantes, aumenta la tolerancia del hígado esteatósico a la isquemia caliente. Por otro lado, estudios experimentales en hígados esteatósicos inducidos mediante dieta deficiente en colina-metionina, mostraron que la administración de precursores de GSH, como la N-acetilcisteína, pueden ayudar a restaurar la integridad hepatocitaria en los hígados esteatósicos pero

sin bloquear los RLO. Además, en hígados esteatósicos inducidos por una dieta rica en grasa o por exposición al alcohol, se producen RLO insensibles a la SOD y catalasa y que están implicados en la vulnerabilidad de este tipo de hígados a la lesión por I/R [114,116-118].

Las dificultades encontradas en las terapias basadas en el tratamiento con antioxidantes para reducir los efectos nocivos de los RLO en hígados esteatósicos también han sido evidenciadas cuando se utilizan donadores de NO [124, 125]. La administración de NO exógeno en un modelo experimental de trasplante hepático protegió el injerto no esteatósico mientras que en el injerto esteatósico el tratamiento con NO exógeno tuvo efectos negativos sobre la lesión hepática y estos pueden ser explicados por la formación de OONO<sup>-</sup> debido a la mayor presencia de RLO en los hígados esteatósicos [125].

- **Acumulación de neutrófilos**

La presencia de infiltración grasa en el hígado produce alteraciones en la fluidez de las membranas debido a la menor presencia de colesterol y de ácidos grasos poliinsaturados en las mismas [126]. La alteración en las membranas del endotelio sinusoidal de los hígados grasos, junto con el mayor deterioro que sufren las células endoteliales tras la isquemia fría en este tipo de hígado, podría derivar en un aumento en la adhesión y activación de los neutrófilos en la reperfusión, y por tanto a un aumento de la infiltración de neutrófilos en el tejido hepático [126-128].

Se ha reportado la implicación de los neutrófilos en la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos frente a la lesión por I/R hepática especialmente en hígados grasos inducidos por alcohol; sin embargo, en otros modelos de esteatosis hepática los neutrófilos no parecen ser los responsables de la menor tolerancia que presentan los hígados grasos a la I/R [113,128-130]. En este sentido, se observó la misma acumulación de neutrófilos en hígados esteatósicos y sin infiltración grasa en ratas Zucker sometidas a I/R hepática normotérmica. Esto se confirmó también en otros modelos de esteatosis hepática tales como el inducido por la ingesta de una dieta rica en colesterol [131,132]. En un modelo experimental de trasplante hepático en ratas Zucker se ha demostrado que el bloqueo de integrinas y selectinas, moléculas implicadas en la adhesión de los neutrófilos al endotelio sinusoidal, redujo la lesión hepática y aumentó la supervivencia de las ratas tras el trasplante hepático [133-135].

- **Activación de las células de Kupffer**

En los hígados grasos, se ha demostrado un aumento en el número y en la actividad fagocítica de las células de Kupffer, lo cual puede contribuir a aumentar la lesión por I/R en ese tipo de hígado [109]. Las células de Kupffer producen sustancias capaces de modular el flujo sanguíneo sinusoidal y son una fuente muy importante de RLO y citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  y el IL-1 durante la etapa de reperfusión. Se ha demostrado la implicación de las células de Kupffer en la lesión por I/R asociada al trasplante hepático, ya que la administración de cloruro de gadolinio, un inhibidor de la activación de las células de Kupffer, produjo un descenso en los parámetros de lesión hepática y aumentó en la producción de bilis y la supervivencia tras el trasplante [136].

- **Metabolismo energético**

Diversos estudios muestran que tras varias horas de isquemia normotérmica o fría los hígados esteatósicos presentan una depleción de los niveles de ATP mayor que la sufrida por los hígados no esteatósicos [137,138]. Por el contrario, en otros estudios llevados a cabo en un modelo de isquemia hepática normotérmica se observaron niveles semejantes de ATP en ambos tipos de hígados durante la isquemia. Por otro lado, se observó que tras la reperfusión, los hígados esteatósicos presentaban una recuperación del metabolismo energético más lenta [51]. Según estos datos, la esteatosis no afecta directamente al metabolismo energético de los hepatocitos durante la isquemia, pero reduce la capacidad de las mitocondrias de generar ATP al iniciarse la reperfusión tanto en la isquemia normotérmica como en la isquemia fría [127,137,139-145]. Diversos autores postulan que la presencia de grasa en el hepatocito produce diversas alteraciones en las mitocondrias que se hacen mucho más evidentes tras un proceso de I/R y que dan lugar a la sobreproducción de RLO y a un significativo deterioro del metabolismo energético tras el trasplante, siendo ambos factores responsables de la poca tolerancia que presentan los hígados esteatósicos a la lesión por I/R [127,137,141,146,147].

- **Mecanismo de muerte celular**

Una característica clave del daño isquémico en el hígado no esteatósico es la apoptosis, una forma activa de muerte celular que requiere energía y no está asociada a inflamación. El porcentaje de hepatocitos apoptóticos después de la I/R se correlaciona con el daño hepático y con la supervivencia de los animales de experimentación [49,114,138,148,149]. Además, varias estrategias antiapoptóticas han demostrado ser altamente protectoras frente al daño isquémico en hígados no esteatósicos [114]. Por otro lado, se ha demostrado que los hígados esteatósicos presentan alteraciones en la vía de señalización que conduce a apoptosis. Estudios realizados en ratas de la cepa Zucker han señalado que los hígados esteatósicos sometidos a I/R normotérmica presentan un grado reducido y un retraso en el desarrollo de la apoptosis en comparación con hígados no esteatósicos en las mismas condiciones. En cambio, se produce una necrosis masiva en los hígados esteatósicos, y un mínimo de necrosis en los hígados no esteatósicos. En la necrosis se produce rotura inespecífica de los orgánulos celulares y de la membrana citoplasmática y conlleva la liberación del contenido citoplasmático que contribuye a agravar la lesión inflamatoria hepática [49,104,150]. En consonancia con lo anterior, estrategias terapéuticas basadas en la inhibición de la apoptosis, que reducen el daño isquémico en hígados no esteatósicos, no son capaces de proteger en presencia de esteatosis [17,79,114]. El hecho de que se produzca uno u otro tipo de muerte celular podría estar asociado, entre otros factores, con la disponibilidad de ATP de la célula, ya que la apoptosis es un proceso dependiente de ATP. El deterioro del metabolismo energético que presentan los hígados grasos tras la I/R hepática podría explicar el fallo de la apoptosis en este tipo de hígados y el predominio de la lesión por necrosis como forma de muerte celular [49, 104,150].

Las diferencias en los mecanismos de muerte celular y en los mecanismos implicados en la lesión por I/R en hígados esteatósicos con respecto a los hígados no esteatósicos, explican las dificultades

para prevenir efectivamente la lesión por I/R en los hígados esteatósicos. De esta manera, estrategias terapéuticas o dosis de fármacos que son efectivas en hígados no esteatósicos pueden no serlo en presencia de esteatosis.

## 5. Estrategias terapéuticas para disminuir la lesión por I/R

A pesar de los avances en las soluciones de preservación, en los tratamientos farmacológicos y de terapia génica y en estrategias quirúrgicas que han tenido como objetivo el disminuir la lesión por I/R asociada al trasplante hepático, los resultados hasta el momento no han sido concluyentes. Algunas de estas estrategias terapéuticas, como es el caso del preconditionamiento isquémico, ejercen sus mecanismos de acción sobre una multitud de vías de señalización celular induciendo así una mayor tolerancia del tejido a la I/R; mientras que otras interfieren directamente en alguna de las vías responsables de la lesión de I/R inhibiendo alguna de las moléculas implicadas o potenciando una posible vía protectora.

### 5.1 Soluciones de preservación

Una de las primeras estrategias aplicadas para reducir la lesión de I/R fue la reducción de la actividad metabólica por enfriamiento del órgano a 2-4°C. El enfriamiento implica la utilización de soluciones de preservación, por lo que muchas estrategias se han encaminado a mejorar las soluciones de preservación para extender el periodo de preservación y para reducir los efectos negativos de la hipotermia sobre el órgano. Desde su introducción por Belzer et al. a finales de los 80s, la solución UW se ha convertido en la más utilizada en la práctica clínica para la preservación de la mayoría de los órganos en trasplante. La diferencia de esta solución con las restantes es que no contiene glucosa lo cual evita la producción de lactato y los problemas de acidosis, en cambio contiene adenosina que inhibe la agregación plaquetaria, la acumulación de neutrófilos, y es un substrato para la síntesis de ATP, y contiene antioxidantes como GSH y alopurinol para evitar los efectos nocivos de los RLO. La introducción de la solución de la UW supuso un avance importante en la preservación de órganos y con su utilización se logró alargar el tiempo de isquemia. La inclusión de algunos componentes en la solución UW ha sido tanto defendida como criticada. Por ejemplo, variantes simplificadas de la solución UW en las cuales se ha omitido la adenosina han mostrado tener potencial protector similar o aun mayor durante la preservación fría del hígado. Otra de las limitaciones de la solución de UW es la presencia de hidroxietilamidón, que previene el edema intersticial pero también es un proagregante de glóbulos rojos que puede producir un lavado incompleto del injerto hepático con el consiguiente éstasis venoso y respuesta inflamatoria. Además de lo anterior, muchas de las sustancias que se encuentran en la solución UW (alopurinol, lactobionato) no protegen bien por no estar en concentraciones adecuadas o por tener dificultades para llegar al sitio de acción. De hecho, hay estudios en humanos indicando que a pesar de la presencia de alopurinol en UW, este antioxidante no ha logrado frenar los efectos nocivos del sistema generador de RLO, X/XOD [17,79].

Existen alternativas a la solución de preservación UW. Por ejemplo, la solución Histidina-Triptófano-Cetoglutarato (HTK) presenta una viscosidad más baja que la UW y omite el almidón en su composición. Esto permite un mejor lavado inicial del órgano más rápido durante la recuperación del órgano, resultando en un enfriamiento más rápido y en un mejor lavado del órgano para eliminar más eficazmente los glóbulos rojos del órgano a trasplantar. En un ensayo clínico aleatorio, se comparó a la solución UW con la solución HTK en trasplante hepático con injertos procedentes de donante cadavérico y se observaron parámetros similares función hepática y de supervivencia del receptor. Además, en este estudio la incidencia de complicaciones fue significativamente mayor en los hígados preservados en HTK. La solución de preservación de Celsior tiene una composición más alta en sodio y más baja en potasio y omite el almidón en su composición. El bajo contenido en potasio disminuye la hiperpotasemia tras la reperfusión del órgano y al no contener almidón su viscosidad es muy baja. La comparación entre la solución UW y la solución Celsior ha mostrado resultados similares en cuanto a eficacia y seguridad para la preservación de injertos hepáticos. Una solución UW-Polietilenglicol (PEG) llamada Instituto George Lopez (IGL-1) combina la inversión de la concentración de los iones  $K^+$  y  $Na^+$  y la sustitución del hidroxietilamidón por PEG. Con esta solución de preservación, se ha demostrado una mejora en la microcirculación y una reducción en el daño hepático por I/R en trasplante hepático experimental; sin embargo la superioridad de esta solución todavía no ha sido claramente demostrada en humanos [151,152].

Con la finalidad de reducir el daño que sufre el injerto hepático durante su preservación fría, se han introducido una variedad de ingredientes en la solución de preservación UW, con resultados prometedores: el análogo estable de la protaciclina (PGI<sub>2</sub>) OP-4183, el inhibidor de la p38 MAPK FR167653, el donador de ON nitroprusiato de sodio, el antagonista del PAF E5880, inhibidores de la calmodulina, bloqueadores de los canales de  $Ca^{+2}$  tales como nisoldipina, factores tróficos, inhibidores de la calpaína o de caspasas, S-adenosilmetionina (SAM), insulina, o fructosa 1,6-bifosfato (FBP). Sin embargo, ninguna de estas modificaciones en la composición de la solución UW ha llegado a su aplicación rutinaria en la práctica clínica. La adición de inhibidores de caspasas en la solución UW previene la apoptosis de las células endoteliales pero tuvo poco efecto sobre la necrosis, forma predominante de muerte celular en los hígados esteatósicos. En línea con lo anterior, la adición de precursores para la resíntesis de ATP tales como SAM, resultó en una recuperación inicial pobre de ATP durante la reperfusión hepática. La insulina y el FBP han sido recomendadas y añadidas a la solución de preservación UW con el objetivo de estimular la glicólisis y modular la actividad de las células de Kupffer, respectivamente. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que estas modificaciones en la solución UW podría exacerbar el daño isquémico del injerto y disminuir la tasa de supervivencia del injerto en trasplante hepático experimental [17,79].

En la **tabla 2** se incluyen algunos de los aditivos empleados en las soluciones de preservación en los últimos 5 años, como estrategia empleada en modelos experimentales a si como en la práctica clínica para proteger al hígado frente a la lesión por I/R.

ADITIVOS PARA SOLUCIONES DE PRESERVACIÓN				
Fármaco o Aditivo	Especie	Modelo Experimental	Tiempo de Isquemia	Efecto
APC [153] <i>Proteasa sérica anticoagulante</i>	Rata	Isquemia fría	2,6,20 horas	↓ Daño hepático, apoptosis, ácido hialurónico, IL-6, TNF- $\alpha$ , ET-1, infiltración de neutrófilos y macrófagos ↑ Supervivencia y microcirculación hepática
Carvedilol [154] <i>Antioxidante y bloqueador-<math>\beta</math></i>	Rata	Isquemia fría	24 horas	↓ Daño hepático, desórdenes microcirculatorios, ATP, estrés oxidativo y daño mitocondrial
EGF, IGF-1 [155] <i>Factores de crecimiento</i>	Rata	Isquemia fría	24 horas	↓ Daño hepático y necrosis
Oxycyte [156] <i>Perfluorocarbono</i>	Rata	Isquemia fría	8 horas	↓ Daño hepático
Peg-Alb [157] <i>Polyetylen glycol-albumina</i>	Rata	Isquemia fría	30 horas	↓ Daño hepático ↑ Flujo de la vena Porta
rMnSOD [158] <i>Antioxidante</i>	Rata Humano	Isquemia fría	16 horas	↓ Estrés oxidativo
RXP409 [159] <i>Inhibidor de la MMP</i>	Rata	Isquemia fría	42 horas	↓ Daño hepático
Simvastatin [160] <i>Vasoprotector e inhibidor de la HMG-CoA reductasa</i>	Rata	Isquemia fría	16 horas	↓ Daño hepático, apoptosis e inflamación, disfunción endotelial y desórdenes microcirculatorios
TAT-HO-1 [161] <i>Proteína de fusión con la hemo-oxigenasa</i>	Rata	Isquemia fría	2,6,12, 18 horas	↓ Daño hepático y BAX ↑ Bcl2
Tauroursodeoxycholate [162] <i>Acido biliar</i>	Rata	Isquemia fría	2 horas	↓ Estrés del retículo endoplasmático

**Tabla 2.** Aditivos empleados en las soluciones de preservación en los últimos cinco años, para proteger los hígados frente a la lesión por I/R.

## 5.2 Estrategias farmacológicas

Numerosos estudios experimentales se han centrado tanto en inhibir los efectos nocivos de la isquemia como la respuesta inflamatoria asociada a la reperfusión. Con esta finalidad, se han administrado fármacos como la cloroquina o la clorpromazina para prevenir las disfunciones mitocondriales y la degradación de fosfolípidos durante la isquemia hepática. Para inhibir las acciones de los RLO durante la reperfusión se ha tratado con antioxidantes como tocoferol, N-acetilcisteína, glutatión éster (GSH-éster), o alopurinol, y se han administrado también anticuerpos dirigidos al TNF para bloquear las acciones nocivas de esta citoquina. Para reducir los desórdenes microcirculatorios asociados a la I/R hepática se han realizado tratamientos con dopamina y ATP-MgCl<sub>2</sub>. Se han utilizado también fármacos como adenosina, dopamina, donadores de NO, L-arginina, y anticuerpos anti-ICAM-1 y anti-P-selectina para bloquear la acumulación de neutrófilos. Sin embargo, ninguno de estos tratamientos han logrado frenar la lesión por I/R hepática [17,79]. Debe tenerse en cuenta las dificultades de frenar la inflamación asociada a este proceso, debido entre otros factores a los múltiples mediadores y tipos celulares implicados en esta respuesta inflamatoria. Además, también deben considerarse las dificultades derivadas del

tratamiento farmacológico. En este sentido, el GSH-éster no llega al lugar de acción a concentraciones óptimas ni en el momento adecuado. La administración de anticuerpos anti-TNF provoca sólo una inactivación parcial de la proteína. Pequeñas variaciones en la dosis de donadores de NO tienen efectos totalmente opuestos. Además, no hay que descartar los posibles efectos secundarios derivados de los fármacos, ya que en el caso de la dopamina, adenosina y donadores de NO se han descrito efectos nocivos sistémicos [17,79].

Los problemas para modular la lesión por I/R en hígados esteatósicos son mayores que en los hígados no esteatósicos. Este tipo de hígados con infiltración grasa generan RLO que son insensibles a la acción de antioxidantes como la SOD y la catalasa. La diferencia en los mecanismos de acción entre hígados sanos y esteatósicos supone que tratamientos efectivos en hígados sanos pueden no serlo en presencia de esteatosis y además la dosis de fármaco a administrar puede ser diferente en ambos tipos de hígado. Hallazgos como este deben de tenerse en cuenta si se pretenden aplicar estrategias que protejan ambos tipos de hígados. A título de ejemplo, la administración de un donador de NO en un modelo de trasplante hepático experimental logró reducir el estrés oxidativo en hígados sanos, mientras que la suplementación de NO, a la misma dosis, aumentó la vulnerabilidad de los injertos esteatósicos al síndrome de I/R. Por otra parte, también podrían existir fármacos que sólo fueran efectivos en hígados esteatósicos. De hecho, fármacos como la cerulenina que pueden actuar sobre la UCP2 disminuyendo su expresión, logran aumentar el contenido de ATP en hígados esteatósicos pero no tienen ningún efecto en hígados sanos. Resultados similares se han obtenido con la carnitina [17,79].

En la **tabla 3** se incluyen algunas de las estrategias farmacológicas empleadas en los últimos 5 años en modelos experimentales y en la práctica clínica para proteger al hígado frente a la lesión por I/R.

ESTRATEGIAS FARMACOLOGICAS				
Fármaco	Especie	Modelo Experimental	Tiempo de Isquemia	Efecto
<b>A-779</b> [163] <i>Receptor antagonista de la Ang-(1-7)</i>	Rata	Isquemia Fría	6 horas	↓ Daño hepático, estrés oxidativo y necrosis ↑ Supervivencia
<b>ABC294640</b> [164] <i>Inhibidor de la esfingosina kinasa-2</i>	Ratón	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático, infiltración de neutrófilos, NO, NFκB y TNF-α ↑ Supervivencia
<b>Allopurinol</b> [165] <i>Inhibidor de la XOD</i>	Ratón	Isquemia caliente	30 min	↓ Estrés oxidativo y actividad de XOD
<b>AT1R, AT2R II</b> [166] <i>Antagonista del Receptor de la Ang II tipo I y II</i>	Rata	Isquemia caliente + hepatectomía	60 min	↓ Daño hepático, MDA y nitrotirosinas
<b>Apocynin</b> [165] <i>Inhibidor de la NADPH oxidasa</i>	Ratón	Isquemia caliente	30 min	↓ Estrés oxidativo y actividad de NADPH oxidasa
<b>Ascorbato</b> [167] <i>Vitamina C o ácido L-ascórbico</i>	Rata	Isquemia caliente	30 min	↓ Daño hepático y activación de las células kupffer
<b>Atorvastatin</b> [168] <i>Vasoprotector e inhibidor de la HMG-CoA reductasa</i>	Ratón	Isquemia caliente	60-90 min	↓ Daño hepático, y estrés oxidativo
<b>Atorvastatin</b> [169] <i>Vasoprotector e inhibidor de la HMG-CoA reductasa</i>	Ratón	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático ↑ Activación de TLR4 y NFκB
<b>bpV(HOpic)</b> [170] <i>Inhibidores PTEN</i>	Rata	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático, apoptosis y PTEN ↑ Activación de PBK/Akt
<b>Captopril</b> [171] <i>Bloqueador de la Ang II</i>	Rata	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático
<b>Cardiotrophin-1</b> [172] <i>Citoquina</i>	Cerdo	Isquemia fría	4 horas	↓ Daño hepático, estrés oxidativo, IL-1 β, TNF-α, IL-6 y caspasa-3 ↑ Supervivencia
<b>CORM-2</b> [173] <i>Molécula liberadora de monóxido de carbono</i>	Rata	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático, neutrófilos, apoptosis, NFκB, TNF, IL-6, y expresión de ICAM
<b>EGF</b> [174] <i>Factor de crecimiento epidérmico</i>	Rata	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático
<b>Erythropoietin</b> [175] <i>Hormona glicoproteica</i>	Ratón	Isquemia Fría	90 min	↓ Daño hepático y apoptosis
<b>17β-Estradiol</b> [176] <i>Hormona esteroide</i>	Rata	Isquemia Fría	4 horas	↓ Daño hepático, apoptosis y glicógeno sintasa kinasa-3β ↑ Supervivencia y AKT
<b>Fasudil</b> [177] <i>Inhibidor Rho-kinasa</i>	Rata	Isquemia caliente	30 min	↓ Daño hepático, activación de HSC, ET-1 y presión portal ↑ Supervivencia
<b>FK506</b> [178] <i>Inmunosupresor</i>	Rata	Isquemia fría Isquemia caliente	60 min 60 min	↓ Daño hepático, edema, necrosis y activación de AIF-1
<b>Fructose</b> [179] <i>Monosacarido</i>	Rata	Isquemia fría	26 horas	↓ Daño hepático ↑ ATP
<b>GW9662</b> [180] <i>Antagonista del PPARγ</i>	Rata	Isquemia fría	6 horas	↓ Daño hepático
<b>IGF-1</b> [174] <i>Factor de crecimiento</i>	Rata	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático
<b>MF-1</b> [181] <i>Peptido metron factor-1</i>	Rata	Isquemia caliente	90 min	↓ Daño hepático y estrés oxidativo ↑ Supervivencia y síntesis de NO
<b>MPLA</b> [182] <i>Agonista del TLR4</i>	Rata	Isquemia fría	6 horas	↓ Daño hepático ↑ Supervivencia
<b>n-3 PUFA</b> [183] <i>Acido graso polinsaturado</i>	Rata	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático, inflamación y estrés oxidativo
<b>Nilotinib</b> [184] <i>Inhibidor de la tirosina quinasa</i>	Ratón	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático, apoptosis, IL-1β, IL-6, MCP-1, MIP-2, JNK, p38 MAPK, activación y reclutamiento de monocitos

<b>PD123319</b> [171] <i>Bloqueador de Ang II</i>	Rata	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático
<b>PNU-282987</b> [107] <i>Agonista del receptor de acetilcolina nicotínica <math>\alpha 7a</math></i>	Ratón	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático, activación de NF $\kappa$ B y expresión de HMGB1
<b>RBP4</b> [180] <i>Adipocitoquina</i>	Rata	Isquemia fría	6 horas	↓ Daño hepático y expresión de PPAR $\gamma$
<b>Retinol</b> [185] <i>Vitamina A</i>	Rata	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático y esteatosis ↑ Regeneración
<b>rHuEPo</b> [186] <i>Hormona glycoproteica</i>	Rata	Isquemia fría	6 horas	↓ Daño hepático y apoptosis ↑ Supervivencia
<b>RMT1-10</b> [187] <i>Bloqueador de TIM-1</i>	Ratón	Isquemia fría	20 horas	↓ Daño hepático, infiltración de neutrófilos y activación de NF $\kappa$ B
<b>rMnSOD</b> [158] <i>Antioxidante</i>	Rata	Isquemia fría	16 horas	↓ Daño hepático, inflamación y desórdenes en la microcirculación hepática y en la disfunción endotelial
<b>rPSGL-Ig</b> [188] <i>Antagonista selectin</i>	Humano	Isquemia fría	60 min	↓ Daño hepático ↑ IL-10
<b>Sevoflurane</b> [189] <i>Agente inhalador anestésico</i>	Humano	Isquemia caliente	30 min	↓ Daño hepático y complicaciones post-operatorias
<b>Simvastatin</b> [190] <i>Vasoprotector e inhibidor de la HMG-CoA reductasa</i>	Rata	Isquemia fría	16 horas	↓ Daño hepático, apoptosis e inflamación, disfunción endotelial y mejora en la microcirculación hepática
<b>Sirolimus</b> [191] <i>Inmunosupresor</i>	Rata	Isquemia caliente + hepatectomía	60 min	↓ Daño hepático, apoptosis, acumulación de neutrófilos y MDA
<b>SQ22536</b> [192] <i>Inhibidor de la adenilato ciclasa</i>	Rata	Isquemia fría	6 horas	↓ Daño hepático, acumulación de lactato, estrés oxidativo y desórdenes microvasculares ↑ Supervivencia
<b>Tauroursodeoxycholate</b> [182,193] <i>Acido biliar</i>	Rata	Isquemia fría	6 horas	↓ Daño hepático y expresión de PPAR $\gamma$
		Isquemia caliente + hepatectomía	60 min	↓ Estrés del RE
<b>TBC-1269</b> [194] <i>Antagonista PAN-selectin</i>	Ratón	Isquemia caliente	90 min	↓ Expresión de TNF- $\alpha$ y ERK 1/2 ↑ IL-10
<b>Trans-resveratrol</b> [195] <i>Antioxidante</i>	Rata	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático y MDA ↑ Catalasa, GSH y SOD
<b>Tetryine</b> [196] <i>(Canal bloqueador del calcio)</i>	Ratón	Isquemia caliente	90 min	↓ Daño hepático, acumulación de neutrófilos y MDA ↑ SOD
<b>WY-14643</b> [91] <i>Agonista de PPAR<math>\alpha</math></i>	Rata	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático, citoquinas inflamatorias y estrés oxidativo
<b>WY-14643</b> [197] <i>Agonista de PPAR<math>\alpha</math></i>	Rata	Isquemia caliente	90 min	↓ Daño hepático
<b>WY-14643</b> [198] <i>Agonista de PPAR<math>\alpha</math></i>	Ratón	Isquemia caliente	90 min	↓ Daño hepático
<b>YM-53601</b> [168] <i>Inhibidor de escualeno sintasa</i>	Ratón	Isquemia caliente	60-90 min	↓ Daño hepático, estrés oxidativo y esteatosis

**Tabla 3.** Estrategias farmacológicas empleadas en los últimos cinco años para proteger los hígados frente a la lesión por I/R.

### 5.3 Terapia génica

Los actuales avances en biología molecular proporcionan nuevas oportunidades para reducir el daño hepático por I/R a través del uso de terapia génica. Por otra parte, su utilización de momento se ha limitado a modelos experimentales animales. Para suprimir el estrés oxidativo en la lesión por I/R hepática, se han realizados pre-tratamientos basados en la sobre-expresión de SOD o catalasa utilizando como vehículo adenovirus, liposomas o polientilenglicol. Para inhibir la apoptosis, se ha buscado la sobreexpresión del gen Bcl-2, utilizando principalmente como vehículo adenovirus. Para limitar la acumulación y la activación de neutrófilos, se ha reducido la expresión de ICAM-1 utilizando como vehículo liposomas. Se han desarrollado estrategias citoprotectoras basadas en la expresión de genes tales como la hemo-oxigenasa-1 (HO-1), la citoquina anti-inflamatoria IL-13 y el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra), empleando como vectores adenovirus o liposomas. Se ha intentado modular la acción del NFκB a través de la transfección adenoviral de una forma mutante de IκB, el cual inhibiría NFκB y aliviaría la respuesta inflamatoria hepática asociada a la I/R. Por otra parte, los problemas de la terapia génica pasan por la toxicidad de vectores, por la dificultad en conseguir una expresión óptima de la proteína en el momento y lugar adecuado, y por la dificultad de conseguir mutantes adecuados (en el caso de NFκB), debido a las controversias existentes en la activación de NFκB [17,79].

En los últimos años, el uso de las terapias basadas en RNA interferentes pequeños (siRNA) para regular las acciones biológicas de los mediadores inflamatorios en una gran variedad de patologías [199] ha creado gran interés. Así pues, en el contexto de la I/R hepática se han aplicado estrategias terapéuticas basadas en la administración de siRNA para adiponectina [91], esfingomielinasa ácida, [200] o moléculas relacionadas con la apoptosis tales como Bax [201], el receptor apoptótico Fas [202], la caspasa 8 y la caspasa 3 [203]. Tales estrategias han protegido frente al daño hepático inducido por I/R. Sin embargo, uno de los mayores desafíos para que estas estrategias puedan alcanzar su aplicación clínica es el desarrollo de estrategias que sean capaces de permitir un silenciamiento génico estable sin inducir efectos secundarios adversos. Dado que los siRNA son ácidos nucleicos, se degradan fácilmente en suero y por lo tanto necesitan un vehículo que permita un transporte estable, una internalización celular específica y confiable y además una farmacocinética favorable para utilizarse como terapia farmacológica. La posible toxicidad de dichos vehículos así como el riesgo de inmunogenicidad también son obstáculos que deben ser superados. Una vez que se desarrollen vehículos adecuados para su uso en la clínica, aun quedan otros obstáculos por afrontar. Aunque los siRNA exhiben una especificidad alta por su RNA diana, existe la posibilidad de que puedan silenciarse RNAs parcialmente complementarios y que no son el objetivo del siRNA utilizado [204].

En la **tabla 4** se incluyen algunos de los estudios en terapia génica desarrollados en los últimos 5 años, como estrategia empleada en modelos experimentales para proteger al hígado frente a la lesión por I/R.

TERAPIA GENICA				
Estrategia / Gen Diana	Especie	Model Experimental	Tiempo de Isquemia	Efecto
Adiponectina [91] (siRNA)	Rata	Isquemia caliente	60 min	↑ Daño hepático y estrés oxidativo
Stem cells derivadas de tejido adiposo [205]	Ratón	Isquemia caliente + hepatectomía	15 min	↓ Daño hepático ↑ VEGF
Stem cells derivadas de tejido adiposo mesenquimal [206]	Rata	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático, apoptosis y estrés oxidativo
FGL2 [207] (transgénico)	Ratón	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático
NFκB decoy oligonucleotidos [208]	Rata	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático, NFκB, IL-6 y TNF-α
PHD1 [209] (knockout)	Ratón	Isquemia caliente	90 min	↓ Daño hepático y estrés oxidativo
TLR4 [210] (knockout)	Ratón	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático, infiltración de neutrófilos y citoquinas
TLR4 [211] (knockout)	Ratón	Isquemia caliente	35 min	↓ Daño hepático, infiltración de neutrófilos y citoquinas pro-inflamatorias

**Tabla 4.** Estrategias de terapia génica empleadas en los últimos cinco años, para proteger los hígados frente a la lesión por I/R.

## 5.4 Estrategias quirúrgicas

Diversas estrategias quirúrgicas han demostrado ser protectoras frente a la lesión por I/R hepática en modelos experimentales, tales como el shunt portosistémico, el clampaje intermitente (CI) o el preconditionamiento (PC) isquémico [212-214]. Estas dos últimas estrategias además se han aplicado en la práctica clínica en pacientes sometidos a hepatectomías, donde se han puesto de manifiesto sus efectos beneficiosos [105,215]. Estudios llevados a cabo en modelos experimentales de I/R hepática donde se comparan ambas técnicas quirúrgicas han demostrado que la aplicación del PC tuvo mayores efectos beneficiosos [212, 213].

A partir del momento en que se describió la efectividad del PC, se han realizado numerosos trabajos con la finalidad de buscar estrategias que puedan mimetizar sus efectos beneficiosos. Una de estas estrategias es el “heat shock”, que consiste en inducir un aumento en la temperatura corporal antes de la isquemia hepática. También se ha intentado realizar un preconditionamiento químico con dexorrubicina, factor natriurético atrial, o con oxidantes, y se ha demostrado que estos tratamientos reducen la lesión hepática en diferentes modelos experimentales de I/R. Sin embargo, las limitaciones de estas estrategias es su posible aplicación clínica, bien por la dificultad que ello supondría, por problemas de toxicidad o por los efectos secundarios descritos [17,79].

Las investigaciones acerca de la efectividad del PC en modelos experimentales de I/R hepática han sido la base para que esta estrategia quirúrgica haya alcanzado su proyección en la práctica clínica para reducir la lesión por I/R hepática normotérmica asociada con las resecciones hepáticas de tumores, tanto en hígados sanos como en esteatósicos [215,216]. En la **tabla 5** se incluyen algunas

de las estrategias quirúrgicas desarrolladas en los últimos cinco años en modelos experimentales y en la práctica clínica para proteger al hígado frente a la lesión por I/R.

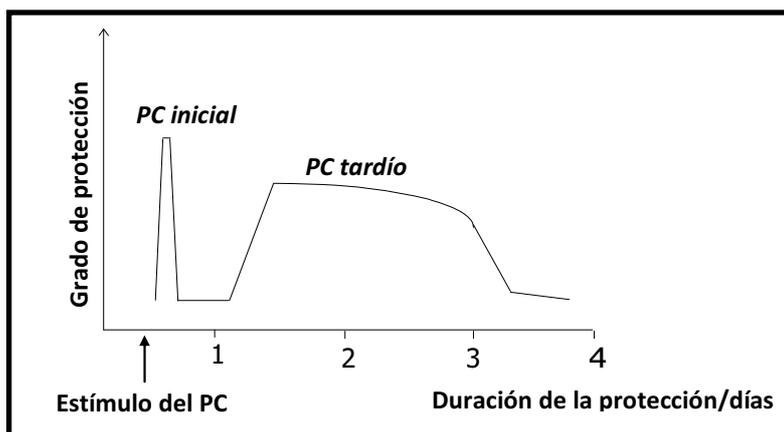
ESTRATEGIAS QUIRURGICAS				
Estrategia	Especie	Modelo Experimental	Tiempo de isquemia	Efecto
PC [180]	Rata	Isquemia fría	6 horas	↓ Daño hepático
PC [217]	Rata	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático y LTC4
PC [218]	Ratón (Cirrotico)	Isquemia caliente	60-75 min	↓ Daño hepático, apoptosis y necrosis
PC [219]	Cerdo	Isquemia caliente + hepatectomia	120 min	↓ Daño hepático
PC [220]	Humano	Isquemia caliente + hepatectomia	40-90 min	↓ Daño hepático y necrosis ↑ Autofagia
PC [221]	Humano	Isquemia caliente + hepatectomia	30-40 min	↓ Daño hepático y complicaciones post-operatorias
CI [222]	Rata (Vieja)	Isquemia caliente	45 min	↓ Daño hepático
CI [218]	Ratón (Cirrotico)	Isquemia caliente	15-30 min	↓ Daño hepático, apoptosis y necrosis
PR [223]	Ratón	Isquemia caliente	60 min	↓ Daño hepático
MP [224,225] <i>Normotérmica</i>	Cerdo	Isquemia fría	4 horas	↓ Daño hepático e inflamación ↑ Supervivencia
MP [226] <i>Hipotérmica</i>	Cerdo	Isquemia fría	6-7 horas	Protección de hepatocitos, mitocondrias y LSEC ↓ Activación de las células Kupffer
MP [227] <i>Sub-normotérmica</i>	Rata	Isquemia fría	6 horas	↓ Daño hepático y estrés oxidativo
Portocaval shunt [228]	Cerdo	Isquemia fría	5 horas	↓ Daño hepático

**Tabla 5.** Estrategias quirúrgicas empleadas en los últimos cinco años para proteger los hígados frente a la lesión por I/R. PC, preconditionamiento; CI, Clampaje intermitente; PR, preconditionamiento remoto; MP, maquina de perfusión.

## 6. El preconditionamiento isquémico

El preconditionamiento (PC) isquémico es una estrategia quirúrgica que protege los tejidos frente a la lesión inducida por la I/R. Consiste en la aplicación de breves periodos de I/R antes de que el órgano sea sometido a una I/R prolongada. Este fenómeno fue descrito por primera vez en corazón por Murry et al. en 1986 y posteriormente ha demostrado ser un mecanismo eficaz en diferentes órganos como intestino, cerebro, médula espinal, retina, músculo, pulmón, riñón e hígado [229-232]. Los ciclos y los tiempos de I/R del PC difieren según el órgano y los modelos experimentales evaluados. De este modo, mientras que en el corazón se aplican varios ciclos de I/R, el efecto protector del PC en el hígado se consigue mediante la aplicación de un único ciclo de I/R. La aplicación de varios episodios de PC isquémico no incrementa la magnitud de la protección [233,234].

El PC isquémico ofrece dos fases de protección (fase inicial y tardía) que difieren en el tiempo al que tienen lugar y en los mecanismos responsables de ésta protección (**Figura 10**). La fase inicial del PC isquémico tiene lugar minutos después de la reperfusión y se prolonga de 2 a 3 horas. Los efectos beneficiosos de esta fase del PC isquémico son independientes de la síntesis de nuevas proteínas y son mucho más potentes que los de la fase tardía. La fase tardía del PC isquémico que comienza tras 12 a 24 horas del inicio de la reperfusión, se prolonga de 2 a 3 días y sus efectos beneficiosos son dependientes de la expresión de genes y la síntesis de nuevas proteínas [235].



**Figure 10.** Fases de protección del PC isquémico.

## 6.1 Bases moleculares del PC isquémico

A pesar de que se han postulado diferentes hipótesis, los mecanismos protectores por los que actúa el PC no se conocen con exactitud. Las bases moleculares del PC consisten en una secuencia de eventos en los que las señales generadas por el PC se traducen en un mensaje celular que lleva a la amplificación del mecanismo de protección. Al igual que ocurre en la lesión hepática por I/R, en la modulación del daño hepático inducida por el PC existe una compleja interacción entre diferentes vías de señalización y tipos celulares [236].

- **Adenosina y NO**

Diferentes trabajos en modelos de I/R normotérmica y trasplante hepático han demostrado la implicación del NO y la adenosina en el efecto protector del PC [231]. De hecho, los tiempos de I/R del PC que inducen protección en el hígado vienen determinados al menos, por dos factores: una concentración de adenosina lo suficientemente elevada como para inducir la generación de NO a través de la activación de los receptores de adenosina A<sub>2</sub>, y una concentración de xantina baja para evitar los efectos perjudiciales de este metabolito [231,234,237-239]. La generación del NO inducida por el PC probablemente proviene de la eNOS, ya que la síntesis del NO se ha observado minutos después de efectuarse el PC, y además no se ha encontrado ninguna diferencia en la actividad de la iNOS en animales sometidos a I/R hepática con o sin PC previo [232].

Durante el breve periodo de isquemia del PC se produce una degradación de ATP que lleva a un aumento de los niveles de adenosina; la cual a través de la activación de los receptores A<sub>2</sub> de adenosina, genera un aumento de NO que sería responsable del efecto protector ofrecido por el PC [230]. El NO inhibe la adhesión de los neutrófilos al endotelio sinusoidal al inhibir la presencia de moléculas de adhesión en el mismo, inhibe el efecto vasoconstrictor de las ET y reduce el estrés oxidativo [232,240-243].

El papel de los receptores de adenosina A<sub>2</sub> en el PC ha sido demostrado mediante la administración de agonistas y antagonistas de los mismos. Los agonistas reprodujeron los efectos beneficiosos del PC mientras que los antagonistas los suprimieron [231]. Además diversos estudios han demostrado la implicación del NO en el PC mediante la administración de inhibidores de su síntesis y de donadores de NO, que anularon y simulaban respectivamente los efectos beneficiosos del PC en modelos animales de I/R normotérmica y trasplante hepático [125,214,231,234,242,244-252].

- **Vías de señalización molecular**

Estudios experimentales en hepatocitos aislados y en modelos experimentales de I/R indican que durante el PC tiene lugar la degradación de ATP, generándose adenosina. Al iniciarse la fase de isquemia del PC, la adenosina se libera al espacio extracelular y provoca la activación de los receptores de adenosina A<sub>2</sub> acoplados a proteína G, lo cual induce una red de señales que incluye a las proteínas G<sub>i</sub>, fosfolipasa de membrana C (PLC) y el fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K), el cual induce la liberación de calcio desde las reservas intracelulares no mitocondriales y diacilglicerol (DAG), que son responsables de la activación secuencial de la proteína quinasa C (PKC) y p38 MAPK. Se sabe que la PKC tiene un papel muy importante en la protección celular, y regula algunos procesos biológicos tales como el metabolismo, el transporte de iones y la expresión de genes. La liberación de NO activa a la guanilato ciclasa (cG-S), lo cual también puede estimular la p38 MAPK. Además, el PC provoca la generación de adenosin monofosfato (AMP), el cual induce la activación de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK). Las señales generadas por la p38 MAPK, la proteína quinasa B (PKB/Akt) y la AMPK pueden activar mecanismos capaces de preservar el metabolismo energético, las funciones mitocondriales y la homeostasis celular así como también de reducir el estrés oxidativo. El PC a través de la activación de la AMPK, reduce la degradación de ATP atenuando así la acumulación de intermediarios glicolíticos y la producción de lactato durante la isquemia sostenida. Los beneficios del PC sobre el estrés oxidativo podrían ser explicados por la inducción de antioxidantes, tales como la SOD y las proteínas de choque térmico (HSPs), así como también por el efecto del PC sobre el sistema XDH/XOD. El PC reduce la acumulación de xantina durante la isquemia y previene la conversión de XDH a XOD, previniendo los efectos dañinos de este sistema de generación del RLO sobre el hígado. Es posible que el NFκB y factores de transcripción regulados por p38 MAPK tales como el factor activador de la transcripción 2 (ATF-2) y el factor potenciador específico de miocito 2C (MEF2C), pudieran ser responsables de inducir la expresión de genes protectores, incluyendo la SOD. Las señales del PC también activan el factor de transcripción HSF1, y su unión al elemento de choque térmico situado

en las regiones promotoras de los genes diana, induce la producción de HSP27, HSP70 y HO-1. La inducción de las HSPs reduce la unión nuclear a factores de transcripción proinflamatorios y aumenta la capacidad antioxidante de las células, lo cual podría disminuir la formación de TNF- $\alpha$  y la respuesta inflamatoria en los hígados precondicionados. Las HSPs también podrían contribuir a mejorar el potencial de membrana y el control respiratorio mitocondrial, permitiendo una recuperación más rápida del ATP en la reoxigenación. Asimismo se ha sugerido la posibilidad de que el PC podría disminuir la transcripción de genes como c-fos y c-jun, protegiendo así frente a la lesión por I/R hepática. Se ha sugerido también que el PC a través de activar el NF $\kappa$ B estaría aumentando la expresión de STAT3, el cual ejerce hepatoprotección [236]. Cabe mencionar que se desconoce el papel del NF $\kappa$ B en los efectos del PC. Por un lado hay trabajos en los que se ha demostrado que durante el PC se inhibe la activación de NF $\kappa$ B y que su inhibición es responsable de algunos de los efectos beneficiosos del PC; [253] mientras que diversos autores defienden que es la activación del NF $\kappa$ B la que contribuye a los efectos beneficiosos del PC [254,255]. Además de todas estas vías de señalización celular implicadas en el PC, también se ha sugerido que el PC puede inducir la liberación de una pequeña cantidad de RLO y de TNF- $\alpha$ , los cuales contribuyen a su efecto protector [256-258].

## 6.2 Papel del PC en la lesión por I/R hepática

A continuación se describen las acciones efectoras del PC en I/R hepática.

La modulación de la respuesta inflamatoria a través del PC se ha evidenciado en diferentes modelos de isquemia hepática normotérmica y fría [259]. El PC reduce la acumulación de neutrófilos y la generación de RLO y citoquinas proinflamatorias incluyendo TNF e IL-1. Asimismo, el PC también mejora la perfusión sinusoidal y la disfunción microvascular, tal y como se explica a continuación.

- **Acumulación de neutrófilos y alteraciones en la microcirculación**

Se ha demostrado que parte del efecto protector del PC está relacionado con la modulación de la acumulación de neutrófilos y de las alteraciones en la microcirculación. El mecanismo por el cual el PC actúa modulando la acumulación de neutrófilos en el tejido hepático no se conoce con exactitud. Se ha demostrado que el PC reduce la adherencia de los leucocitos tras una isquemia normotérmica; por otra parte, también hay evidencias que indican que no hay diferencias en la expresión de moléculas de adhesión tras inducir el PC. Hay estudios que sugieren que durante el proceso de isquemia se dañan las células endoteliales, lo que facilita que los neutrófilos tengan libre acceso al tejido hepático, sin la necesidad de la expresión de moléculas de adhesión. Según esta teoría, es posible que el PC pueda reducir la acumulación de neutrófilos mediante la reducción del daño endotelial [253,260-264].

En modelos experimentales de trasplante hepático, los injertos sometidos a PC muestran una mejoría en el flujo sanguíneo tras la reperfusión. De forma similar, los efectos beneficiosos del PC sobre la microcirculación también se han observado en modelos de isquemia hepática

normotérmica. Diversos estudios han sugerido que el PC, mediante la generación de NO, que tiene efectos vasodilatadores, puede contrarrestar la vasoconstricción producida por la liberación de mediadores inflamatorios como la ET y reducir así los desórdenes microcirculatorios asociados a la I/R hepática [265-267].

- **Estrés oxidativo y citoquinas**

El PC es capaz de reducir el estrés oxidativo asociado a la I/R hepática, ya sea preservando la estructura mitocondrial o bien, modulando la activación de las células de Kupffer [268,269]. Los beneficios del PC frente al estrés oxidativo pueden además ser explicados por la inducción de antioxidantes como la SOD y las HSPs, y también por la acción del PC sobre mecanismos generadores de RLO como X/XOD.

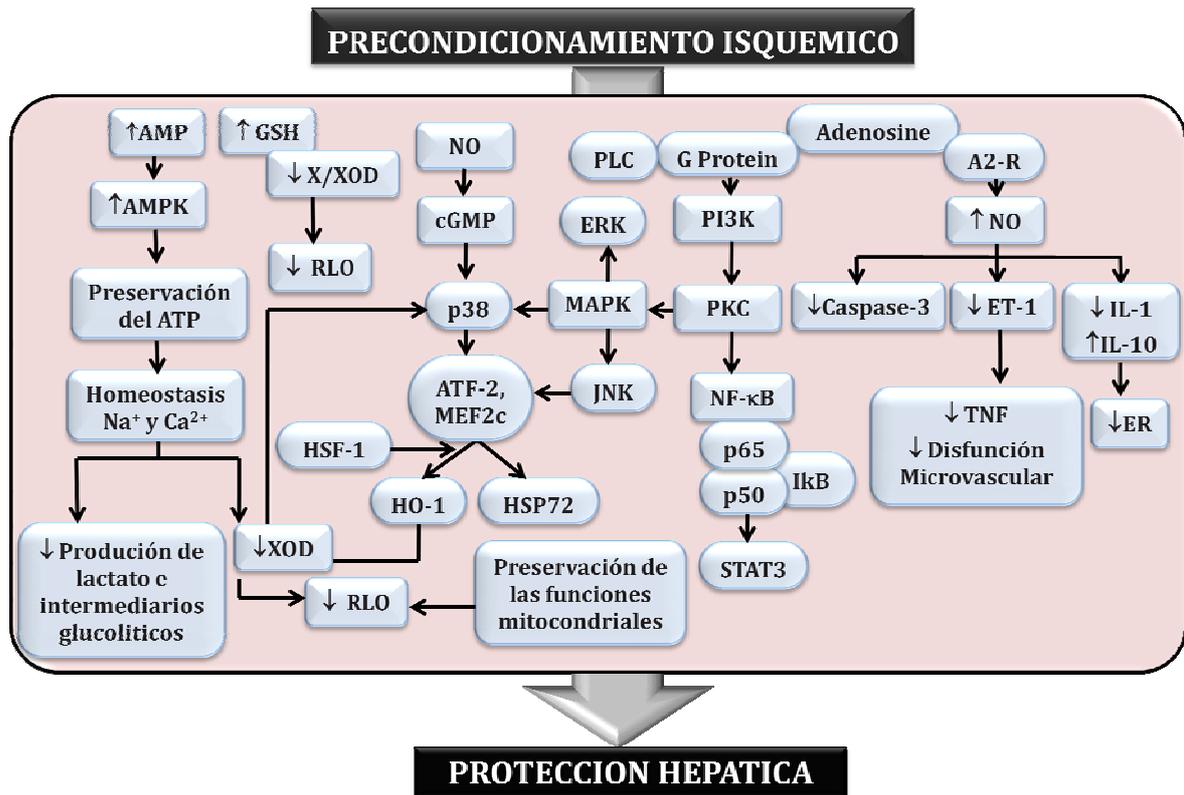
El PC regula el sistema generador de RLO, X/XOD en isquemia hepática normotérmica y en trasplante hepático experimental. Actúa reduciendo la acumulación de xantina durante la isquemia y previenen la conversión de la XDH a XOD, reduciendo así los efectos adversos de este sistema generador del RLO en el hígado. Los resultados obtenidos tras la administración de alopurinol (un inhibidor de la XOD) a animales sometidos a I/R o de X/XOD a animales en los que previamente se había inducido un PC, confirman estas observaciones [256,270,271]. Los beneficios del PC no sólo se han observado a nivel de pro-oxidantes, sino que existen estudios que demuestran que esta estrategia quirúrgica es capaz de evitar la degradación o inactivación de mecanismos antioxidantes que tienen lugar durante la isquemia [236]. De este modo, el PC preserva los niveles de GSH en hígado durante el proceso de isquemia y también durante la reperfusión [256,271].

En relación a las citoquinas, el PC inhibe la activación de las células de Kupffer, reduciendo de esta forma la liberación de citoquinas asociadas a la I/R hepática [214,272]. Existen trabajos que demuestran también la influencia del PC sobre la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 en procesos de I/R normotérmica [272-274].

- **Apoptosis y necrosis**

La combinación de los efectos inducidos por el PC anteriormente mencionados disminuye la apoptosis y/o necrosis asociada a la I/R. En este sentido, se ha demostrado que el PC reduce la apoptosis de los hepatocitos tras la reperfusión disminuyendo los niveles de TNF- $\alpha$  y modulando la vía de las caspasas [215,275-277]. De la misma manera, el PC reduce el número y la extensión de las áreas de necrosis en el tejido hepático tras una I/R [270,277].

En la **Figura 11** se muestran algunos de los principales mecanismos implicados en el efecto protector del PC.

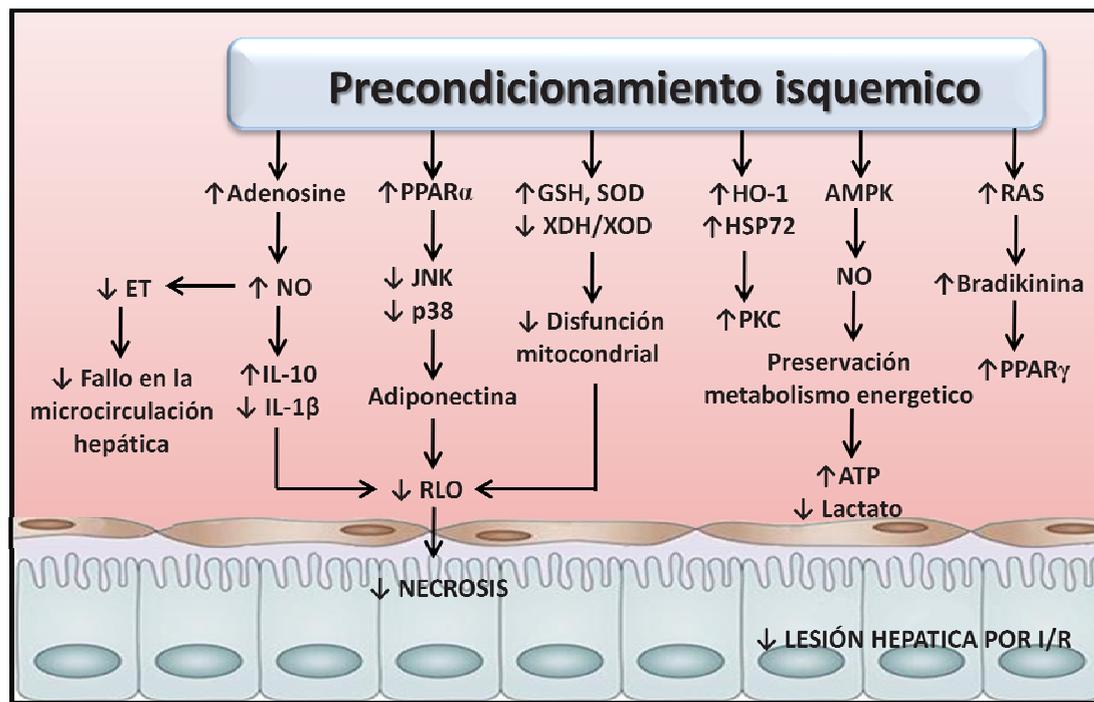


**Figura 11.** Mecanismos involucrados en los beneficios del preconditionamiento isquémico sobre el daño por I/R hepática.

### 6.3 PC y esteatosis hepática

Tal y como se ha mencionado anteriormente, los hígados esteatósicos son especialmente susceptibles a la lesión por I/R asociada a la cirugía hepática, como las resecciones o el trasplante hepático. Se ha evidenciado que el PC es capaz de proteger los hígados esteatósicos frente al daño por I/R en estudios de I/R normotérmica en distintos modelos de hígado esteatósico, así como en pacientes con esteatosis hepática sometidos a hepatectomía [113,216,266]. Estudios realizados en modelos experimentales de isquemia normotérmica en hígados esteatósicos han indicado que el PC a través de la generación de NO disminuyó la lesión hepática y aumentó la supervivencia frente a un proceso de I/R reduciendo el estrés oxidativo, la acumulación de neutrófilos, las alteraciones en la microcirculación y modulando la liberación de citoquinas tales como la IL-10 y la IL-1β [113,273]. También se ha demostrado que en las mismas condiciones experimentales, el PC contribuye a una mejor preservación y restablecimiento de los niveles de ATP tras la reperusión en este tipo de hígado [138]. Adicionalmente se ha descrito que el PPARα, adiponectina [91], las MAPKs p38 y JNK, HSP72, HO-1, PKC [90], IL-6, y los factores de transcripción STAT3, NFκB y AP-1 [278], estarían implicados en las vías de señalización molecular responsables de los efectos beneficiosos del PC sobre la lesión por I/R normotérmica en hígados esteatósicos (**Figura 12**).

En lo que respecta al trasplante hepático, los beneficios del PC para reducir la vulnerabilidad de los hígados esteatósicos a la lesión por I/R asociada al trasplante han sido demostrados en diferentes estudios experimentales de trasplante hepático [125,236,252,279]. Los resultados obtenidos en modelos experimentales han indicado que el PC, mediante la producción de NO, redujo la formación de RLO y la acumulación de neutrófilos en injertos esteatósicos sometidos a trasplante hepático, protegiendo así frente al daño hepático inducido por I/R [252]. También se ha observado que el PC induce la síntesis de NO a través de la activación de la AMPK [125].



**Figura 12.** Mecanismos implicados en el efector protector del preconditionamiento isquémico en la lesión por I/R en hígados esteatósicos.

## 6.4 Aplicación clínica del PC

Los beneficios del PC observados en modelos experimentales de isquemia hepática normotérmica y fría derivaron en su aplicación clínica. A la fecha, el PC ha sido exitosamente aplicado en resecciones hepáticas en humanos tanto en hígados no esteatósicos como esteatósicos [236]. Clavien y colaboradores realizaron el primer estudio clínico, analizando el PC en cirugía hepática humana. El PC consistió en 10 minutos de oclusión del flujo portal y 10 minutos de reperusión. El PC protegió frente a la lesión hepática y este efecto fue más evidente en pacientes con esteatosis de grado leve a moderado. Este efecto protector se perdió en pacientes de 60 años y fue máximo en los pacientes más jóvenes [216]. Posteriormente, Chouker y colaboradores observaron que la aplicación del PC en resecciones hepáticas, además de reducir los parámetros de lesión hepática, conllevó a una mayor estabilidad hemodinámica tras la reperusión con respecto al grupo no preconditionado [280]. Adicionalmente, Li y colaboradores demostraron el efecto beneficioso del

PC en pacientes con cirrosis sometidos a hepatectomías observando un riesgo disminuido de insuficiencia hepática y tiempos más cortos de estancia en el hospital [281]; y por último, Nuzzo y colaboradores también evidenciaron beneficios del PC en resecciones hepáticas con tiempos de oclusión del flujo sanguíneo más largos que los empleados en estudios anteriores [282].

En el trasplante hepático, el beneficio del PC aun está bajo evaluación. Algunos estudios clínicos realizados sobre la aplicación del PC en el trasplante hepático han indicado que el PC reduce los niveles de transaminasas postquirúrgicas, marcadores de muerte celular y la inflamación [280-285]. Por otro lado, otros estudios clínicos no han observado efectos beneficiosos del PC en el trasplante hepático [115]. Azoulay y colaboradores fueron los primeros que demostraron en efecto protector del PC en el trasplante hepático señalando que el PC basado en 10 minutos de isquemia fue asociado con una mejor tolerancia a la isquemia; sin embargo, esto fue a costa de una disfunción hepática temprana [284]. Jassem y colaboradores concluyeron que 10 minutos de PC es efectivo para proteger los injertos hepáticos frente a la isquemia fría, reduce la respuesta inflamatoria y resulta en una mejor función del injerto [285]. Cescon y colaboradores mostraron que 10 minutos de isquemia seguidos de 15 minutos de reperfusión no afecta la viabilidad del injerto y tiene un impacto positivo en los niveles de transaminasas postquirúrgicas, aunque no modifica otros parámetros clínicos [286]. Amador y colaboradores indicaron que el PC disminuye las enzimas hepáticas postquirúrgicas y mejora significativamente los marcadores bioquímicos de funcionalidad hepática [287]. A diferencia de los estudios anteriores, Koneru y colaboradores observaron que los hígados de donantes sometidos a un PC con 5 minutos de clampaje de los vasos hepáticos no mostraron respuesta al PC, concluyendo que tal vez el tiempo de PC utilizado fue demasiado corto para inducir protección [115]. Dos años más tarde, el mismo grupo de investigadores realizó un siguiente estudio clínico en trasplante hepático aplicando 10 minutos de PC a los donantes de hígado y encontraron un efecto paradójico del PC, ya que observaron mayores niveles de transaminasas en los hígados precondicionados, y sin embargo se redujo la tasa de rechazo y disfunción hepática [288]. Y actualmente empiezan a aparecer los primeros resultados que indican que los mismos efectos beneficiosos del PC pueden producirse en el trasplante de injertos hepáticos esteatósicos [283].

Como resultado de todos los estudios anteriores, se requiere realizar mayores investigaciones que permitan obtener resultados concluyentes acerca de la aplicación del PC en el trasplante hepático, y que ello conduzca a que esta técnica quirúrgica pueda ser una estrategia útil y rutinaria en la práctica clínica para reducir la lesión por I/R asociada al trasplante hepático de injertos esteatósicos. Así pues, el primer paso de estas investigaciones sería realizar estudios más exhaustivos a nivel experimental acerca de los mecanismos protectores del PC en hígados esteatósicos sometidos a trasplante.

## 6.5 Estrategias futuras para disminuir la lesión por I/R hepática asociada al trasplante de injertos esteatósicos

De todo lo anteriormente descrito hasta este punto en la presente tesis, es notorio que la lesión por I/R sigue siendo un problema sin resolver en la práctica clínica del trasplante hepático con injertos esteatósicos. Aunque se han intentado estrategias terapéuticas basadas en la modulación de citoquinas, NO, RLO o de otros mediadores puntuales implicados en la lesión por I/R hepática, ninguna de ellas ha tenido su aplicación a nivel clínico [17,79]. En este sentido, actualmente se buscan nuevas dianas terapéuticas que sean capaces de modular la lesión por I/R hepática induciendo la activación de varias vías de señalización molecular y que no estén solamente enfocadas en inhibir un tipo específico de mediador implicado en la lesión por I/R hepática. Estas nuevas dianas de acción terapéutica podrían generarse a partir de las investigaciones encaminadas al estudio de los mecanismos bioquímicos y moleculares subyacentes al PC en modelos experimentales de hígados esteatósicos sometidos a trasplante hepático. De esta manera, las estrategias terapéuticas basadas en la modulación de dichas dianas podrían mimetizar o aumentar la efectividad del PC para reducir la lesión por I/R asociada al trasplante hepático en hígados esteatósicos y con ello conducir a futuras aplicaciones clínicas y rutinarias del PC en el trasplante hepático. Además de lo anterior, las estrategias terapéuticas así diseñadas podrían ser de interés teniendo en cuenta que puede haber casos en los que no sea posible o sea muy difícil la aplicación del PC. Así pues, se tendrían estrategias tanto quirúrgicas como farmacológicas que al aumentar la tolerancia de los hígados esteatósicos a la lesión por I/R asociada al trasplante hepático, minimizarían en consecuencia el riesgo inherente de disfunción o fallo que sufren los hígados esteatósicos al ser trasplantados. Esto repercutirá favorablemente en la práctica clínica en una mayor disponibilidad de injertos hepáticos para trasplantar y consecuentemente en la disminución en las listas de espera.

## 7. Adenosin monofosfato-3',5' cíclico

El adenosin monofosfato-3',5' cíclico (AMPC) es un segundo mensajero encargado de transmitir al interior de la célula a través de la membrana los cambios que ocurren en el ambiente externo. El AMPC propaga innumerables señales iniciadas por hormonas y factores de crecimiento. Los niveles de AMPC intracelular están regulados por el balance entre la actividad de dos tipos de enzimas: adenil ciclasas (AC) y las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE). La actividad de ACs y PDEs está regulada positiva o negativamente por diferentes sistemas de señalización: el calcio (a través de calmodulina, CamKII, VI y calcineurina); subunidades de proteínas G, inositol (a través de PKC); y receptores con actividad tirosina quinasa (a través de ERK y PKB) [290]. Se han identificado tres dianas principales del AMPC: la proteína quinasa A (PKA), proteína EPAC (intercambio de GTP) y canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (**Figura 13**).

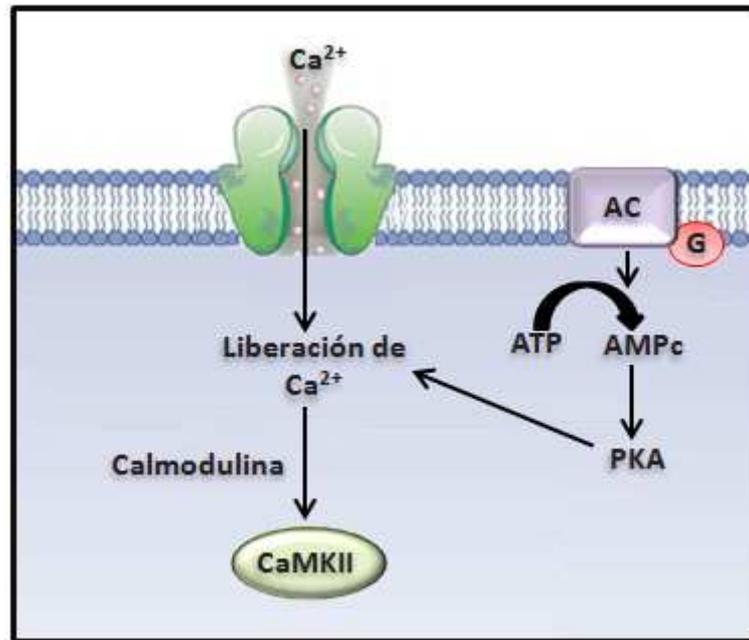


Figura 13. El adenosin monofosfato-3',5' cíclico (AMPc)

## 7.1 El AMPc y la lesión por I/R hepática

Estudios que han evaluado el papel de AMPc en la lesión por I/R hepática, indican que el AMPc y análogos del AMPc tienen efectos beneficiosos sobre la I/R hepática. Estos estudios se han centrado principalmente en hígados no esteatósicos, extraídos de donantes a corazón parado y sometidos a isquemia normotérmica o isquemia fría [291-293]. Esos resultados han sido corroborados también en un modelo experimental de hígado perfundido aislado [294]. Sin embargo el papel del AMPc en condiciones de trasplante de hígados esteatósicos aún no había sido evaluado hasta el momento.

Resultados previos [295-299], han señalado que tanto la reducción del estrés oxidativo, como la preservación del metabolismo energético celular podrían estar implicados en los beneficios del AMPc. El AMPc reduce la producción de RLO en macrófagos alveolares de cerdos [295], en granulocitos de pacientes sanos [296] y en neutrófilos de humanos [297]. Además, análogos del AMPc, atenúan la degradación de nucleótidos de adenina durante la isquemia y restauran los niveles de ATP después de la reperfusión en hígados no esteatósicos sometidos a isquemia normotérmica [298] o procedentes de donantes de corazón parado y sometidos a isquemia fría [299]. Por consiguiente, la posibilidad de que agentes análogos del AMPc puedan regular los mecanismos potencialmente responsables de la vulnerabilidad frente a la lesión por I/R asociada al trasplante de hígados esteatósicos, incluyendo el estrés oxidativo y la pérdida de nucleótidos altamente energéticos, no puede ser excluida.

Tal y como se ha mencionado previamente, los mecanismos a través de los cuales el PC ejerce sus efectos protectores en injertos hepáticos esteatósicos son desconocidos, sin embargo no se puede descartar una implicación del AMPc en tales efectos. De hecho, un estudio previo en hígados aislados sometidos a isquemia fría demostró que el PC protegió a las células endoteliales frente al daño por preservación-reperfusión a través de la inducción de AMPc.

## 8. El ácido tauroursodeoxicólico y el PPAR $\gamma$

### 8.1 El ácido tauroursodeoxicólico y la lesión por I/R hepática

El ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) es un ácido biliar endógeno, que se forma a partir de la combinación de los ácidos biliares ursodesoxicólicos (UDCA) con el aminoácido taurina. Recientemente, ha sido aprobado su uso en la práctica clínica como un agente de protección frente a diferentes enfermedades hepáticas, incluida la cirrosis y la colestasis hepática [300-304].

Diversos estudios demuestran que la acción del TUDCA se debe a un mecanismo capaz de modular el estrés del retículo endoplasmático (RE) [305,306], el cual causa daño celular y contribuye a la fisiopatología de la obesidad y de la diabetes tipo 2. El estrés del RE está implicado en la respuesta inflamatoria hepática asociada al proceso de I/R [162,193]. En respuesta al estrés del RE se induce una cascada de señales de transducción denominada “respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)” [305]. La UPR tiene 3 ramas (**Figura 14**): la enzima 1 que requiere inositol (IRE1), la quinasa del retículo endoplasmático semejante a PKR (PERK) y el factor activador de la transcripción 6 (ATF6). En estados de inactividad, estas proteínas están normalmente retenidas en la membrana del RE unidas a chaperonas intra-RE, particularmente a la proteína inmunoglobulina de 78 kDA de unión/regulada por glucosa (GRP78). Cuando existe un daño, estas vías de transducción de señales pueden inducir muerte celular [305]. Sólo existen dos estudios que han evaluado el efecto del TUDCA sobre estrés del RE en hígados esteatósicos y no esteatósicos sometidos a I/R. En uno de los estudios, el tratamiento con TUDCA protegió a ambos tipos de hígados frente al estrés del RE en condiciones de isquemia normotérmica [193]. En el segundo, los autores preservaron injertos hepáticos con solución histidina cetoglutarato triptófano (HTK) durante 2 horas. Los resultados indicaron un estrés del RE en ambos tipos de injertos, siendo más evidente en presencia de esteatosis. En estas condiciones, el TUDCA redujo el estrés del retículo endoplasmático, protegiendo así frente a la lesión por I/R hepática asociada al trasplante. Hasta la presente tesis, se desconocía si los beneficios del TUDCA sobre el estrés del RE observados en injertos preservados en solución HTK durante 2 horas podrían ser extrapolados a injertos hepáticos esteatósicos y no esteatósicos sometidos a 6 horas de preservación fría en solución de UW. Esto es de importancia ya que la solución UW se ha convertido en el estándar para la preservación de órganos en trasplante [17] y los injertos hepáticos son usualmente preservados durante 6 a 8 horas en el trasplante clínico.

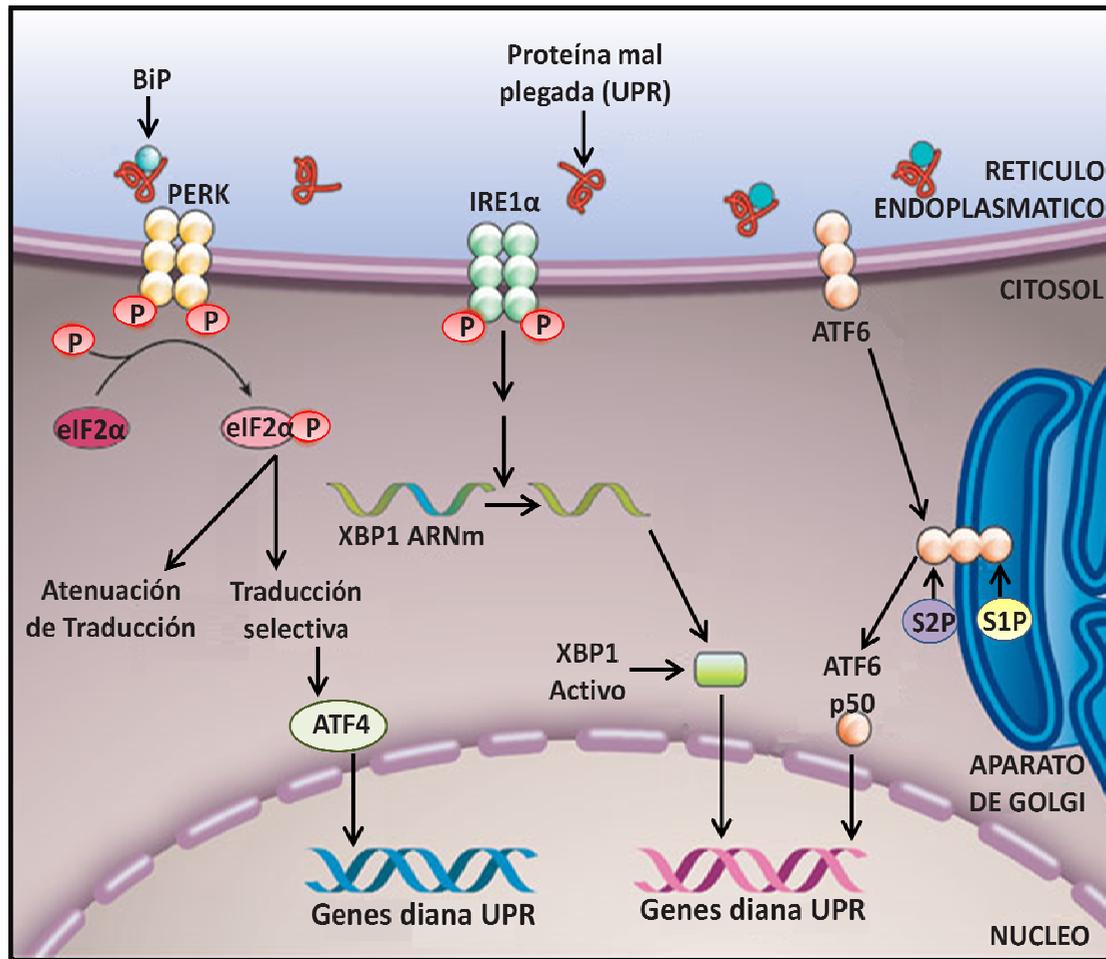
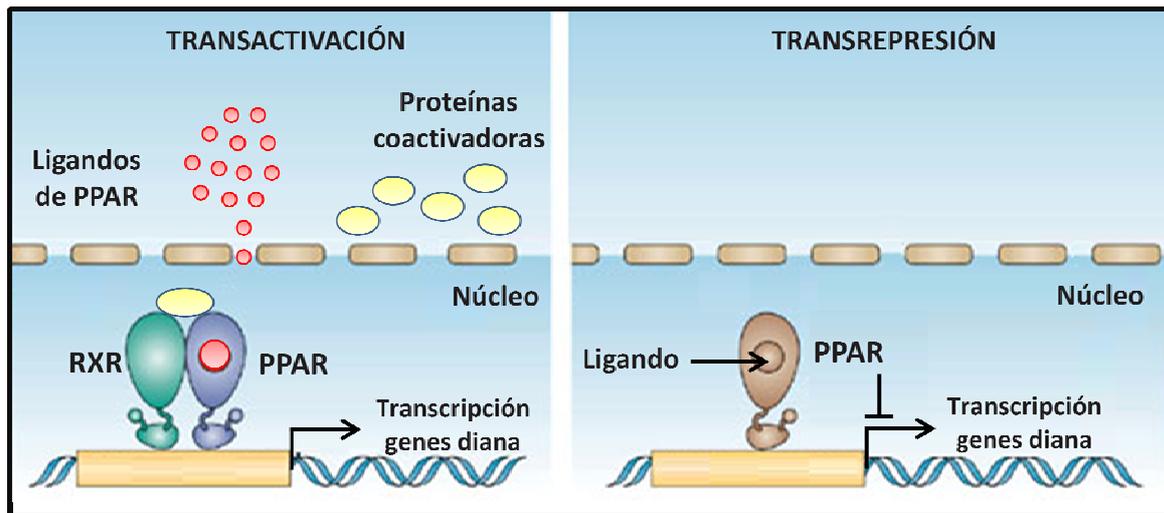


Figura 14. La vía del UPR.

## 8.2 El PPAR $\gamma$ y la lesión por I/R hepática

Los peroxisomas son orgánulos subcelulares del hepatocito que contienen una batería de enzimas antioxidantes que protegen los hepatocitos del daño por oxidantes. La proliferación de los peroxisomas en los hepatocitos es inducida, al menos en parte, por la activación de los receptores activadores de la producción de peroxisomas (PPARs) [307]. Los PPARs pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares hormonales o factores de transcripción dependientes de ligandos. Tras ser activado por ligandos, el PPAR sufre cambios conformacionales específicos que permiten el reclutamiento de una o más proteínas coactivadoras [308]. Los PPARs pueden activar o inhibir la expresión génica mediante los mecanismos de transactivación y transrepresión (**Figura 15**). En la transactivación, dependiente de DNA y ligando, los PPARs activan la transcripción uniéndose a elementos específicos de respuesta PPAR (PPREs) en los genes diana como el RXR. En el mecanismo de transrepresión, dependiente de ligando, los PPAR reprimen la transcripción antagonizando las acciones de otros factores de transcripción.



**Figura 15.** Mecanismos de acción del PPAR

La superfamilia de los PPARs cuenta con tres miembros: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$ . Se ha descrito que el PPAR $\alpha$  y el PPAR $\gamma$  son importantes reguladores del daño post-isquémico, ejerciendo efectos sobre la esteatosis y la inflamación hepática [307,308].

Los pocos resultados que hay sobre el papel de estos factores de transcripción en I/R hepática no son concluyentes. Existen resultados opuestos sobre la relevancia del papel del PPAR $\gamma$  en la lesión hepática por I/R en hígados no esteatósicos sometidos a I/R normotérmica [309-312]. En el caso de los hígados esteatósicos, el pretratamiento con agonistas del PPAR $\gamma$ , así como la inducción de PC- mediante la sobre-expresión de PPAR $\gamma$ -, protege este tipo de hígados frente a la lesión inducida por I/R normotérmica [91,171]. A día de hoy, sólo un estudio previo ha examinado los efectos del PPAR $\gamma$  en el trasplante hepático de injertos esteatósicos. Dicho estudio muestra que, contrario a lo que sucede en isquemia normotérmica, la reducción en los niveles de PPAR $\gamma$  protege los injertos esteatósicos de la lesión inducida por I/R asociada al trasplante [180]. Por lo tanto, futuras investigaciones son necesarias para aclarar el papel del PPAR $\gamma$  en los hígados esteatósicos sometidos a I/R. De manera interesante, se ha observado en hepatocitos aislados que el TUDCA induce inactivación del PPAR $\gamma$ , con lo cual podría considerarse la implicación del PPAR $\gamma$  en los mecanismos protectores del TUDCA.

## 9. El receptor tipo Toll 4

Los receptores TLR son proteínas transmembrana tipo I. Hasta el momento se han identificado 11 receptores TLR en humanos, mientras que en ratón se han identificado 13 TLR. Los TLR 1-9 están conservados en el hombre y el ratón [313,314].

Están implicados en el reconocimiento específico de componentes de microorganismos derivados de patógenos como bacterias, hongos, protozoos y virus. En cuanto a la localización celular de los

receptores TLR, los receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 se localizan en membrana plasmática, mientras que el TLR7, TLR8 y TLR9 se localizan en los endosomas [314,315].

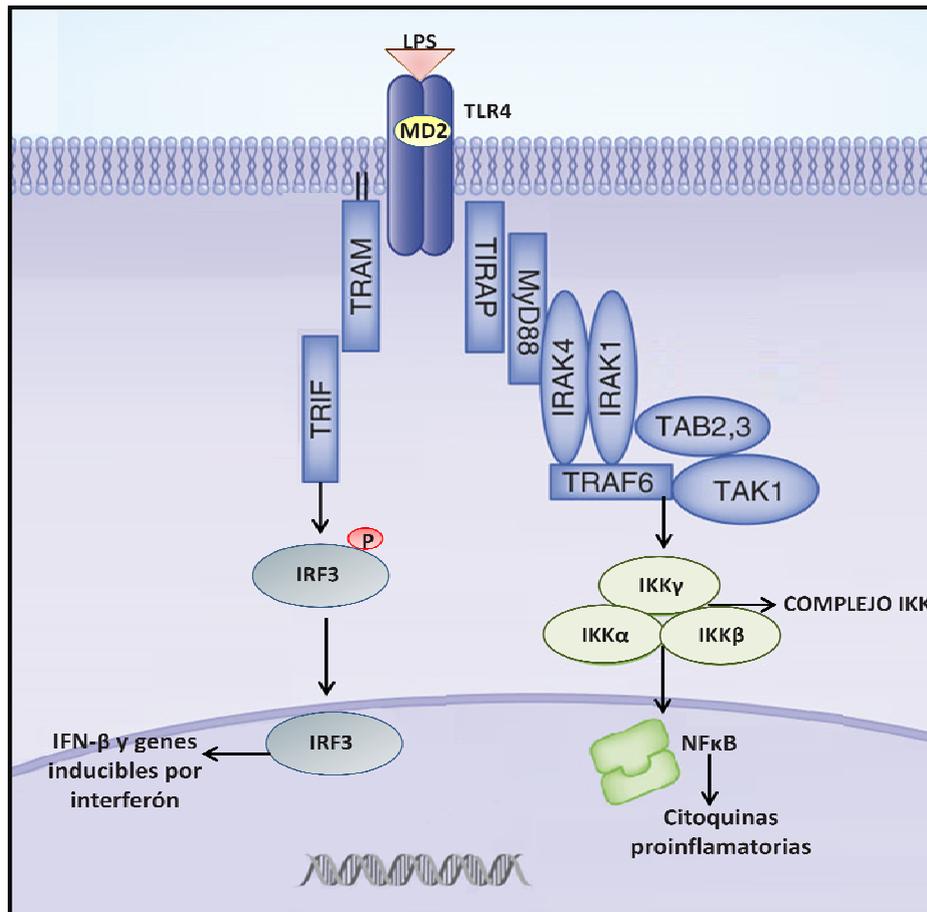
De todos los TLR, el primero identificado en humanos y mejor caracterizado es el TLR4. Es una proteína transmembrana que existe principalmente en los macrófagos, como las células de Kupffer del hígado, y que juega un papel esencial en la respuesta frente al LPS bacteriano y en enfermedades infecciosas e inflamatorias [316]. Este receptor también se ha implicado en el reconocimiento de otros ligandos como el taxol o ligandos endógenos como las proteínas de choque térmico HSP60 y HSP70.

El ligando específico para el receptor TLR4, es el LPS, componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. El TLR4 no reconoce directamente al LPS, sino que debe unirse a la proteína adaptadora MD-2 en su parte extracelular. El LPS a su vez, se une a la proteína de unión a LPS y a la proteína CD14 localizada en la superficie de los fagocitos (**Figura 16**).

La interacción ligando-receptor provoca una dimerización del mismo y el inicio de la cascada de señalización en el que intervienen varias proteínas adaptadoras (**Figura 13**). La vía de señalización consiste, al menos, en dos rutas: vía dependiente del MyD88, común a todos los receptores TLR excepto al TLR3 y la vía independiente de MyD88, propia del TLR4 [315].

Tras la unión del ligando, el receptor dimeriza y se inicia la vía dependiente del MyD88. El receptor cambia su conformación y facilita la unión de proteínas adaptadoras a través dominio TIR: la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR (TIRAP), también llamada Mal. La proteína MyD88 recluta y activa a IRAK-4 (quinasa asociada a IL-1R) que fosforila a IRAK-1, necesario para formar un complejo con el factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral 6 (TRAF6). La formación del complejo IRAK-4/IRAK-1/TRAF6 induce un cambio conformacional que libera el complejo del receptor. A continuación este complejo interacciona en la membrana con la proteína unida a TAK (TAB2) lo que provoca la liberación de las proteínas IRAK y la formación de un nuevo complejo compuesto por TAB2, TAK1 (quinasa asociada a TGF- $\alpha$ ), TAB1 y TRAF6 que se libera al citosol. La translocación al citosol hace que TAK1 se active y provoque la activación de las MAPK y de la quinasa de I $\kappa$ B (IKK) que fosforila a I $\kappa$ B (inhibidor de NF $\kappa$ B), degradándose ésta y liberando a NF $\kappa$ B, este pasa al núcleo e induce la expresión de mediadores inflamatorios tales como la iNOS, la ciclooxigenasa-2 (COX2) y citocinas inflamatorias [314-316].

En la vía independiente de MyD88, la estimulación con LPS provoca la interacción del receptor con dos proteínas adaptadoras, la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM) y la que induce IFN $\beta$  y que contiene el dominio TIR (TRIF), produciéndose la activación del factor de transcripción IRF-3 (factor regulador de interferón) que se fosforila y se transloca al núcleo donde induce la producción de IFN $\beta$ . IFN $\beta$  activa a las proteínas STAT (transductor de señal y activador de la transcripción) con la consiguiente activación de genes inducibles por interferón como IFN $\beta$ , IRF-1, IP-10 o VCAM-1 [315,317].



**Figura 16. Vía de señalización del TLR4.** El LPS se une al TLR4 a través de las proteínas adaptadoras MD-2 e inicia la cascada de señalización en la que están implicadas varias proteínas y que finaliza con la activación de factores nucleares y la expresión de mediadores inflamatorios (vía dependiente del MyD88) y de genes inducibles por interferón (vía independiente del MyD88).

### 9.1 El TLR4 y la lesión por I/R hepática

Estudios previos, señalan la implicación del TLR4 en daño hepático en diversos modelos experimentales [318,319]. La inhibición de la expresión del gen de TLR4 puede paliar la lesión hepática en modelos experimentales de daño hepático agudo [320], y que el tratamiento con E5564, un antagonista de TLR4, mejora la tasa de supervivencia global de ratas con fallo hepático fulminante inducido por D-galactosamina y LPS [321].

Numerosos estudios han señalado que la vía de señalización del TLR4 es responsable del daño por I/R en hígados no esteatósicos sometidos a isquemia normotérmica [320,322-327] o trasplante hepático [328,329]. Además, la interrupción de la señalización de TLR4 tiene efectos beneficiosos sobre la lesión hepática en hígados esteatósicos sometidos a I/R normotérmica. Se ha demostrado que reguladores del PPAR gamma inducen cambios en la expresión de TLR4 en hígados no esteatósicos sometidos a isquemia normotérmica.

Aunque la señalización del TLR4 es relevante en la lesión por I/R hepática, existe cierta controversia sobre cuáles de las vías de señalización (MyD88 y/o TRIF) es la activada tras la I/R hepática [319,320]. Hasta la fecha, no se ha descrito cuál es el papel del TLR4 en injertos hepáticos esteatósicos sometidos isquemia fría y la potencial relación existente entre el PPAR gamma y el TLR4 en tales condiciones.

## 10. Las Adipocitoquinas (Adiponectina, Visfatina y Resistina)

El término “adipoquina” o “adipocitoquinas” (citoquinas del tejido adiposo) comprende a factores polipeptídicos sintetizados mayoritariamente en el tejido adiposo. En los últimos años, las investigaciones se han centrado en las adipocitoquinas como potenciales dianas terapéuticas en distintas patologías relacionadas con la obesidad y el síndrome metabólico. Las adipocitoquinas regulan la esteatosis, inflamación y fibrosis [330]. Estudios recientes han implicado las adipocitoquinas en la vulnerabilidad de los hígados esteatósicos a la lesión por I/R normotérmica [91,100,180,185]. Esto podría derivar en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas de utilidad para reducir la lesión por I/R en el trasplante de injertos hepáticos esteatósicos.

### 10.1 Adiponectina y la lesión por I/R hepática

La adiponectina es una proteína que circula en el plasma como una estructura trimérica de peso molecular bajo (LMW), estructura hexamérica de peso molecular medio (MMW) y polimérica o de peso molecular alto (HMW), pero las actividades metabólicas se relacionan principalmente con la forma HMW que es la forma más activa en el hígado [331-333].

Los principales receptores de la adiponectina in vivo son AdipoR1 y AdipoR2 que pertenecen a la familia de receptores que contienen dominios transmembrana. AdipoR1 se expresa abundantemente en el músculo y está estrechamente vinculado a la activación de la vía AMPK que regula la inhibición de la gluconeogénesis junto con una mayor oxidación de ácidos grasos. Y AdipoR2 se expresa en el músculo y en el hígado, y parece asociarse con la activación del PPAR $\alpha$ , la inhibición de la inflamación y del estrés oxidativo [334] (**Figura 17**).

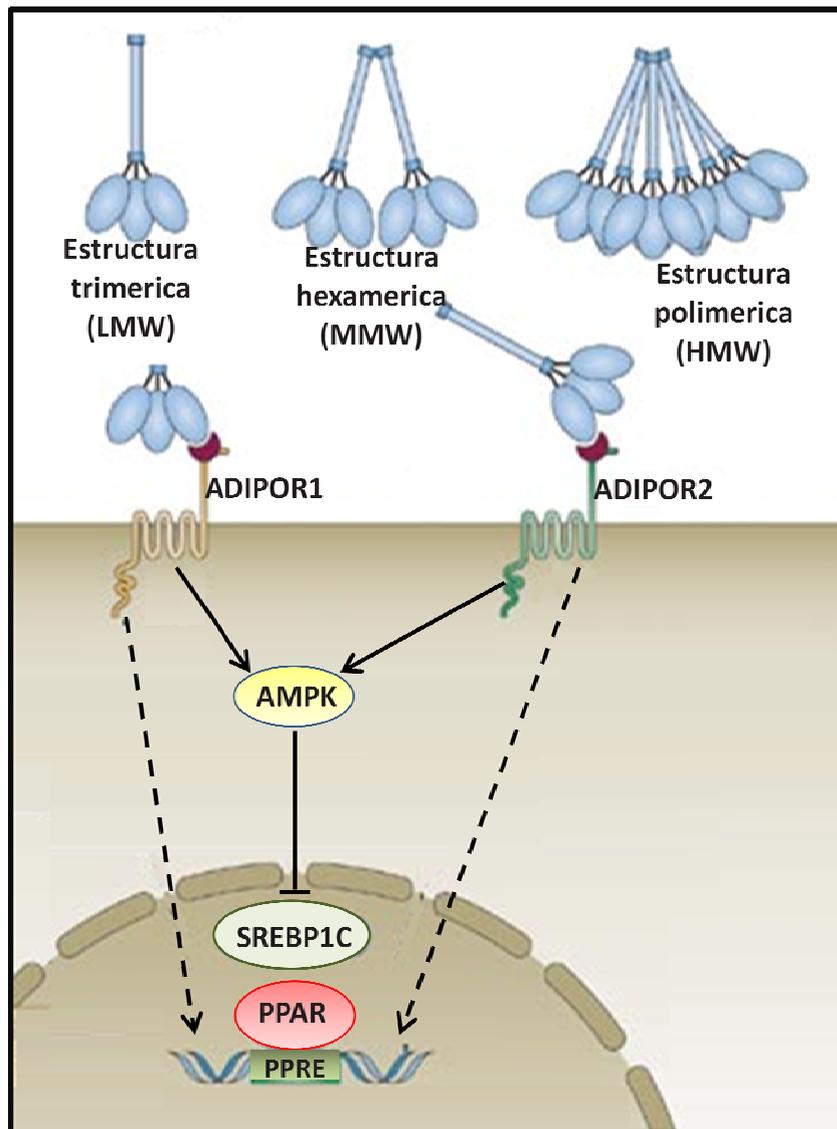


Figura 17. Estructura y receptores de la adiponectina

La adiponectina se considera como un posible regulador de la esteatosis hepática [335-337] y de la inflamación sistémica y hepática [327,330,335-339] que caracteriza a las diferentes enfermedades hepáticas. Debido a las propiedades anti-obesidad y anti-inflamatorias de la adiponectina, el uso de esta adipocitoquina podría ser una estrategia prometedora para el tratamiento de hígados esteatóticos sometidos a I/R. Es bien conocido el papel de la infiltración grasa y la inflamación en la vulnerabilidad de los hígados esteatóticos frente a la lesión por I/R [17,49,236]. Sólo dos estudios han descrito un papel de la adiponectina en los hígados esteatóticos sometidos a I/R [91,340]. En el primero de tales estudios [91], se mostraron efectos perjudiciales de la adiponectina en hígados esteatóticos sometidos a isquemia normotérmica. En estas condiciones, los hígados esteatóticos mostraron niveles mayores de adiponectina (tanto de mRNA como de proteína) al compararlos con los hígados no esteatóticos. El tratamiento con silenciadores de adiponectina (siRNA), redujo el estrés oxidativo y las lesiones hepáticas en los hígados esteatóticos. En el mismo estudio, agonistas del PPAR $\alpha$  y el PC isquémico vía PPAR $\alpha$ , inhibieron la expresión de AMPK y esto redujo la acumulación de adiponectina en los hígados esteatóticos y sus efectos negativos sobre el estrés

oxidativo y el daño hepático. En otro estudio, realizado en injertos hepáticos esteatósicos de tamaño reducido, se demostraron niveles séricos elevados de adiponectina posterior al trasplante [340]. El tratamiento con adiponectina ejerció efectos anti-inflamatorios y mejoró la microcirculación hepática. Los efectos anti-inflamatorios de la adiponectina fueron mediados por la Akt y el NO. Adicionalmente, en el mismo estudio [340] se demostraron las propiedades anti-obesidad y regenerativas de la adiponectina en trasplantes con injertos esteatósicos de tamaño reducido.

Los datos mencionados sugieren que el papel de la adiponectina depende de las condiciones quirúrgicas, y hasta el momento no se ha evaluado si la adiponectina es capaz de proteger a los injertos hepáticos esteatósicos sometidos a 6 horas de isquemia fría, lo cual, como ya se ha mencionado, es comúnmente usado en el trasplante hepático procedente de donante cadavérico. Se desconoce también el efecto del PC sobre la adiponectina en el contexto del trasplante hepático.

## 10.2 Visfatina y Resistina y la lesión por I/R hepática

La visfatina denominada inicialmente como nicotinamida forforribosiltransferasa (Nampt), es una proteína de 52 kDa, sintetizada por células de la médula ósea, del hígado, del músculo y linfocitos. Inicialmente se le identificó como un factor estimulante de las colonias de células pre-B (PBEF) que inhibe la apoptosis de los neutrófilos activados y aumenta la maduración de precursores de células  $\beta$  en presencia de IL-7. Posteriormente Nampt/PBEF fue reconocida como una citoquina liberada por el tejido adiposo y se le dio el nombre de visfatina. La fuente principal de la visfatina son los macrófagos infiltrados en el tejido adiposo visceral, en respuesta a un proceso inflamatorio [341,342]

La resistina es una hormona dimérica de 114 aminoácidos recientemente descrita, que recibe su nombre por su supuesto efecto sobre la inducción de resistencia a la insulina en ratones. En el ratón, la resistina se expresa mayoritariamente en el tejido adiposo. En humanos no se expresa normalmente en los adipocitos, sino en otros tipos celulares, principalmente los macrófagos y los monocitos [343]. Circula en sangre bajo dos formas distintas de ensamblaje: HMW y LMW, siendo esta última la biológicamente activa. Hasta el momento no se conocen con exactitud las posibles funciones biológicas de la resistina. Se ha propuesto que la resistina podría jugar un papel en el desarrollo de resistencia a la insulina, en la adipogénesis y en la inflamación, aunque existen grandes divergencias entre los diferentes estudios. Estas discrepancias pueden deberse a la metodología empleada en su determinación, a diferencias en el comportamiento de la misma en los distintos modelos animales empleados y a que pueda ser diferente su regulación dependiendo de si se trata de una situación fisiológica o de una patología [343,344].

Se ha descrito que la resistina ejerce un efecto perjudicial en patologías hepáticas. La resistina se correlaciona con marcadores de inflamación [344]. De hecho, niveles incrementados de resistina se han relacionado a la severidad de la enfermedad en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica [345] y en pacientes con cirrosis [346].

Por otro lado, el papel de la visfatina en la patogénesis de las enfermedades hepáticas es menos claro. Teniendo en cuenta que la visfatina muestra propiedades pro-inflamatorias en diversos

trastornos inflamatorios tales como la sepsis y la enfermedad intestinal inflamatoria [347,348], se sugirió que la visfatina podría ser uno de los mediadores implicados en situaciones clínicas que cursan con la combinación de obesidad e inflamación. Además se ha demostrado un papel potencial para la visfatina en la patogénesis y la progresión de la esteatohepatitis no alcohólica [349]. Sin embargo, existen resultados opuestos con respecto al papel de la visfatina indicando que esta adipocitoquina puede tener efectos hepatoprotectores [350], o incluso que no parece estar asociado con inflamación [351].

Los efectos de la visfatina o de la resistina en la lesión por I/R en los hígados esteatósicos no han sido determinados previamente, ni tampoco se conoce si el PC ejerce algún efecto sobre estas adipocitoquinas. En el contexto de la isquemia, sólo existen estudios que han investigado el papel de visfatina y resistina en corazón y cerebro [352]. Se ha demostrado que los mecanismos moleculares de señalización para ambas adipocitoquinas cursan a través de la vía PI3K/Akt en isquemia cardíaca [353,354]. Tal y como se ha comentado anteriormente, la vía PI3K/Akt está implicada en los efectos beneficiosos del PC en la I/R hepática [17]. Teniendo en cuenta la implicación de ambas adipocitoquinas en la infiltración grasa y la inflamación (ambas condiciones presentes en la lesión por I/R en hígados esteatósicos), no se puede descartar la posibilidad de que ambas adipocitoquinas desempeñen un papel en la I/R hepática y/o en el PC en injertos hepáticos esteatósicos sometidos a trasplante.

# *Objetivos*

---

La lesión por I/R hepática, inherente al trasplante hepático, continúa siendo un problema sin resolver en la práctica clínica, especialmente cuando se trasplantan injertos esteatósicos. El PC ha demostrado ser efectivo en la clínica para proteger a los hígados esteatósicos frente a la lesión por I/R normotérmica, pero hasta la fecha no hay estudios clínicos concluyentes sobre su utilidad en el trasplante hepático.

Los objetivos planteados en la presente tesis son los siguientes:

## ESTUDIO 1.

Investigar el papel del AMPc en la lesión por I/R asociada al trasplante en injertos esteatósicos y no esteatósicos, así como su implicación en el efecto protector del PC.

## ESTUDIO 2.

Investigar si el TUDCA es capaz de proteger a los injertos hepáticos esteatósicos y no esteatósicos sometidos a trasplante y evaluar sus posibles mecanismos de protección, centrándonos principalmente en el PPAR $\gamma$  y el TLR4.

## ESTUDIO 3.

Investigar el papel de las adipocitoquinas tales como la adiponectina, la resistina y la visfatina en la lesión por I/R en injertos hepáticos esteatósicos y no esteatósicos sometidos a trasplante, así como su implicación en los efectos protectores del PC.

Los resultados que se obtengan a partir de tales investigaciones podrían derivar en nuevas aplicaciones clínicas del PC en el trasplante hepático, así como en el diseño de nuevas estrategias farmacológicas para mimetizar su efectividad. Esto incidiría en una mayor tolerancia de los injertos esteatósicos a la lesión por I/R asociada al trasplante y a su vez, en una mayor disponibilidad de

injertos hepáticos para trasplante reduciendo en consecuencia las listas de espera de pacientes que requieren un trasplante de hígado.

# *Material y Métodos*

---

## **1. Animales de Experimentación**

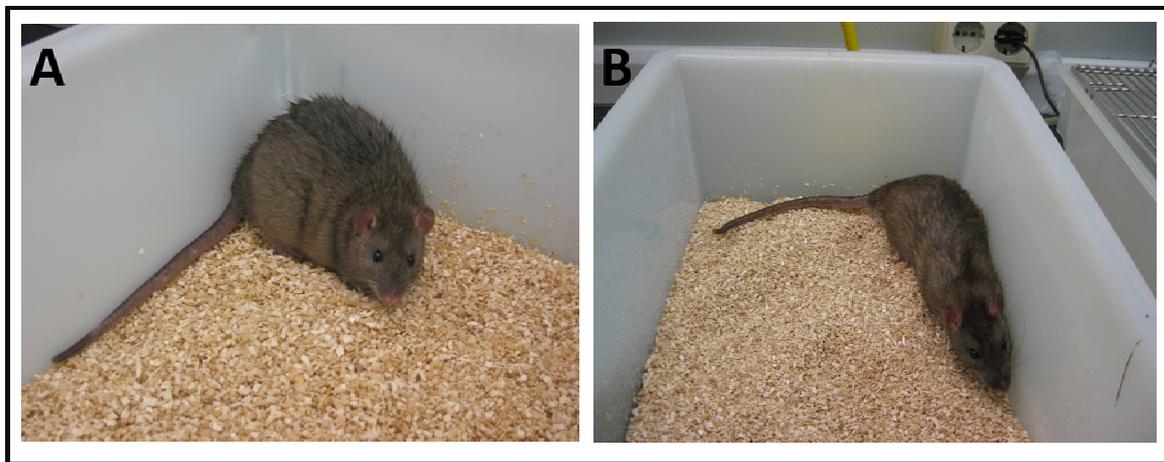
Los animales de experimentación utilizados en los diferentes estudios experimentales de esta tesis fueron ratas macho de la cepa Zucker (Iffa-Credo, L'Abresle, France), las cuales fueron mantenidas en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, como mínimo durante una semana antes llevar a cabo la intervención quirúrgica. Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes: temperatura de 21 a 22°C, humedad relativa del 70% y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta con un 12% de grasa, un 28% de proteína y un 60% de hidratos de carbono (5001 rodent diet; PMI Inc., Brentwood, MO, USA). Todos los estudios se realizaron de acuerdo con las normas reguladoras de la Unión Europea para modelos de experimentación animal (Directiva 86/609/ECC).

Las ratas de la cepa Zucker constituyen un modelo bien definido de obesidad inducida nutricionalmente [355]. A diferencia de otros modelos experimentales de esteatosis hepática que utilizan una dieta deficiente en los aminoácidos colina-metionina o dietas ricas en colesterol con o sin ingesta de alcohol; las esteatosis hepática que se produce en este modelo experimental, no está asociada con inflamación hepática [114]. Las ratas Zucker presentan dos fenotipos diferentes: las ratas Zucker homocigotas fa/fa de fenotipo obeso (Ob), que carecen de receptores cerebrales de leptina y desarrollan obesidad desde las 8 semanas de edad debido al incremento en la ingesta de comida y a la disminución del gasto energético; y las ratas Zucker heterocigotas fa/-, que tienen receptores cerebrales de leptina y mantienen un fenotipo delgado a lo largo de toda la vida (Ln) [356] (**Figura 18**).

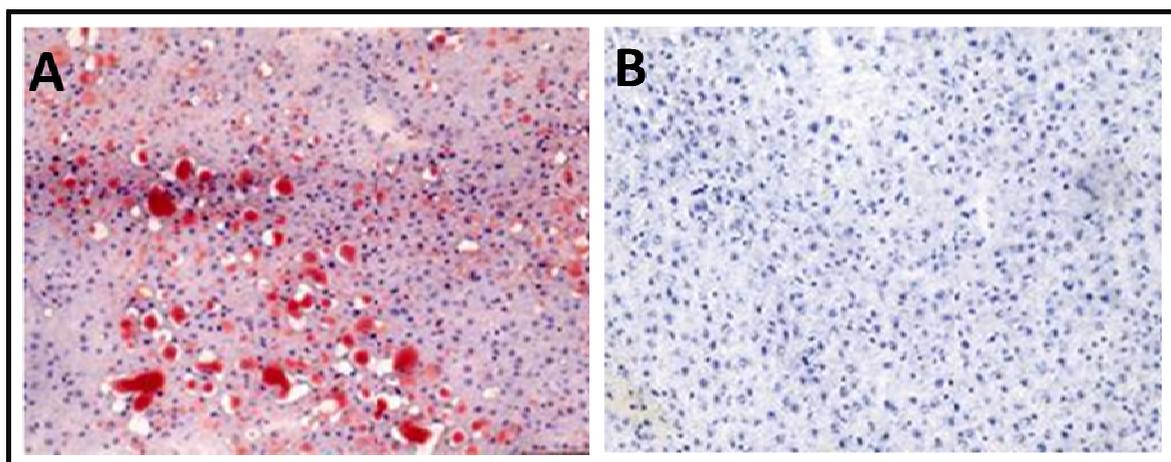
Para los diferentes experimentos se utilizaron ratas Zucker Ob o Ln como donantes y como receptores se utilizaron siempre ratas Zucker Ln. Las ratas donantes Ob tenían de 10 a 11 semanas de edad al realizarse la intervención y las Ln de 12 a 13 semanas. Debido a que hígados con esteatosis moderada suelen ser descartados como injertos para trasplante en muchas ocasiones por su riesgo mayor de desarrollar FPI, se seleccionaron ratas Zucker Ob de 10 a 11 semanas atendiendo a que a esta edad los hígados presentan esteatosis moderada. Mediante la tinción Red Oil O, se observó que las ratas Ob donantes utilizadas en el modelo de trasplante ortotópico de hígado presentaban una infiltración grasa moderada (entre el 40-60%), de tipo macro y microvesicular en el citoplasma de los hepatocitos, mientras que los animales Ln no se observó

evidencia de esteatosis hepática (**Figura 19**). Se utilizaron ratas receptoras Ln de mayor edad para resolver el conflicto de espacio en la ubicación del nuevo hígado. A igual edad las ratas Zucker Ob presentan hígados de mayor tamaño que las ratas Zucker Ln lo cual impedía su implantación en el receptor por la limitación del espacio abdominal. El trasplante en el que se consideran las ratas Zucker como donante y receptor es singénico.

Adicionalmente se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley y Wistar (Iffa-Credo, L'Abresle, France), de 200-250 gramos de peso y mantenidas en las mismas condiciones que las ratas de la cepa Zucker descritas anteriormente. Los animales se alimentaron *ad libitum* durante 10 días, con una dieta deficiente en los aminoácidos colina-metionina y una dieta estándar. El trasplante en el que considera la combinación Sprague-Wistar es completamente alogénico y resulta en rechazo en el trasplante hepático [357].



**Figura 18.** Animales de experimentación utilizados. A) Ratras Zucker Ob y B) Ratras Zucker Ln



**Figura 19.** Diferencia histológica de esteatosis entre las ratas Zucker Ob y Ln mediante la tinción Red Oil. Las ratas Zucker Ob (A) mostraron infiltración grasa en los hepatocitos mientras que las ratas Zucker Ln (B) no mostraron evidencia de esteatosis.

## 2. Modelo Experimental

### 2.1 Trasplante hepático ortotópico

- **Anestesia**

Todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo bajo anestesia inhalatoria. La inducción anestésica se realizó con isoflurano (Forane®, Abbott Laboratories, Chicago, IL., USA) al 4% con un flujo de oxígeno de 2.5 a 3 L/min. El mantenimiento de la anestesia en los animales donantes consistió en la inhalación de isoflurano al 1.5-2%, y flujo de oxígeno de 2-2.5 L/min, hasta el momento de la perfusión del hígado con solución de preservación de UW y la posterior parada cardiaca. En el receptor la anestesia se interrumpió al inicio de la fase anhepática y al finalizar este periodo se reinició, manteniéndose con un 0.5-1% de isoflurano hasta finalizar la intervención. El flujo de oxígeno fue constante durante toda la operación (2-2.5 L/min).

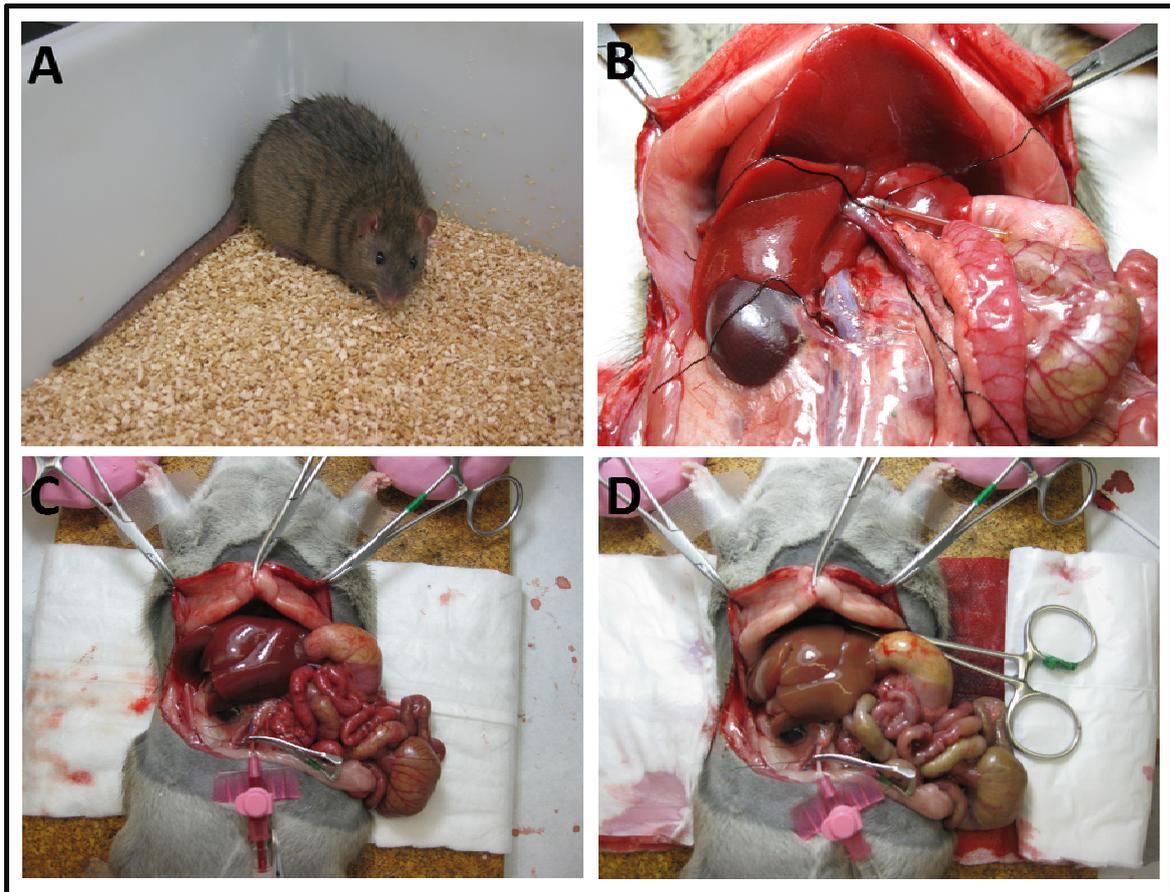
#### **Procedimiento quirúrgico del trasplante hepático ortotópico**

El trasplante ortotópico de hígado se realizó según la técnica del doble “cuff” descrita por Kamada y colaboradores, [358] sin reconstrucción de la arteria hepática. La técnica quirúrgica consta de 3 etapas: cirugía del donante, cirugía del banco y cirugía del receptor.

- ***Cirugía del donante***

Una vez inducida la anestesia en la rata donante, se rasuró el abdomen, se colocó en posición decúbito supino sobre la mesa de operaciones y se inmovilizó. El campo quirúrgico se lavó con povidona yodada y se realizó una laparotomía transversal, aproximadamente a 1 cm por debajo del apéndice xifoides. A continuación se seccionaron los ligamentos hepáticos, y se liberó la vena cava inferior. Posteriormente se diseccionó el pedículo renal derecho y se ligó la arteria y la vena renal derecha, así como también las venas suprarrenal y lumbar derechas. En el hilio hepático se separó la vena porta de la arteria hepática y del conducto biliar común. Se ligaron las ramas esplénica y pilórica de la vena porta, y el conducto biliar se canuló con un catéter de polietileno que se fijó con una doble ligadura de seda 6/0. En seguida se liberó y ligó la vena diafragmática derecha, y se separó la arteria aorta de la vena cava inferior.

Minutos antes de la perfusión del hígado con la solución de preservación, se administraron 300 unidades de heparina por vía intravenosa. Una vez preparado el órgano para su extracción se canuló la aorta mediante un catéter y se comenzó la perfusión del injerto; se ocluyó la aorta torácica, previa apertura del diafragma, se seccionó la vena cava inferior suprahepática por encima del diafragma y se comenzó la perfusión del injerto con 50 ml de solución de preservación de UW. Una vez perfundido el hígado, se procedió a la extracción del hígado donante y se colocó en un baño con solución de preservación de UW a 4°C (**Figura 20**).

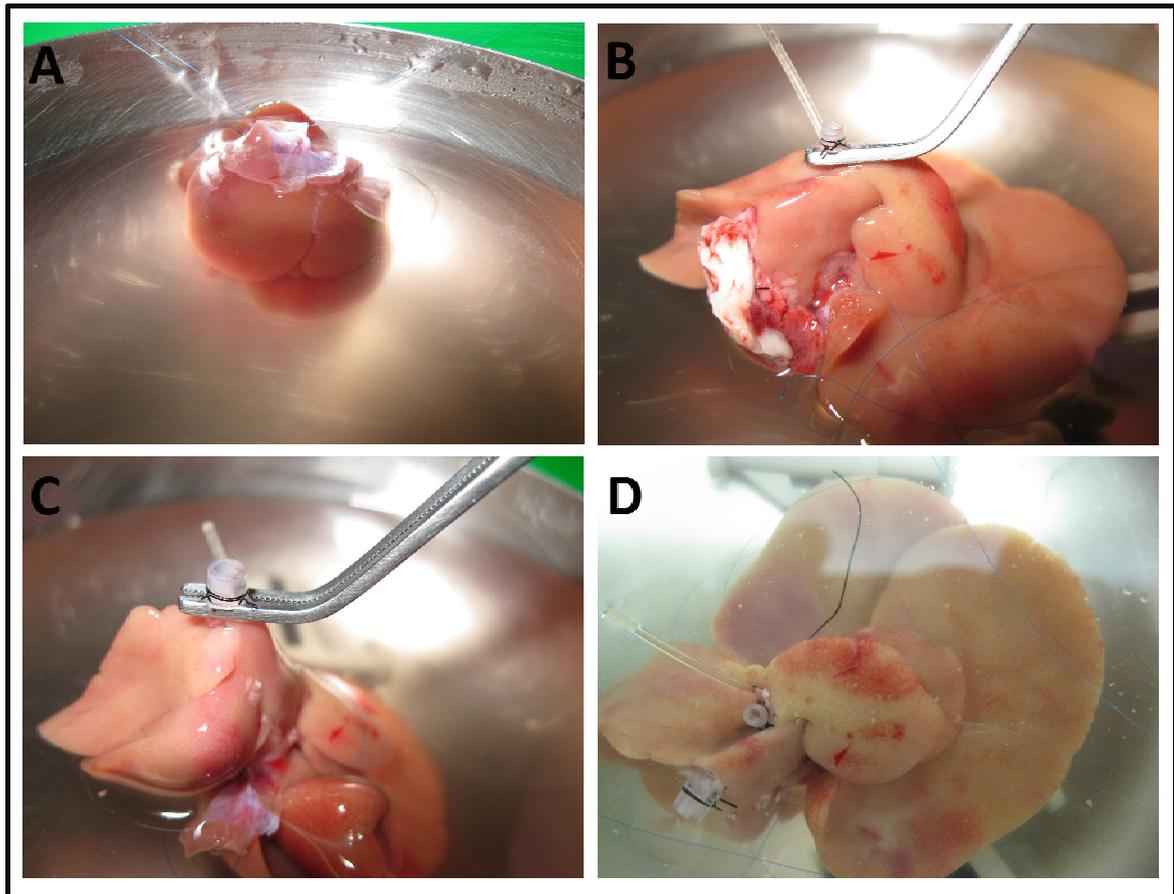


**Figura 20.** Cirugía del donante en el modelo experimental de trasplante hepático ortotópico. A) Ratas Zucker Ob. B) Arteria y vena renal derecha ligadas, y conducto biliar canulado. C) Aorta canulada para comenzar la perfusión del injerto hepático. D) Hígado perfundiéndose con solución de preservación de UW.

- ***Cirugía del banco***

La cirugía de banco se realizó con el fin de preparar el injerto para el implante en el animal receptor. Se recortó el diafragma que rodea la vena cava inferior suprahepática. Posteriormente se recortó la longitud de la vena cava inferior suprahepática dejando aproximadamente un pequeño reborde que permitió su posterior anastomosis. Se colocaron dos puntos de referencia de Prolene 7/0 en ambos extremos de la vena cava inferior suprahepática para facilitar la orientación de esta anastomosis.

Las anastomosis de las venas porta y vena cava inferior infrahepática se realizaron en el receptor mediante la técnica del doble cuff. Para ello, durante en el banco se colocaron en ambas venas unas estructuras tubulares de polietileno llamadas cuffs. La colocación de estas estructuras permite que en el momento del implante se introduzca cada cuff dentro de las venas porta y cava inferior infrahepática, evitando realizar una sutura continua y disminuyendo por lo tanto la duración de la intervención, lo cual es muy importante para la supervivencia del receptor (**Figura 21**).



**Figura 21.** Cirugía del banco en el modelo experimental de trasplante hepático ortotópico. A) Vena cava inferior suprahepática preparada para anastomosis en el receptor. B) Colocación del cuff en la vena porta. C) Colocación del cuff en la vena cava inferior infrahepática. D) Injerto hepático preservado en solución UW fría y preparado para ser implantado en el receptor.

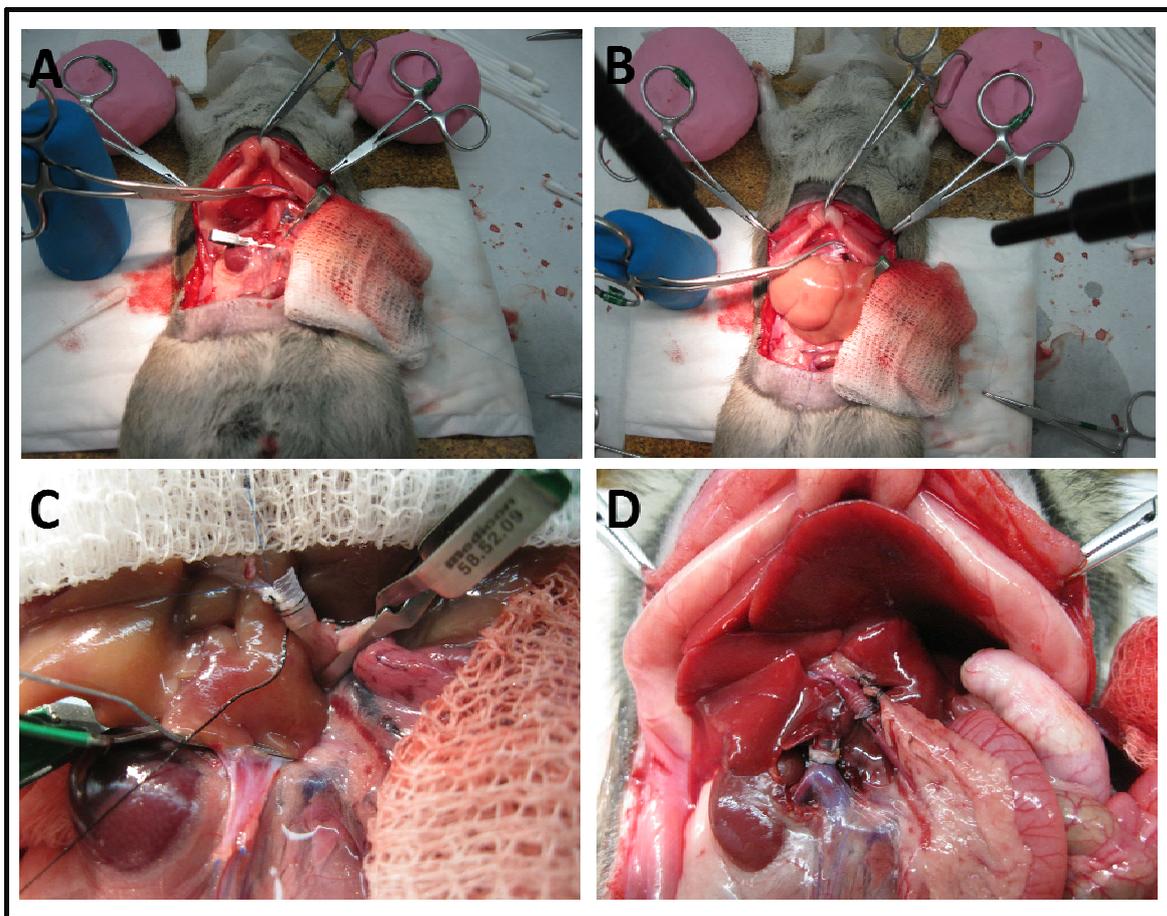
- ***Cirugía del receptor***

Se realizó la laparotomía y la disección del hígado de forma similar a la realizada en el donante. En el hilio hepático se seccionó el conducto biliar. Posteriormente, para facilitar la introducción de los cuffs y orientar de forma adecuada las venas porta y cava inferior infrahepática se colocaron en los extremos de cada una de ellas dos puntos de sutura de Prolene 7/0. A continuación se ocluyeron mediante la utilización de clamps microvasculares, la vena porta en su confluencia con la vena esplénica, y la vena cava inferior infrahepática justo por encima de la vena renal derecha. La vena cava inferior suprahepática se ocluyó también con una pinza Satinsky. En este momento se da inicio a la fase anhepática. La hepatectomía total del receptor se completó al seccionar las venas porta y cava inferior supra e infrahepáticas, todas en su parte más proximal al hígado del receptor.

A continuación se procedió a implantar el hígado del donante, previa perfusión con solución Lactato Ringer Hartmann para eliminar el exceso de ión potasio que contiene la solución de preservación de UW. El implante del injerto comenzó con la sutura continua con Prolene 7/0 entre la vena cava inferior suprahepática del donante y la del receptor. La siguiente anastomosis que se realizó fue la de la vena porta, mediante la introducción del cuff colocado en la vena porta del

injerto dentro de la vena porta del receptor; una vez introducida, se aseguró con una sutura de seda 6/0. Una vez realizadas estas dos primeras anastomosis se procedió a la reperusión del injerto, mediante la liberación en primer lugar, del clamp microvascular que ocluía la vena porta e inmediatamente después se liberó la pinza Satinsky que ocluía la vena cava inferior suprahepática.

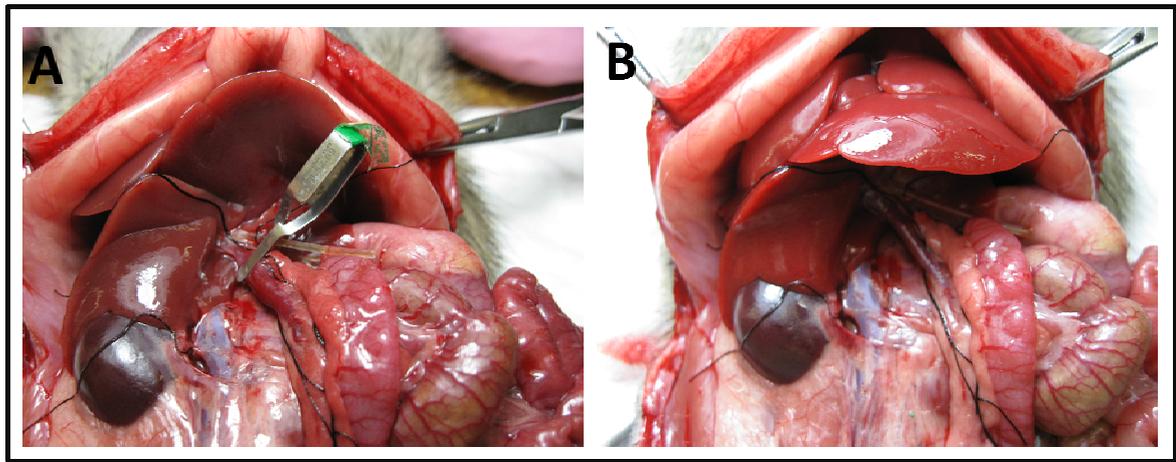
La anastomosis de la vena cava inferior infrahepática se realizó de forma similar a la vena porta, y posteriormente se liberó el clamp microvascular que ocluía la vena, reconstituyendo el flujo sanguíneo a este nivel. Después se realizó la anastomosis del conducto biliar y para terminar la intervención se cerró el plano muscular y después la piel con sutura continua con seda 2/0 (**Figura 22**).



**Figura 22.** Cirugía del receptor en el modelo experimental de trasplante hepático ortotópico. A) Fase anhepática. B) Anastomosis de la vena cava inferior suprahepática mediante sutura continua. C) Anastomosis de la vena porta mediante cuff. D) Anastomosis de la vena cava inferior infrahepática a través de un cuff y del conducto biliar mediante el catéter colocado previamente en el donante.

## 2.2 Precondicionamiento isquémico

El PC se realizó en el hígado donante mediante la oclusión de la arteria hepática y la vena porta con un clamp microvascular durante 5 minutos. Posteriormente se liberó el clamp microvascular permitiendo la reperfusión del hígado durante 10 minutos (**Figura 23**). Tras estos 10 minutos de reperfusión se procedió a la perfusión del injerto con la solución UW. Los tiempos de isquemia y reperfusión del PC se seleccionaron en base a un estudio realizado por nuestro grupo en donde se demostraba su efectividad en trasplante hepático con injerto esteatósico y no esteatósico [252].



**Figura 23.** Precondicionamiento isquémico en el modelo experimental de trasplante hepático. A) Inicio del PC: oclusión de la arteria hepática y la vena porta con un clamp microvascular, por un periodo de 5 minutos de isquemia hepática. B) Liberación del clamp microvascular para permitir la reperfusión del hígado durante 10 minutos.

### 3. Diseño Experimental

#### 3.1 Estudio 1

#### **Papel del Adenosín monofosfato-3',5' cíclico (AMPC) en la lesión hepática por I/R asociada al trasplante hepático de injertos esteatósicos y no-esteatósicos, así como en los efectos protectores del PC.**

En la **Tabla 6** se presenta un resumen del diseño experimental y las determinaciones analíticas realizadas en este estudio. Los protocolos experimentales se describen en detalle a continuación.

#### **Protocolo 1**

Para evaluar los niveles del AMPC en el trasplante de injertos esteatósicos y no esteatósicos, se realizaron los grupos experimentales siguientes.

1. Sham (n=12 ratas Zucker, 6 Ln y 6 Ob): Animales Zucker Ln y Ob sometidos a anestesia y laparotomía transversal. Se ligaron las venas suprarrenal derecha, la arteria hepática y la vena diafragmática.
2. Trasplante hepático (TH) (n=24 ratas Zucker, 12 trasplantes): Este grupo se dividió en dos subgrupos:
  - 2.1 *Trasplante hepático con injerto esteatósico* (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes, 6 ratas Ob donantes y 6 ratas Ln receptoras): Los hígados esteatósicos extraídos de ratas Zucker Ob (n=6 ratas) se perfundieron y se preservaron con solución de preservación fría UW durante 6 horas. El trasplante hepático ortotópico estándar utilizando ratas Zucker Ln como receptores (n=6 ratas), se realizó de acuerdo a la técnica de doble cuff sin reconstrucción de la arteria hepática de Kamada [358].
  - 2.2 *Trasplante hepático con injerto no esteatósico* (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes, 6 ratas Ln donantes y 6 ratas Ln receptoras): Los hígados no esteatósicos extraídos de ratas Zucker Ln (n=6 ratas) se perfundieron y se preservaron con solución de preservación fría UW durante 6 horas. El trasplante hepático ortotópico estándar utilizando ratas Zucker Ln como receptores (n=6 ratas), se realizó de acuerdo a la técnica de doble cuff sin reconstrucción de la arteria hepática de Kamada [358].
3. Precondicionamiento Isquémico + Trasplante hepático (PC+TH) (n=24 ratas Zucker, 12 trasplantes): Igual que el grupo 2, pero con PC, inducido por 5 minutos de isquemia seguido de 10 minutos de reperfusión en el hígado de la rata donante previo a la perfusión del hígado con la solución UW. El tiempo de PC utilizado ha demostrado ser eficaz frente al daño por I/R hepática en el modelo de trasplante hepático con injerto esteatósico [125,252].

La duración de los períodos de isquemia fría y de reperfusión aplicados para la realización de esta tesis están basados en estudios anteriores en los que observó que 6 horas de isquemia fría es suficiente para inducir lesión por I/R tanto en injertos esteatósicos como en no-esteatósicos sometidos a trasplante y además es un tiempo de isquemia fría normalmente utilizado en la práctica clínica. Las 4 horas de reperfusión están dentro del margen de tiempo en el que se observan los niveles máximos en los parámetros de lesión hepática [83,113,114,125,180,252,359,360].

En los grupos experimentales descritos, se recogieron muestras de plasma e hígado después de 4 horas de reperfusión y se midieron los niveles de AMPc. En el grupo Sham, las muestras de hígado y tejido se tomaron 4 horas después de la laparotomía y ligadura de los vasos sanguíneos.

## Protocolo 2

Para evaluar la lesión hepática por I/R y la supervivencia asociada al trasplante de injertos esteatósicos después de la modulación farmacológica del AMPc, así como la implicación del AMPc en los efectos protectores del PC, se establecieron 2 protocolos con los siguientes grupos experimentales.

**Protocolo 2.1.** Para evaluar la lesión hepática tras la modulación farmacológica del AMPc en el trasplante hepático de injertos esteatósicos, se añadieron los siguientes grupos experimentales:

4. Trasplante hepático + Inhibidor de la adenilato ciclasa (TH+SQ22536) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes en los que se utilizaron Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de un inhibidor de la adenilato ciclasa (SQ22536), a dosis de 300 µg/kg por vía intraperitoneal, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [361,362].
5. Precondicionamiento isquémico + Trasplante hepático + Activador de la adenilato ciclasa (PC+TH+forskolin) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes en los que se utilizaron Ob como donantes): Igual que el grupo 3.1, pero con administración previa de un activador de la adenilato ciclasa (forskolin), a dosis de 100 µg/kg por vía intraperitoneal, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [361,363].
6. Trasplante hepático + Inhibidor de la adenilato ciclasa + Análogo del AMPc (TH+SQ22536+DBcAMP) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes en los que se utilizaron Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de un inhibidor de la adenilato ciclasa (SQ22536), a dosis de 300 µg/kg por vía intraperitoneal y un análogo del AMPc (DBcAMP), a dosis de 15 mg/kg por vía intravenosa, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [293,362,363].
7. Precondicionamiento isquémico + Trasplante hepático + Análogo del AMPc (PC+TH+DBcAMP) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes en los que se utilizaron Ob como donantes): Igual que el grupo 3.1, pero con administración previa de un análogo del AMPc

(DBcAMP), a dosis de 15 mg/kg por vía intravenosa, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [293,362,363].

Para evaluar la lesión hepática se realizó la determinación de transaminasas en plasma, el estudio histológico del tejido hepático y se evaluó los niveles de AMPc en muestras de plasma y tejido hepático de todos los grupos experimentales descritos en este protocolo, tras 4 horas de reperfusión.

**Protocolo 2.2** Para evaluar la supervivencia de los receptores tras la modulación farmacológica del AMPc se monitorizaron los animales correspondientes a los grupos 2.1 y 3.1 (Protocolo 1) y grupos 4 y 5 (Protocolo 2) durante 14 días después de la cirugía, tal y como se ha descrito en otros estudios [180].

### Protocolo 3

Para investigar si los beneficios de estrategias que bloquean el AMPc cursan a través de cambios en el NO en trasplante hepático con injertos esteatósicos, se añadieron los grupos experimentales siguientes:

8. Trasplante hepático + Inhibidor de la adenilato ciclasa + Inhibidor de la óxido nítrico sintasa (TH+SQ22536+L-NAME) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes en los que se utilizaron Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de un inhibidor de la adenilato ciclasa (SQ22536), a dosis de 300 µg/kg por vía intraperitoneal, y un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (L-NAME), a dosis de 10 mg/kg por vía intravenosa, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [238,364].
9. Precondicionamiento isquémico + Trasplante hepático + Inhibidor de la óxido nítrico sintasa (PC+TH+L-NAME) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes en los que se utilizaron Ob como donantes): Igual que el grupo 3.1, pero con administración previa de un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (L-NAME), a dosis de 10 mg/kg por vía intravenosa, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [238,364].

Después de 4 horas de reperfusión, se recogieron muestras de plasma e hígado en estos grupos experimentales. Para investigar una posible implicación del NO en los mecanismos de protección se determinaron los niveles de nitritos y nitratos, eNOS, e iNOS en tejido hepático en los grupos experimentales 1, 2.1 y 3.1 (Protocolo 1) y 4 y 5 (Protocolo 2). De la misma manera, se determinaron las transaminasas, el ácido hialurónico, la permeabilidad vascular y el edema y se realizó un estudio histológico en los grupos experimentales 1, 2.1 y 3.1 (Protocolo 1), grupos 4 y 5 (Protocolo 2) y grupos 8 y 9 del presente protocolo.

### Protocolo 4

Para evaluar si las estrategias que bloquean el AMPc afectan el metabolismo energético de los hígados esteatósicos durante la isquemia fría (antes de ser implantados en el receptor), se añadieron los grupos experimentales siguientes:

10. Isquemia Fría (IF) (n=6 ratas Zucker Ob como donantes): Los hígados esteatósicos extraídos de ratas Zucker Ob se perfundieron y se preservaron con solución de preservación fría UW durante 6 horas.
11. Precondicionamiento isquémico + Isquemia Fría (PC+IF) (n=6 ratas Zucker Ob como donantes): Igual que el grupo 10, pero con PC, inducido por 5 minutos de isquemia seguido de 10 minutos de reperusión en el hígado de la rata donante previo a la perfusión del hígado con la solución UW.
12. Isquemia Fría + Inhibidor de la adenilato ciclasa (IF+SQ22536) (n=6 ratas Zucker Ob como donantes): Igual que el grupo 10, pero con administración previa de un inhibidor de la adenilato ciclasa (SQ22536), a dosis de 300 µg/kg por vía intraperitoneal, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [361,362].
13. Precondicionamiento isquémico + Isquemia Fría + Activador de la adenilato ciclasa (PC+IF+forskolin) (n=6 ratas Zucker Ob como donantes): Igual que el grupo 11, pero con administración previa de un activador de la adenilato ciclasa (forskolin), a dosis de 100 µg/kg por vía intraperitoneal, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [361,363].
14. Precondicionamiento isquémico + Isquemia Fría + Inhibidor de la óxido nítrico sintasa (PC+IF+L-NAME) (n=6 ratas Zucker Ob como donantes): Igual que el grupo 11, pero con administración previa de un activador de un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (L-NAME), a dosis de 10 mg/kg por vía intravenosa, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [238,364].

Después de 1, 2 y 4 horas de reperusión, se recogieron muestras de hígado en los grupos experimentales 1, 2.1 y 3.1 (Protocolo 1), 4 y 5 (Protocolo 2) y 8 y 9 (Protocolo 3), para evaluar ATP y nucleótidos de adenina. De la misma manera, para evaluar el efecto del bloqueo del AMPc sobre el metabolismo energético de los injertos esteatósicos se determinó ATP, nucleótidos de adenina, nucleósidos, bases, AMPc, hexosas 6-fosfato y lactato, 1, 3 y 6 horas después de la isquemia fría en los grupos experimentales 10 al 14 de este protocolo.

### **Protocolo 5**

Para evaluar el efecto del bloqueo del AMPc sobre el estrés oxidativo, se analizaron los niveles de malondialdehído (MDA), nitrotirosinas, XDH/XOD, SOD y GSH en muestras de tejido hepático correspondientes a los grupos experimentales 1, 2.1, 3.1 (Protocolo 1), 4 y 5 (Protocolo 2) y 8 y 9 (Protocolo 3) a las 4 horas después de la reperusión.

<b>Diseño Experimental del Estudio 1</b>	
<i>El AMPc en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos procedente de ratas Zucker</i>	
<b>Protocolo 1. Niveles AMPc en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos</b>	
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>
1. Sham (n=12, 6 Ln y 6 Ob) 2. TH (12 trasplantes) 2.1 TH Ob (6 injertos Ob) 2.2 TH Ln (6 injertos Ln) 3. PC+TH (12 trasplantes) 3.1 PC+TH Ob (6 injertos Ob) 3.2 PC+TH Ln (6 injertos Ln)	Grupos 1, 2 y 3: AMPc 4 horas después de reperusión.
<b>Protocolo 2. Evaluación del daño hepático y la supervivencia en el trasplante hepático de injertos esteatósicos tras la modulación del AMPc</b>	
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>
<b>Protocolo 2.1 Daño Hepático</b> 4. TH+SQ22536 (6 trasplantes, 6 injertos Ob) 5. PC+TH+forskolin (6 trasplantes, 6 injertos Ob) 6. TH+ SQ22536+DBcAMP (6 trasplantes, 6 injertos Ob) 7. PC+TH+ DBcAMP (6 trasplantes, 6 injertos Ob)  <b>Protocolo 2.2 Supervivencia</b> (10 trasplantes, 10 injertos Ob)	<b>Protocolo 2.1</b> Grupos 1, 2.1 y 3.1 (Protocolo 1), 4, 5, 6 y 7 (Protocolo 2): AMPc, transaminasas y estudio histológico 4 horas después de reperusión. <b>Protocolo 2.2</b> Grupos 2.1 y 3.1 (Protocolo 1), 4 y 5 (Protocolo 2): Supervivencia del receptor durante 14 días
<b>Protocolo 3. Implicación del NO en los beneficios de las estrategias que bloquean el AMPc en injertos esteatósicos</b>	
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>
8. TH+SQ22536+L-NAME (6 trasplantes, 6 injertos Ob) 9. PC+TH+L-NAME (6 trasplantes, 6 injertos Ob)	Grupos 1, 2.1 y 3.1 (Protocolo 1) 4 y 5 (Protocolo 2): Nitritos y nitratos, eNOS e iNOS 4 horas después de reperusión. Grupos 1, 2.1 y 3.1 (Protocolo 1), 4 y 5 (Protocolo 2) y 8 y 9 (Protocolo 3): Transaminasas, estudio histológico, ácido hialurónico, permeabilidad vascular y edema 4 horas después de reperusión.
<b>Protocolo 4. Efecto de las estrategias que bloquean el AMPc sobre el metabolismo energético de los injertos esteatósicos</b>	
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>
10. IF (6 ratas, 6 injertos Ob) 11. PC+IF (6 ratas, 6 injertos Ob) 12. IF+SQ22536 (6 ratas, 6 injertos Ob) 13. PC+IF+forskolin (6 ratas, 6 injertos Ob) 14. PC+IF+L-NAME (6 ratas, 6 injertos Ob)	Grupos 1, 2.1 y 3.1 (Protocolo 1) 4 y 5 (Protocolo 2), 8 y 9 (Protocolo 3): ATP y nucleótidos de adenina, 1, 2 y 4 horas después de reperusión. Grupos 10 a 14: ATP, nucleótidos de adenina, nucleosidos, bases, AMPc, hexosas 6-fosfato y lactato, 1, 3 y 6 horas después de la isquemia fría.
<b>Protocolo 5. Efecto de las estrategias que bloquean el AMPc sobre el estrés oxidativo en injertos esteatósicos</b>	
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>
Grupos 1, 2.1, 3.1 (Protocolo 1), 4 y 5 (Protocolo 2), 8 y 9 (Protocolo 3)	MDA, Nitrotirosinas, XDH/XOD, SOD y GSH 4 horas después de reperusión.
<b>Protocolo de administración de los fármacos utilizados</b>	
<i>Fármaco</i>	<i>Dosis y tiempo de pre-tratamiento</i>
SQ22536	Inhibidor de la adenilato ciclasa 30 µg/kg vía intraperitoneal, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
Forskolin	Activador de la adenilato ciclasa 100 µg/kg vía intraperitoneal, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
DBcAMP	Análogo del AMPc 15 µg/kg vía intravenosa, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
L-NAME	Inhibidor de la óxido nítrico sintasa 10 µg/kg vía intravenosa, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.

**Tabla 6.** Diseño experimental y determinaciones analíticas del Estudio 1.

## 3.2 Estudio 2

### **Efecto del TUDCA sobre la lesión hepática por I/R asociada al trasplante de injertos esteatósicos y no esteatósicos e investigación de los mecanismos de señalización subyacentes.**

En la **Tabla 7** se presenta un resumen del diseño experimental y las determinaciones analíticas realizadas en este Estudio.

#### **Protocolo 1**

Para evaluar el papel del TUDCA en la lesión hepática por I/R asociada al trasplante singénico de injertos esteatósicos y no esteatósicos, se establecieron 3 protocolos con los grupos experimentales siguientes.

**Protocolo 1.1.** Para evaluar el efecto del TUDCA en la lesión hepática en el trasplante hepático singénico de hígados esteatósicos y no esteatósicos, se realizaron los siguientes grupos experimentales:

1. Sham (n=12, 6 Ln y 6 Ob): Animales Zucker Ln y Ob sometidos a anestesia, laparotomía transversal. Se ligaron las venas suprarrenal derecha, la arteria hepática y la vena diafragmática.
2. Trasplante hepático (TH) (n=24 ratas Zucker): Este grupo se dividió en dos subgrupos:
  - 2.1 *Trasplante hepático con injerto esteatósico* (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes, 6 ratas Ob donantes y 6 ratas Ln receptoras): Los hígados esteatósicos extraídos de ratas Zucker Ob (n=6 ratas) se perfundieron y se preservaron con solución de preservación fría UW durante 6 horas. El trasplante hepático ortotópico estándar utilizando ratas Zucker Ln como receptores (n=6 ratas), se realizó de acuerdo a la técnica de doble cuff sin reconstrucción de la arteria hepática de Kamada [358].
  - 2.2 *Trasplante hepático con injerto no esteatósico* (n=12 ratas, 6 trasplantes, 6 ratas Ln donantes y 6 ratas Ln receptoras): Los hígados no esteatósicos extraídos de ratas Zucker Ln (n=6 ratas) se perfundieron y se preservaron con solución de preservación fría UW durante 6 horas. El trasplante hepático ortotópico estándar utilizando ratas Zucker Ln como receptores (n=6 ratas), se realizó de acuerdo a la técnica de doble cuff sin reconstrucción de la arteria hepática de Kamada [358].
3. Trasplante hepático + TUDCA (TH+TUDCA) (n=24 ratas Zucker, 12 trasplantes, en 6 de ellos se utilizaron ratas Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron ratas Ln como donantes): Los subgrupos 3.1 y 3.2 son similares a los subgrupos 2.1 y 2.2, respectivamente, pero con administración previa de TUDCA (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, USA), en el donante a dosis de 100 mg/kg por vía intravenosa, 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico [193].

**Protocolo 1.2.** Para evaluar el papel de PPAR $\gamma$  en los efectos inducidos por el TUDCA sobre la lesión hepática en el trasplante singénico de hígados esteatósicos, se añadieron los grupos experimentales siguientes:

4. Trasplante hepático + PPAR $\gamma$  antagonista (TH+PPAR $\gamma$  antagonista) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes). Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de GW9662 (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza), un antagonista del PPAR $\gamma$  a dosis de 1 mg/kg por vía intraperitoneal, 1 hora antes del procedimiento quirúrgico en el donante [180].
5. Trasplante hepático + TUDCA + PPAR $\gamma$  agonista (TH+TUDCA+PPAR $\gamma$  antagonista) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes). Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de TUDCA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a dosis de 100 mg/kg por vía intravenosa, 10 minutos antes del procedimiento y Rosiglitazona (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza), un agonista del PPAR $\gamma$ , a dosis de 3 mg/kg por vía intraperitoneal, 1 hora antes del procedimiento quirúrgico en el donante [180].

**Protocolo 1.3.** Para evaluar si el PPAR $\gamma$  era capaz de modular la vía del TLR4 en el trasplante hepático singénico de injertos esteatósicos, se añadieron los grupos experimentales siguientes.

6. Trasplante hepático + PPAR $\gamma$  antagonista + anti-TLR4 (TH+PPAR $\gamma$  antagonista+anti-TLR4) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes). Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de GW9662 (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza), un antagonista del PPAR $\gamma$  a dosis de 1 mg/kg por vía intraperitoneal, 1 hora antes del procedimiento y un anticuerpo dirigido contra el TLR4 de rata, a dosis de 3 mg/kg por vía intravenosa, 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [180,365].
7. Trasplante hepático + TLR4 agonista (TH+TLR4 agonista) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes). Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de MPLA (Enzo Life Sciences, Lausen, Suiza), un agonista del TLR4, a dosis de 500  $\mu$ g/kg por vía intravenosa, 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [366].
8. Trasplante hepático + anti-TLR4 (TH+ anti-TLR4) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes). Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de un anticuerpo dirigido contra el TLR4 a dosis de 3 mg/kg por vía intravenosa, 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [365].

En los grupos experimentales descritos, se recogieron muestras de plasma e hígado después de 4 horas de reperfusión. Se evaluó la lesión hepática mediante la determinación de transaminasas en plasma y se realizó un estudio histológico del tejido hepático. En los grupos experimentales 1, 2.1 y 3.1 (Protocolo 1.1), se evaluaron los marcadores del estrés del RE, MDA, nitrotirosinas y niveles de PPAR $\gamma$ . Se determinó la vía del TLR4 en los grupos 1, 2.1 y 3.1 (Protocolo 1.1) y 4 y 5 (Protocolo 1.2). Se analizó la mieloperoxidasa (MPO), TNF, IL-1 e IL-6 en los grupos 1, 2.1 (Protocolo 1.1) y 8 (Protocolo 1.3). Se monitorizó la supervivencia de los receptores tras 14 días en los grupos 2.1 y 3.1 (Protocolo 1.1), 4 y 5 (Protocolo 1.2), 6 y 7 (Protocolo 1.3).

Para evaluar si el efecto del TUDCA sobre el estrés del RE, PPAR $\gamma$  y la vía del TLR4, era puntual o mantenido a lo largo de la reperfusión, se añadieron nuevos grupos sujetos a intervenciones similares a las descritas en los grupos 2.1 y 3.1 (Protocolo 1.1). En tales condiciones, se determinaron los marcadores del estrés del RE, los niveles de PPAR $\gamma$  y la vía del TLR4, tras 1, 2, 4, 12 y 18 horas después de reperfusión.

## Protocolo 2

Para evaluar el papel del TUDCA y el TLR4 en la lesión hepática por I/R asociada al trasplante alogénico de injertos esteatósicos y no esteatósicos, se realizaron los grupos experimentales siguientes:

9. Sham (n=12 ratas, 6 WS Ln y 6 SD Ob): Animales Wistar (WS) Ln y Sprague Dawley (SD) Ob, fueron sometidos a anestesia, laparotomía transversal. Se ligaron las venas suprarrenal derecha, la arteria hepática y la vena diafragmática.
10. Trasplante hepático alogénico (TH<sub>alogénico</sub>) (n=24 ratas, 12 trasplantes): Este grupo se dividió en dos subgrupos:
  - 10.1 *Trasplante hepático alogénico con injerto esteatósico* (n=12 ratas, 6 trasplantes, 6 ratas SD Ob donantes y 6 ratas WS Ln receptoras): Los hígados esteatósicos extraídos de ratas Sprague Dawley Ob (n=6 ratas) se perfundieron y se preservaron con solución de preservación fría UW durante 6 horas. El trasplante hepático ortotópico estándar utilizando ratas Wistar Ln como receptores (n=6 ratas), se realizó de acuerdo a la técnica de doble cuff sin reconstrucción de la arteria hepática de Kamada [358]. Esta combinación SD a WS es completamente alogénica y resulta en un agudo rechazo del trasplante hepático [357].
  - 10.2 *Trasplante hepático alogénico con injerto no esteatósico* (n=12 ratas, 6 trasplantes, 6 ratas SD Ln donantes y 6 ratas WS Ln receptoras): Los hígados no esteatósicos extraídos de ratas Sprague Dawley Ln (n=6 ratas) se perfundieron y se preservaron con solución de preservación fría UW durante 6 horas. El trasplante hepático ortotópico estándar utilizando ratas Wistar Ln como receptores (n=6 ratas), se realizó

de acuerdo a la técnica de doble cuff sin reconstrucción de la arteria hepática de Kamada [358].

11. Trasplante hepático alogénico + TUDCA (TH<sub>alogénico</sub>+TUDCA) (n=24 ratas, 12 trasplantes): Los subgrupos 11.1 y 11.2 son similares a los grupos 10.1 y 10.2, respectivamente, pero con administración previa de TUDCA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), en el donante a dosis de 100 mg/kg por vía intravenosa, 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico [193].
12. Trasplante hepático alogénico + TLR4 agonista (TH<sub>alogénico</sub>+TLR4 agonista) (n=12 ratas, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron 6 ratas SD Ob donantes y 6 ratas WS Ln receptoras). Igual que el grupo 10.1, pero con administración previa de MPLA (Enzo Life Sciences, Lausen, Suiza), un agonista del TLR4, a dosis de 500 µg/kg por vía intravenosa, 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [366].

Al final del procedimiento quirúrgico se recogieron muestras de plasma e hígado después de 4 horas de reperusión. Se evaluó la lesión hepática mediante la determinación de transaminasas en plasma y el estudio histológico del tejido hepático. De la misma manera, se determinaron los marcadores del estrés del RE, los niveles de PPAR $\gamma$  y la vía del TLR4, así como la supervivencia de los receptores tras 14 días en los grupos experimentales 10.1, 11.1 y 12 (Protocolo 2).

Los vehículos usados para la administración de los fármacos en los diferentes protocolos de este estudio fueron: tampón fosfato salino (PBS) (Invitrogen, Gry Isly, NY, USA) para anticuerpo anti-TLR4; dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para GW9662 y Rosiglitazona; y solución salina fisiológica para TUDCA y MPLA, respectivamente.

<b>Diseño Experimental del Estudio 2</b>		
<b>Efecto del TUDCA sobre PPAR<math>\gamma</math> y TLR4 en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos</b>		
<b>Protocolo 1. Trasplante hepático singénico</b>		
<b>Protocolo 1.1. Efecto del TUDCA en el daño hepático en injertos esteatósicos y no esteatósicos sometidos a trasplante hepático singénico</b>		
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>	
1. Sham (n=12, 6 Zucker Ln y 6 Zucker Ob) 2. TH (12 trasplantes) 2.1 TH Ob (6 injertos Zucker Ob) 2.2 TH Ln (6 injertos Zucker Ln) 3. TH+TUDCA (12 trasplantes) 3.1 TH+TUDCA Ob (6 injertos Zucker Ob) 3.2 TH+TUDCA Ln (6 injertos Zucker Ln)	Grupos 1, 2.1 y 3.1: Marcadores del estrés del RE, MDA, nitrotirosinas, niveles de PPAR $\gamma$ , 4 horas después de reperfusión. Grupos 2.1 y 3.1: Marcadores del estrés del RE, niveles de PPAR $\gamma$ y vía del TLR4, 1, 2, 4, 12 y 18 horas después de reperfusión.	
<b>Protocolo 1.2. El papel de PPAR<math>\gamma</math> en los efectos inducidos por el TUDCA sobre la lesión hepática en el trasplante singénico de hígados esteatósicos</b>		
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>	
4. TH+PPAR $\gamma$ antagonista (6 trasplantes, 6 injertos Zucker Ob) 5. TH+TUDCA+ PPAR $\gamma$ agonista (6 trasplantes, 6 injertos Zucker Ob)	Grupos 1, 2.1 y 3.1 (Protocolo 1.1), 4 y 5 (Protocolo 1.2): Vía del TLR4, 4 horas después de reperfusión.	
<b>Protocolo 1.3. Modulación de la vía del TLR4 por PPAR<math>\gamma</math> en el trasplante hepático singénico de injertos esteatósicos</b>		
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>	
6. TH+ PPAR $\gamma$ antagonista+anti-TLR4 (6 trasplantes, 6 injertos Zucker Ob) 7. TH+TLR4 agonista (6 trasplantes, 6 injertos Zucker Ob) 8. TH+anti-TLR4 (6 trasplantes, 6 injertos Zucker Ob)	Grupos 1 a 8: Transaminasas y estudio histológico 4 horas después de reperfusión. Grupos 1, 2.1 (Protocolo 1.1) y 8 (Protocolo 1.3): MPO, TNF, IL-1 e IL-6 Grupos 2.1, 3.1 (Protocolo 1.1), 4, 5 (Protocolo 1.2), 6 y 7 (Protocolo 1.3): Supervivencia del receptor durante 14 días	
<b>Protocolo 2. Trasplante hepático alogénico</b>		
<b>Protocolo 2.1. Efecto del TUDCA y del TLR4 en el daño hepático en injertos esteatósicos y no esteatósicos sometidos a trasplante hepático alogénico</b>		
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>	
9. Sham (n=12, 6 injertos SD Ob y 6 injertos WS Ln) 10. TH <sub>alogénico</sub> (12 trasplantes, 6 injertos SD Ob y 6 injertos WS Ln) 11. TH <sub>alogénico</sub> +TUDCA (12 trasplantes, 6 injertos SD Ob y 6 injertos WS Ln) 12. TH <sub>alogénico</sub> +TLR4 agonista (6 trasplantes, 6 injertos SD Ob)	Grupos 9 a 12: Transaminasas y estudio histológico 4 horas después de reperfusión. Grupos 9, 10.1 y 11.1: Marcadores del estrés del RE, niveles de PPAR $\gamma$ y vía del TLR4, 4 después de reperfusión. Grupos 10.1, 11.1 y 12: Supervivencia del receptor durante 14 días	
<b>Protocolo de administración de los fármacos utilizados</b>		
<i>Fármaco</i>	<i>Dosis y tiempo de pre-tratamiento</i>	
TUDCA	Sal biliar	100 $\mu$ g/kg vía intravenosa, 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
GW9662	Antagonista PPAR $\gamma$	1 mg/kg vía intraperitoneal, 1 hora antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
Rosiglitazona	Agonista PPAR $\gamma$	3 mg/kg vía intraperitoneal, 1 hora antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
MPLA	Agonista TLR4	500 $\mu$ g/kg vía intravenosa, 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
Anti-TLR4	Anticuerpo anti-TLR4	3 mg/kg vía intravenosa, 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.

Tabla 7. Diseño experimental y determinaciones analíticas del Estudio 2.

### 3.3 Estudio 3

#### **El papel de la adiponectina, visfatina y resistina en la lesión hepática por I/R asociada al trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos, y su implicación en los efectos protectores del PC**

En la **Tabla 8** se presenta un resumen del diseño experimental y las determinaciones analíticas realizadas en este Estudio.

#### **Protocolo 1**

Para evaluar el papel de la adiponectina, la visfatina y la resistina en la lesión hepática por I/R asociada al trasplante de injertos esteatósicos y no esteatósicos, se realizaron los grupos experimentales siguientes:

1. Sham (n=12 ratas Zucker, 6 Ln y 6 Ob): Animales Ln y Ob sometidos a anestesia, laparotomía transversal. Se ligaron las venas suprarrenal derecha, la arteria hepática y la vena diafragmática.
2. Trasplante hepático (TH) (n=24 ratas Zucker, 12 trasplantes): Este grupo se dividió en dos subgrupos:
  - 2.1 *Trasplante hepático con injerto esteatósico* (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes, 6 ratas Ob donantes y 6 ratas Ln receptoras): Los hígados esteatósicos extraídos de ratas Zucker Ob (n=6 ratas) se perfundieron y se preservaron con solución de preservación fría UW durante 6 horas. El trasplante hepático ortotópico estándar utilizando ratas Zucker Ln como receptores (n=6 ratas), se realizó de acuerdo a la técnica de doble cuff sin reconstrucción de la arteria hepática de Kamada [358].
  - 2.2 *Trasplante hepático con injerto no esteatósico* (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes, 6 ratas Ln donantes y 6 ratas Ln receptoras): Los hígados no esteatósicos extraídos de ratas Zucker Ln (n=6 ratas) se perfundieron y se preservaron con solución de preservación fría UW durante 6 horas. El trasplante hepático ortotópico estándar utilizando ratas Zucker Ln como receptores (n=6 ratas), se realizó de acuerdo a la técnica de doble cuff sin reconstrucción de la arteria hepática de Kamada [358].
3. Trasplante hepático + Adiponectina (TH+Adiponectin) (n=24 ratas Zucker): Los subgrupos 3.1 y 3.2. fueron similares a los subgrupos 2.1 y 2.2, respectivamente, pero con administración previa de adiponectina recombinante (AdipoGen, Seúl, Corea) en el donante a dosis de 1.5 mg/kg por vía intravenosa, 20 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [91, 367].
4. Trasplante hepático + Adiponectina + anti-Adiponectina (TH+Adiponectina+anti-Adiponectina) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como

- donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de adiponectina recombinante (AdipoGen, Seúl, Corea), a dosis de 1.5 mg/kg por vía intravenosa, 20 minutos antes del procedimiento y un anticuerpo dirigido contra adiponectina (R&D systems, USA), a dosis de 3 mg/kg por vía intravenosa, 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [91,367,368].
5. Trasplante hepático + Visfatina (TH+Visfatina) (n=24 ratas Zucker): Igual que el grupo 2, pero con administración previa de visfatina recombinante (Enzo Life Sciences, Lausen, Suiza), a dosis de 50 µg/kg por vía intravenosa, 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [369].
  6. Trasplante hepático + anti-Visfatina (TH+anti-Visfatina) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de un anticuerpo dirigido contra visfatina (AdipoGen, Seúl, Corea), a dosis de 500 µg/kg por vía intravenosa, 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [370].
  7. Trasplante hepático + Adiponectina + anti-Resistina (TH+Adiponectina+anti-Resistina) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de adiponectina recombinante (AdipoGen, Seúl, Corea), a dosis de 1.5 mg/kg por vía intravenosa, 20 minutos antes del procedimiento y un anticuerpo dirigido contra Resistina (Merck Millipore, USA), a dosis de 1 mg/kg por vía intravenosa, 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [91,367,371].
  8. Trasplante hepático + Resistina (TH+Resistina) (n=24 ratas Zucker): Igual que el grupo 2, pero con administración previa de Resistina recombinante (PeproTech Inc, USA), a dosis de 100 µg/kg por vía intravenosa, 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [372].
  9. Trasplante hepático + Resistina + anti-Adiponectina (TH+Resistina+anti-Adiponectina) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de resistina recombinante (PeproTech Inc, USA), a dosis de 100 µg/kg por vía intravenosa, 10 minutos antes del procedimiento y un anticuerpo dirigido contra Adiponectina (R&D systems, USA), a dosis de 3 mg/kg por vía intravenosa, 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [368,372].

En todos los grupos experimentales descritos, se recogieron muestras de plasma e hígado después de 4 horas de reperusión. En las muestras de tejido hepático se determinaron los niveles de mRNA y de proteína de adiponectina, visfatina y resistina. Se evaluó la inmunolocalización de adiponectina y resistina en los grupos experimentales 1 y 2 (Protocolo 1). Para evaluar la lesión

hepática se determinaron niveles de transaminasas en plasma, y se realizó el estudio histológico del tejido hepático. Se evaluó la apoptosis mediante determinación de los niveles hepáticos de caspasa 3 y tinción Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin Nick-End Labeling (TUNEL) en cortes histológicos de hígado. La supervivencia de los receptores se monitorizó tras 14 días después del procedimiento quirúrgico en los grupos experimentales 2.1, 3.1, 7 y 8 (Protocolo 1).

## Protocolo 2

Para investigar el efecto de la AMPK, un conocido efector del PC, sobre los niveles de adiponectina, resistina y la vía PI3K/Akt en el trasplante hepático de injertos esteatósicos, se realizaron los grupos experimentales que se describen a continuación:

10. Precondicionamiento Isquémico + Trasplante hepático (PC+TH) (n=12 ratas Zucker, 6 trasplantes en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con PC, inducido por 5 minutos de isquemia seguido de 10 minutos de reperfusión en el hígado de la rata donante previo a la perfusión del hígado con la solución UW. El tiempo de PC utilizado ha demostrado ser eficaz frente al daño por I/R hepática en el modelo de trasplante hepático con injerto esteatósico [125,252].
11. Trasplante hepático + activador del AMPK (TH+AMPK activador) (n=12 ratas Zucker; 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleosido (AICAR) (Toronto Research Chemicals, North York, ON, Canadá), un activador de la AMPK, a dosis de 100 mg/kg por vía intravenosa, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [125].
12. Precondicionamiento isquémico + Trasplante hepático + inhibidor del AMPK (PCI+TH+AMPK inhibidor) (n=12 ratas Zucker; 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con PC inducido por 5 minutos de isquemia seguido de 10 minutos de reperfusión en el hígado de la rata donante previo a la perfusión del hígado con la solución UW [125,252]; y administración previa de adenina 9-β-D-arabinofuranosido (ara-A) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), un inhibidor del AMPK, a dosis de 100 μg/kg/min por vía intravenosa durante 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante [125].

Después de 4 horas de reperfusión, se recogieron muestras de plasma e hígado de los grupos experimentales descritos. En las muestras de tejido hepático se determinaron los niveles de adiponectina y resistina y se evaluó la vía PI3K/Akt en los grupos experimentales 1, 2.1, 3.1, 7 y 8 (Protocolo 1) y 10, 11 y 12 (Protocolo 2).

<b>Diseño Experimental del Estudio 3</b>	
<b><i>El papel de las Adipocitoquinas en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos procedente de ratas Zucker</i></b>	
<b>Protocolo 1. Papel de la adiponectina, la visfatina y la resistina en la lesión hepática por I/R asociada al trasplante de injertos esteatósicos y no esteatósicos</b>	
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sham (n=12, 6 injertos Ob y 6 injertos Ln)</li> <li>2. TH (12 trasplantes)               <ol style="list-style-type: none"> <li>2.1 TH Ob (6 injertos Ob)</li> <li>2.2 TH Ln (6 injertos Ln)</li> </ol> </li> <li>3. TH+Adiponectina (12 trasplantes)               <ol style="list-style-type: none"> <li>3.1 TH+Adiponectina Ob (6 injertos Ob)</li> <li>3.2 TH+Adiponectina Ln (6 injertos Ln)</li> </ol> </li> <li>4. TH+Adiponectina+anti-Adiponectina (6 trasplantes, 6 injertos Ob)</li> <li>5. TH+Visfatina (12 trasplantes)               <ol style="list-style-type: none"> <li>5.1 TH+Visfatina Ob (6 injertos Ob)</li> <li>5.2 TH+Visfatina Ln (6 injertos Ln)</li> </ol> </li> <li>6. TH+anti-Visfatina (6 trasplantes, 6 injertos Ob)</li> <li>7. TH+Adiponectina+anti-Resistina (6 trasplantes, 6 injertos Ob)</li> <li>8. TH+Resistin (12 trasplantes)               <ol style="list-style-type: none"> <li>8.1 TH+Resistin Ob (6 injertos Ob)</li> <li>8.2 TH+Resistin Ln (6 injertos Ln)</li> </ol> </li> <li>9. TH+Resistina+anti-Adiponectin (6 trasplantes, 6 injertos Ob)</li> </ol>	<p>Grupos 1, 2: Niveles y expresión de adiponectina, visfatina y resistina e inmunolocalización de adiponectina y resistina, 4 horas después de reperusión.</p> <p>Grupos 1 a 8: Transaminasas, estudio histológico, caspasa 3 y TUNEL, 4 horas después de reperusión.</p> <p>Grupos 2.1, 3.1, 7 y 8: Supervivencia del receptor durante 14 días</p>
<b>Protocolo 2. Efecto del AMPK sobre adiponectina, resistina y la vía del PI3K/AKT en el trasplante hepático de injertos esteatósicos</b>	
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>
<ol style="list-style-type: none"> <li>10. PC+TH (6 trasplantes, 6 injertos Ob)</li> <li>11. TH+AMPK activador (6 trasplantes, 6 injertos Ob)</li> <li>12. PC+TH+AMPK inhibidor (6 trasplantes, 6 injertos Ob)</li> </ol>	<p>Grupos 1, 2.1, (Protocolo 1), 10, 11 y 12 (Protocolo 2): Niveles y expresión de adiponectina y resistina 4 horas después de reperusión.</p> <p>Grupos 1, 2.1, 3.1, 7 y 8 (Protocolo 1), 10, 11 y 12 (Protocolo 2): Vía del PI3K/Akt 4 horas después de reperusión.</p>
<b>Protocolo de administración de los fármacos utilizados</b>	
<i>Fármaco</i>	<i>Dosis y tiempo de pre-tratamiento</i>
Adiponectina	Adiponectina recombinante 1.5 mg/kg vía intravenosa, 20 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
anti-Adiponectina	Anticuerpo anti-Adiponectina 3 mg/kg vía intravenosa, 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante
Visfatina	Visfatina recombinante 50 µg/kg vía intravenosa, 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
anti-Visfatina	Anticuerpo anti-Visfatina 500 µg/kg vía intravenosa, 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
Resistina	Resistina recombinante 100 µg/kg vía intravenosa, 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
anti-Resistina	Anticuerpo anti-Resistina 1 mg/kg vía intravenosa, 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
AICAR	Activador AMPK 100 mg/kg vía intravenosa, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
Ara A	Inhibidor AMPK 100 µg/kg vía intravenosa, 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.

**Tabla 8.** Diseño experimental y determinaciones analíticas del Estudio 3.

## 4. Recogida y procesamiento de las muestras

En todos los grupos experimentales de los tres estudios, y con el animal anestesiado, se recogieron muestras de sangre y tejido hepático. Las muestras de sangre se tomaron de la vena cava inferior infrahepática, utilizando heparina como anticoagulante. Estas muestras se mantuvieron a 4°C hasta centrifugarse a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C para obtener el plasma. El plasma se mantuvo congelado a -80°C hasta la realización de las determinaciones analíticas correspondientes. Inmediatamente después de recoger las muestras de tejido hepático, una parte de este se congeló con nieve carbónica y se mantuvo a -80°C hasta su posterior procesamiento. Otra parte del tejido hepático se fijó en formaldehído tamponado al 4% para realizar después su inclusión en parafina y posteriormente el estudio histológico e inmunohistoquímico.

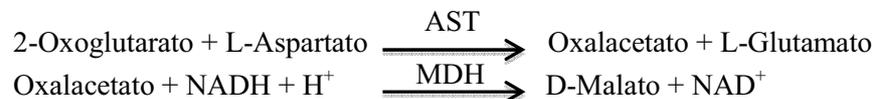
## 5. Determinaciones bioquímicas

### 5.1 Transaminasas

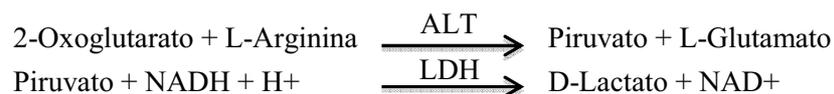
Las transaminasas aspartato amino transferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) son enzimas citoplasmáticas muy abundantes en el hígado que se encargan de realizar la conversión de un aminoácido en un ácido carboxílico y participan en el metabolismo de los aminoácidos. En condiciones normales estas enzimas se encuentran en el citoplasma, pero cuando existe una lesión hepática son liberadas al plasma. De esta forma la determinación de los niveles de estas enzimas se ha utilizado como parámetro de lesión hepática.

La actividad de estas enzimas se determinó mediante kit comercial (RAL, Barcelona, España). El ensayo enzimático mide la desaparición de nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida (NADH) mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 365 nm, según las siguientes reacciones:

Para la AST:



Para la ALT:



Donde el NAD<sup>+</sup>, es la nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada. Los resultados obtenidos se expresaron en UI/L.

## 5.2 Ensayo Colorimétrico de MDA

El malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica y se utilizó como parámetro bioquímico indirecto de estrés oxidativo inducido por los RLO [373]. Los niveles de MDA se determinaron en muestras de hígado mediante el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) [374]. En condiciones ácidas y a altas temperaturas el MDA reacciona con el TBA para dar lugar a un compuesto de color rosa, cuantificable por espectrofotometría.

Las muestras de tejido hepático congelado se homogenizaron en 2 ml de tampón Tris Base 0.1 M a pH 7 y se determinó la concentración de proteínas totales en el mismo, siguiendo el procedimiento descrito previamente en el apartado correspondiente. A 250 µl de este homogenado se le añadieron 250 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 40% para precipitar las proteínas. Se mezclaron en un agitador tipo vórtex y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se le añadió 250 µl de TBA 0.67% y se llevó a ebullición a 100°C durante 15 minutos. Se desarrolló un color proporcional a la cantidad de MDA presente en las muestras [273].

Para la elaboración de la recta patrón, se preparó un estándar de MDA disolviendo 120 µl de 1,1,3,3-tetrahidroxipropano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en 50 ml de ácido clorhídrico (HCl) 0.1M; esta solución se calentó durante una hora a 50°C. Para la preparación de la recta de calibración se añadieron 50 µl de esta solución en 5 ml de agua. De esta solución así preparada, se tomaron 2.5 mL y se añadieron a 2.5 ml de agua, siendo éste el punto más concentrado de la recta patrón (50 nmoles/ml), a partir de ésta se hicieron 6 diluciones seriadas a la mitad. Como blanco se utilizó agua destilada. Los estándares y el blanco fueron sometidos al mismo procedimiento que las muestras a partir del tratamiento con TCA. Así pues, tras dejar enfriar, se determinó la intensidad de color midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm. Los resultados se expresaron en nmol MDA/mg proteína.

## 5.3 Actividad de la Mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa (MPO) es un enzima que se encuentra en el interior de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos polimorfonucleares; y se utiliza como marcador de la presencia de estas células en el tejido inflamado [375,376]. En esta tesis se utilizó como parámetro de infiltración y actividad de neutrófilos en el tejido hepático.

Este enzima cataliza la formación de ácido hipocloroso a partir de peróxido de hidrógeno:



El método se basa en la reacción de la tetrametilbencidina catalizada por la MPO. Es importante conseguir una buena extracción de la enzima, y para ello las muestras se homogenizaron en tampón fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05 M, pH 6) con hexadecirtrimetilamonio de bromuro (HTBA) 0.5%, posteriormente se sonicaron durante 30 segundos al 20% de potencia. Tras pasar tres ciclos de

congelación/descongelación en nieve carbónica, las muestras se incubaron durante 2 horas a 60°C para eliminar la actividad de las peroxidasas inespecíficas y los inhibidores de la MPO que pudieran afectar a la determinación. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras durante 12 minutos a 3000-4000 g a 4°C y se recuperó el sobrenadante [274].

A 5 µl del sobrenadante se le añadieron 10 µl de reactivo de tetrametilbencidina (TMB) 5 mg/ml disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO). A tiempo cero (t:0) se añadió 70 µl de tampón fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM, pH 5.4) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.05% y se determinó la cinética enzimática de la MPO, leyendo la absorbancia durante 3 minutos cada 15 segundos a una longitud de onda de 630 nm. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto.

#### 5.4 Ensayo inmunoenzimático de nitrotirosinas

Gran parte de los efectos perjudiciales del NO son mediados por el OONO<sup>-</sup>, un producto de la reacción entre el NO y el superóxido, altamente oxidante y citotóxico. Entre los efectos nocivos del OONO<sup>-</sup> se destacan: la nitrosilación de los residuos de tirosina de las proteínas, la peroxidación de lípidos y la rotura del DNA. El OONO<sup>-</sup> es una molécula muy inestable y altamente reactiva por lo que su producción es únicamente demostrable de forma indirecta, por ejemplo a través de los productos que forma, por ello la determinación de los niveles de nitrotirosinas se utiliza como marcador indirecto de la formación de OONO<sup>-</sup> [377].

Para la determinación de los niveles de nitrotirosinas en el tejido hepático, las muestras se homogenizaron en 10 volúmenes de tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.4 a 4°C, posteriormente se centrifugaron a 20 000 g durante 30 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se determinó en el mismo la concentración de proteínas totales siguiendo el protocolo descrito en el apartado correspondiente [125,378].

La cuantificación de los niveles de nitrotirosinas en el sobrenadante se llevó a cabo mediante un kit comercial inmunoenzimático (HyCult Biotech, Uden, Holya) siguiendo las indicaciones del fabricante. En resumen, las muestras y los estándares se incubaron en pocillos cubiertos con anticuerpos anti-nitrotirosina. Durante la incubación las nitrotirosinas presentes en la muestra fueron capturadas por el anticuerpo y el material presente en la muestra que no se unió al anticuerpo se eliminó por lavado. Posteriormente se añadió un anticuerpo secundario biotinilado que se unió a las nitrotirosinas capturadas y después se adicionó un conjugado peroxidasa-estreptavidina (SA-HRP) que reaccionó de forma específica con el anticuerpo secundario unido a las nitrotirosinas capturadas. Finalmente se utilizó TMB para desarrollar un compuesto coloreado. El color obtenido es proporcional a la cantidad de nitrotirosinas presentes en la muestra y la intensidad del color es determinada a través de la medición de la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados se expresaron en pmol/mg proteína.

## 5.5 Ensayo colorimétrico de nitritos y nitratos

El NO puede reaccionar con numerosas moléculas presentes en el organismo y generar como productos finales *in vivo* el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). La proporción relativa de nitritos y nitratos es variable y no puede ser determinada con certeza, así pues el mejor índice de la producción total de NO es la suma de ambos [379].

La producción de NO en el tejido hepático se determinó midiendo la acumulación de nitritos y nitratos, para lo cual, las muestras de tejido hepático se homogenizaron en frío en 2 mL de tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7.4 y enseguida se determinó la concentración de proteínas totales en el homogenado. Posteriormente, se desproteinizó el homogenado mezclando 500  $\mu\text{l}$  de homogenado con 100  $\mu\text{l}$  de HCl 1 N en un agitador tipo vórtex. Después de centrifugar, se recuperó el sobrenadante y se ajustó a pH 7.6 con 100  $\mu\text{l}$  de NaOH 1 N y 300  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 100 mM [125,231]. Los niveles de nitritos y nitratos se determinaron en el sobrenadante mediante un kit comercial (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo se describe brevemente a continuación.

El kit colorimétrico para determinar nitritos y nitratos requiere de un proceso de dos etapas. El nitrato se redujo a nitrito por incubación durante 3 horas con nitrato reductasa en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH) y flavina adenina dinucleótido (FAD). En el segundo paso se determinó la concentración de nitritos mediante el reactivo de Griess que convierte el nitrito en un compuesto coloreado. La intensidad del color desarrollado se determinó a través de espectrofotometría midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Los resultados se expresaron en nmol/mg proteína.

## 5.6 Niveles de glutatión

El GSH es un tripéptido no proteico que se deriva de los aminoácidos y que actúa como antioxidante debido a su capacidad de reaccionar con compuestos oxidantes, convirtiéndose en su forma oxidada disulfuro de glutatión (GSSG). El GSH se encuentra casi exclusivamente en su forma reducida, ya que la enzima que vuelve de su forma oxidada, la glutatión reductasa, es constitutivamente activa e inducible al estrés oxidativo, por tanto cuando un tejido está sometido a estrés oxidativo se produce una disminución de GSH.

El método se basa en la reacción entre el 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu y GSH catalizada por la glutatión transferasa. Esta reacción genera como producto el S-2,4-dinitrofenil-glutation que presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 330 a 360 nm [380].

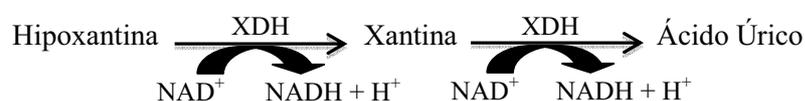
Se homogenizaron las muestras en tampón KCl 1.15% y se determinó la concentración de proteínas en el mismo. Posteriormente se precipitaron las proteínas con  $\text{HClO}_4$  1 N, se centrifugaron las muestras a 15000 g y el sobrenadante se neutralizó con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  al 10% a 4°C. La curva patrón se obtuvo a partir de GSH 1 mM por sucesivas diluciones mitad y se procesó de la misma forma que las muestras. Para la determinación se añadió el reactivo de CDNB (1-clorooro-2,4-

dinitrobenzeno), en tampón fosfato potásico 0.2 M pH 7 y EDTA 10 mM) a 50  $\mu$ l de blanco, de la curva y de las muestras, se realizó una lectura a dos longitudes de onda, la primera a 340 nm y la segunda a 405 nm y entonces se añadió 5  $\mu$ l de GST (disuelto en el mismo tampón fosfato a una concentración de 12 U/L). Transcurridos 5 minutos se volvió a leer la absorbancia a ambas longitudes de onda. La concentración de GSH se obtuvo restando las absorbancias obtenidas en cada tiempo a las dos longitudes de onda y después restando estos dos valores resultantes. Los resultados obtenidos se expresaron en  $\mu$ mol glutatión/mg proteína.

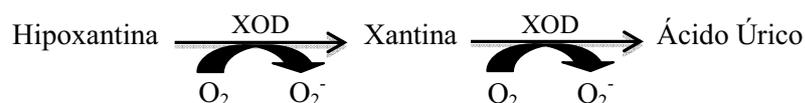
## 5.7 Actividad de la xantina deshidrogenasa y xantina oxidasa

La enzima XDH/XOD se encuentra ampliamente distribuido en el organismo e interviene en el metabolismo final de degradación de los ácidos nucleicos. Se encuentra en el citoplasma de la célula en forma de XDH; la forma deshidrogenasa puede pasar a la forma oxidasa de forma reversible por la reducción de puentes disulfuro o la acción de proteasas citoplasmáticas dependientes de calcio. Así pues, al homogenizar es muy importante hacerlo a 4°C y en presencia de inhibidores de proteasas como el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y de agentes que estabilicen los puentes disulfuro como el ditioneitol (DTT) para evitar su conversión durante el procesamiento de las muestras.

Se diferencian en la molécula que utilizan como aceptor de electrones, mientras que la forma deshidrogenasa utiliza  $\text{NAD}^+$  como aceptor de electrones, la forma oxidasa utiliza la molécula de oxígeno generando  $\text{O}_2^-$ . Las reacciones que catalizan son para su forma deshidrogenasa:



y en su forma oxidasa:



Las muestras de tejido hepático se homogenizaron en 100 mM de tampón Tris, que contenía ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 10 mM, 1 mM PMSF y 1 mM de DTT. El homogenado se centrifugó a 15000 g a 4°C, se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas en el mismo.

El sobrenadante se pasó por cromatografía de columna Sephadex G-25 80 en el mismo tampón a 4°C. Los eluatos resultantes se utilizaron para medir la actividad XDH y XOD. Las actividades se midieron por espectrofotometría mediante la detección del ácido úrico que se forma por la acción de estas enzimas. Se determinó la aparición de ácido úrico a una longitud de onda de 292 nm con presencia de  $\text{NAD}^+$  (para medir actividad total XDH+XOD) o ausencia de  $\text{NAD}^+$  (para medir la

actividad específica XOD). Se utilizó xantina (60 mM) como sustrato. Se determinó la cinética del enzima durante 5 minutos a 20°C. Los resultados se expresaron en mU/g tejido seco [381].

### 5.8 Actividad de la superóxido dismutasa

El enzima SOD cataliza la reacción de dismutación del  $O_2^-$  por reacción con una molécula de  $H_2O$ , dando lugar a  $H_2O_2$  y  $O_2$ :



La técnica de determinación de SOD se basa en la capacidad del  $O_2^-$  de reducir la molécula de nitroazul de tetrazolio (NBT) a formazán, que tiene un color azulado que absorbe a una longitud de onda de 540 nm. Si en el medio hay SOD, eliminará los  $O_2^-$  y se inhibirá la formación de formazán. Como fuente de  $O_2^-$  se utilizó el sistema X/XOD [382].

Las muestras de tejido hepático se homogenizaron en 100 mM de tampón Tris, que contenía EDTA 10 mM, PMSF 1 mM y DTT 1 mM pH 8.1 y se determinó la concentración de proteínas en el homogenado. Para la preparación de la curva estándar se utilizó una disolución de SOD de concentración 32 U/ml como punto más concentrado y se hicieron 6 diluciones seriadas. Se dispensaron 20  $\mu$ l de muestra y se añadieron 20  $\mu$ l de XOD (200 U/l) excepto en el blanco; se añadieron 200  $\mu$ l de tampón de reacción ( $Na_2CO_3$  0.05 M pH10.2); xantina  $10^{-4}$  M; EDTA  $10^{-4}$  M y NBT  $2.5 \times 10^{-5}$  M) y se realizó una cinética con lecturas durante 15 minutos cada 30 segundos a una longitud de onda de 540 nm. Los resultados se expresaron en U/mg proteína.

### 5.9 Análisis de nucleótidos

La determinación del contenido de nucleótidos de adenina (ATP+ADP+AMP), nucleósidos de adenina (adenosina+inosina) y bases (xantina+hipoxantina) se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [383]. Brevemente, las muestras de hígado se homogeneizaron en 10 volúmenes de  $HClO_4$  al 3.6%. Tras la homogenización, se llevó a cabo su extracción a 0.5°C durante 30 minutos, para posteriormente ser centrifugadas a 850 g durante 15 minutos. Los sobrenadantes se ajustaron a pH 6 y se centrifugaron a 14000 rpm. Los perfiles de nucleótidos y productos de degradación se obtuvieron usando una columna de fase reversa Spherisob ODS (C18, 5  $\mu$ m de medida de partícula 15x0.4 cm, Teknokroma, Sant Cugat, España), acoplado a un cromatógrafo líquido 600 (Waters, Milford, MA) conectado a un detector ultravioleta. Las separaciones de los diferentes nucleótidos y productos de degradación del ATP se realizaron a 254 nm. Los resultados obtenidos se expresaron en pmol/g de tejido húmedo.

### 5.10 Actividad de la caspasa 3

La caspasa 3 es una proteína perteneciente a una familia de cisteína-proteasas que está implicada en las fases finales de la muerte celular por apoptosis. Para la determinación de la actividad de la

caspasa 3 en tejido hepático las muestras se homogenizaron en frío en un tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, Dodecilsulfato de sodio (SDS) 0.1%, Deoxicolato de sodio 1%; y posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Una vez recogido el sobrenadante, se determinó la concentración de proteínas [138].

La actividad de la caspasa 3 se determinó en el sobrenadante mediante un kit comercial inmunoenzimático (Calbiochem, San Diego, CA, USA) que emplea un sustrato colorimétrico Ac-DEVD-pNA (N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina) que tras su escisión por la caspasa 3 presenta un incremento de absorción a una longitud de onda de 405 nm. Para ello las muestras se disolvieron en 90 µl de tampón de ensayo y tras la adición de 10 µl de sustrato colorimétrico, la absorbancia se leyó a una longitud de onda de 405 nm cada minuto durante 1 hora. La cantidad de color amarillo producido es proporcional a la actividad de la caspasa 3 presente en la muestra. Los resultados obtenidos se expresaron en pmol/min.

### 5.11 Ensayo inmunoenzimático del TNF

Las muestras de hígado se homogenizaron en 1.5 ml de tampón fosfato 50 mM a pH 6. Los homogenados se centrifugaron a 4000 g durante 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes se decantaron y conservaron a -40°C para su posterior determinación [384]. La cuantificación del TNF- $\alpha$  total, libre y unido a proteína se realizó en el sobrenadante mediante un kit comercial inmunoenzimático competitivo (Chemicon International, Temecula, CA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la determinación de los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  libre se utilizó un kit de ELISA (Biosource, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados obtenidos se expresaron en pg/ml.

### 5.12 Determinación de Interleuquina-1

Las muestras de tejido hepático se homogenizaron en un tampón fosfato 50 mM a pH 6, PMSF 2 mM, antipaina 1 mg/ml, leupeptina 1 mg/ml y pepstatina A 1 mg/ml. Los homogenados se centrifugaron a 100000 g durante 1 hora a 15°C y los sobrenadantes se conservaron a -80°C para su posterior determinación de IL-1 [273].

La cuantificación de los niveles de IL-1 se determinó en el sobrenadante mediante un kit comercial inmunoenzimático (Amersham Life Science, UK) siguiendo las indicaciones del fabricante. En resumen, las muestras y los estándares se incubaron en placas que presentan adheridos anticuerpos de rata frente a IL-1 $\alpha$  y IL-1  $\beta$ . Posteriormente se añadió un anticuerpo secundario biotinilado que se une a las IL-1 capturadas, y después se añadió un conjugado de estreptavidina con peroxidasa que reaccionó de forma específica con el anticuerpo secundario unido a las IL-1 capturadas. Finalmente se utilizó TMB para desarrollar un compuesto coloreado. El color obtenido fue proporcional a la cantidad de IL-1 presente en la muestra y la intensidad del color se determinó midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados se expresaron en pg/mg proteína.

### 5.13 Determinación de la interleuquina-6

Las muestras de tejido hepático se homogenizaron en un tampón Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, tritón-X100 y un coctel de inhibidores de proteasas (Complete mini, Roche, Switzerland). El homogenado se centrifugó 3000 g durante 15 minutos a 4°C [385]. Una vez recogido el sobrenadante, se cuantificaron los niveles de IL-6 mediante un kit comercial inmunoenzimático (Biosource, Camarillo, CA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 5.14 Ensayo inmunoenzimático para las adipocitoquinas: adiponectina, visfatina y resistina

Para determinar los niveles de las adipocitoquinas: adiponectina, resistina y visfatina, las muestras de tejido hepático se homogenizaron en frío en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Deoxicolato de sodio 1% y Nonidet P40 1%) conteniendo también EDTA 5mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 50 mM, DTT 1 mM y una tableta del cóctel de inhibidores de proteasas Complete por cada 50 ml de tampón (Roche, Basilea, Suiza). Los homogenados se incubaron 20 minutos en hielo y después se centrifugaron a 10 000 g durante 30 minutos a 4°C [386]. Se recuperaron los sobrenadantes y se determinaron la adiponectina, resistina y visfatina en los mismos utilizando un kit comercial para adiponectina y resistina respectivamente (AdipoGen, Seúl, Corea) y otro kit comercial para visfatina (B-Bridge International, CA, USA). A continuación se describe brevemente el protocolo general que se siguió para el ensayo inmunoenzimático de la adiponectina que es extrapolable al de resistina y visfatina respectivamente.

El kit utilizado para la determinación de adiponectina es un ensayo inmunoenzimático en el cual un anticuerpo policlonal específico para la adiponectina de rata está inmovilizado en los pocillos de una inmunoplaaca. Las muestras se colocaron en los pocillos y de esta manera, cualquier adiponectina presente en las muestras es capturada por el anticuerpo policlonal anti-adiponectina que se encuentra inmovilizado en los pocillos. Posteriormente, después de lavar la inmunoplaaca, se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa. Después de lavar nuevamente la inmunoplaaca, se añadió un substrato que reacciona con la peroxidasa y se desarrolló entonces el color. La intensidad del color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de adiponectina unida en el pocillo. Finalmente se añade una solución para detener el desarrollo del color y la intensidad del color fue determinada midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados obtenidos se expresaron en ng/g de tejido hepático.

### 5.15 Proteínas totales

Las proteínas en los diferentes homogenizados obtenidos a partir de tejido hepático se determinaron mediante el método colorimétrico de Bradford con un reactivo comercial (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Este método se basa en el cambio de absorbancia que en solución ácida presenta el colorante azul de Coomassie en respuesta a diferentes concentraciones

de proteínas. La concentración de proteínas en la muestra es directamente proporcional a la absorbancia observada a una longitud de onda de 595 nm. Para la curva patrón se utilizó una solución de albúmina de 4.75 mg/ml, a partir de la cual se realizaron 6 diluciones seriadas. Los resultados obtenidos se expresaron en mg/ml.

## 6. Técnicas de Biología Molecular

### 6.1 Western blot de la eNOS e iNOS

Para determinar eNOS e iNOS, se homogenizaron las muestras de tejido hepático a 4°C en un tampón de Tris base 20 mM, pH 8.0, que contenía EDTA 10 mM, NaCl 140 mM, glicerol 10%, Nonidet P40 1%, aprotinina 2.5 µg/ml, PMSF 2 mM e inhibidor de tripsina de soja 60 µg/ml. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C [125,387]. Se separaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de proteínas totales en los mismos siguiendo el procedimiento descrito en el correspondiente apartado.

A continuación se procedió a realizar la técnica de Western blot para la detección de eNOS e iNOS. Para esto se mezclaron alícuotas de los homogenados con un tampón de carga de electroforesis que contenía β-mercaptoetanol y tampón Laemli en proporción 1:20. La proporción del homogenado y el tampón de carga fue 1:1. Las proteínas se desnaturalizaron calentando la mezcla a 95°C durante 10 minutos. Se cargaron 50 µg de proteína y se separaron las proteínas de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en un gel de poliacrilamida/SDS al 6% a un voltaje constante de 120 mV. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) con una intensidad de 350 mA durante 120 minutos. Las membranas se incubaron en un tampón de bloqueo formado por una solución salina tamponada con Tris que contiene Tween-20 (TTBS) a pH 7.5 y leche en polvo no grasa al 5% durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C ya sea con el anticuerpo primario monoclonal anti-eNOS de rata o con el anticuerpo primario monoclonal anti-iNOS de rata (ambos de BD Transduction laboratorios, Lexington, KY, USA) preparado en dilución 1:500 disuelto en tampón de bloqueo. Al día siguiente, las membranas se lavaron con TTBS pH 7.5 y después se incubaron con el anticuerpo secundario durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) que fue preparado en dilución 1:5000 disuelto en tampón de bloqueo. Después de lavar la membrana con TTBS y finalmente con solución salina tamponada con Tris (TBS), se detectaron las proteínas mediante el kit de quimioluminiscencia Immun-Star HRP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar preteñido Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Para eNOS se detectó una banda a 140 kDa y para iNOS se detectó una banda a 130 kDa.

La estimación cuantitativa de las proteínas en las membranas se estandarizó respecto a la  $\beta$ -actina. Para ello las membranas se re-incubaron con un anticuerpo primario anti- $\beta$ -actina de rata (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) preparado en dilución 1:1000 disuelto en tampón que contenía TTBS pH 7.5 y leche en polvo no grasa 5%, durante toda la noche a 4°C y se siguió el proceso descrito para el Western blot de la eNOS e iNOS hasta obtener la señal de la  $\beta$ -actina con el kit de quimioluminiscencia mencionado previamente. El anticuerpo secundario para el Western blot de  $\beta$ -actina fue un anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) preparado en dilución 1:5000 disuelto en el mismo tampón utilizado para el anticuerpo primario. Para la  $\beta$ -actina se detectó una banda a 42 kDa.

La estimación cuantitativa de las proteínas de interés se realizó por densitometría, utilizando el sistema de análisis de imagen Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los resultados obtenidos se expresaron en unidades arbitrarias.

## 6.2 Western Blot para la vía del UPR del estrés del retículo endoplasmático

Se determinaron GRP78, proteína homóloga-10 C/EBP (CHOP), PERK total y fosforilada, factor de iniciación en eucariontes  $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) total y fosforilada, factor activador de la transcripción 4 (ATF4), ATF6 $\alpha$ , proteína de unión 1 caja X (XBP-1) y factor asociado al receptor del TNF 2 (TRAF2) en tejido hepático. Con tal finalidad, las muestras de hígado se homogenizaron a 4°C en un tampón de Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, NaF 50 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0.1 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tritón X-100 0.05%, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 5 mM y una tableta del cóctel de inhibidores de proteasas complete por cada 50 ml de tampón (Roche, Basilea, Suiza). Los homogenados se incubaron 15 minutos en hielo y se centrifugaron a 15 000 g durante 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se recuperaron y se determinó la concentración de proteínas totales en los mismos siguiendo el procedimiento descrito en el correspondiente apartado.

A continuación se procedió a realizar la técnica de Western blot para la detección de GRP78, CHOP, PERK y eIF2 $\alpha$  total y fosforilada, ATF4, ATF6 $\alpha$ , sXBP-1 y TRAF2 de manera similar a como se ha descrito en el apartado de Western blot de eNOS e iNOS. En resumen, se mezclaron alícuotas de los homogenados con un tampón de carga de electroforesis en proporción 1:1. Se desnaturalizaron las proteínas y se cargaron 100  $\mu$ g de proteína. A continuación se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida/SDS al 12% para CHOP, eIF2 $\alpha$  total y fosforilada, y sXBP-1, al 10% para ATF4 y TRAF2, al 8% para GRP78, ATF6 $\alpha$  y ATF6 $\beta$  y al 6% para PERK total y fosforilada a un voltaje constante de 120 mV para separar las proteínas. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF con una intensidad de 370 mA durante 70 minutos. Las membranas se incubaron en un tampón de bloqueo formado por TTBS pH 7.5 y leche en polvo no grasa al 5% durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con uno de los siguientes anticuerpos: anticuerpo primario policlonal anti-GRP78, anti-ATF6 $\alpha$ , anti-PERK y anti-PERK fosforilada, anti-ATF4 y anti-sXBP-1 de conejo, anticuerpo primario policlonal anti-CHOP de rata, anticuerpo primario monoclonal anti-eIF2 $\alpha$  total y anti-eIF2 $\alpha$  fosforilada de conejo (Santa Cruz

Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), anticuerpo primario monoclonal anti-TRAF2 de rata (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), preparados en dilución 1:1000 disueltos en tampón de bloqueo. Al día siguiente, las membranas se lavaron y después se incubaron con el anticuerpo secundario durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de rata o conejo conjugado con peroxidasa respectivamente (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) que fue preparado en dilución 1:2000 disuelto en tampón de bloqueo. Después de lavar la membrana, se procedió a realizar la detección de las proteínas mediante el kit de quimioluminiscencia Immun-Star HRP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar preteñido Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Las bandas que se detectaron fueron: una banda de 78 kDa para GRP78, una banda de 30 kDa para CHOP, una banda de 125 kDa para PERK fosforilada, una banda de 36 kDa para eIF2 $\alpha$  fosforilada, una banda de 43 kDa para ATF4, una banda de 90 kDa para ATF6 $\alpha$ , una banda de 29 kDa para sXBP-1 y una banda de 50 kDa para TRAF2. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias.

La estimación cuantitativa de las proteínas en las membranas se estandarizó respecto a la  $\beta$ -actina. Para ello las membranas fueron procesadas tal y como se ha indicado en el apartado del Western blot de eNOS e iNOS donde también se describe el Western blot de  $\beta$ -actina. La banda de la  $\beta$ -actina se detectó a 42 kDa. La estimación cuantitativa de las proteínas de interés se realizó por densitometría, utilizando el sistema de análisis de imagen Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los resultados obtenidos se expresaron en unidades arbitrarias

### 6.3 Western blot del PPAR $\gamma$

Para determinar PPAR $\gamma$ , se homogenizaron muestras de tejido hepático a 4°C en un tampón RIPA, que contenía Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Deoxicolato de sodio 1%, Nonidet P40 1%, EDTA 5mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 50 mM, DTT 1 mM y una tableta del cóctel de inhibidores de proteasas complete por cada 50 ml de tampón (Roche, Basilea, Suiza). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 4°C, se separaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de proteínas totales en los mismos siguiendo el procedimiento descrito en el correspondiente apartado.

A continuación se procedió a realizar la técnica de Western blot para la detección de PPAR $\gamma$  de manera similar a como se ha descrito en el apartado de Western blot de eNOS e iNOS. En resumen, se mezclaron alícuotas de los homogenados con un tampón de carga de electroforesis en proporción 1:1. Se desnaturalizaron las proteínas y se cargaron 100  $\mu$ g de proteína. A continuación se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida/SDS al 10% a un voltaje constante de 105 mV para separar las proteínas. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF con una intensidad de 120 mA durante 90 minutos y de 330 mA durante una hora más. Las membranas se incubaron en un tampón de bloqueo formado por TTBS pH 7.5 y leche en polvo no grasa al 3% durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario policlonal anti-PPAR $\gamma$  de conejo

(Abcam, Cambridge, MA) preparado en dilución 1:125 disuelto en tampón de bloqueo. Al día siguiente, las membranas se lavaron y después se incubaron con el anticuerpo secundario durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) que fue preparado en dilución 1:2000 y disuelto en tampón de bloqueo. Después de lavar la membrana, se procedió a realizar la detección de las proteínas mediante el kit de quimioluminiscencia Immun-Star HRP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar preteñido Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Para PPAR $\gamma$  se detectó una banda a 54 kDa.

La estimación cuantitativa de las proteínas en las membranas se estandarizó respecto a la  $\beta$ -actina. Para ello las membranas se procesaron tal y como se ha indicado en el apartado del Western blot de eNOS e iNOS donde también se describe el Western blot de  $\beta$ -actina. La banda de la  $\beta$ -actina se detectó a 42 kDa. La estimación cuantitativa de las proteínas de interés se realizó por densitometría, utilizando el sistema de análisis de imagen Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los resultados obtenidos se expresaron en unidades arbitrarias.

#### **6.4 Western blot de la vía del TLR4, el PI3K y el Akt**

Se determinaron el TLR4, MyD88 y TRIF (de la vía del TLR4) y PI3K y Akt (total y fosforilada) en tejido hepático. Con tal finalidad, las muestras de hígado se homogenizaron a 4°C en un tampón de Tris-HCl 50 mM pH 7.5, que contenía NaCl 150 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, NaF 50 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0.1 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tritón X-100 0.05%, y una tableta del cóctel de inhibidores de proteasas complete por cada 50 ml de tampón (Roche, Basilea, Suiza). Los homogenados se incubaron 15 minutos en hielo y se centrifugaron a 15 000 g durante 20 minutos a 4°C [90,388]. Los sobrenadantes se recuperaron y se determinó la concentración de proteínas totales en los mismos siguiendo el procedimiento descrito en el correspondiente apartado.

A continuación se procedió a realizar la técnica de Western blot para la detección de TLR4, MyD88, TRIF, PI3K y Akt de manera similar a como se ha descrito en el apartado de Western blot de eNOS e iNOS. En resumen, se mezclaron alícuotas de los homogenados con un tampón de carga de electroforesis en proporción 1:1. Se desnaturalizaron las proteínas y se cargaron 100  $\mu$ g de proteína. A continuación se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida/SDS al 12% para MyD88, al 8% para TRIF, al 7,5% para TLR4, PI3K y Akt, y todos ellos a un voltaje constante de 120 mV para separar las proteínas. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF con una intensidad de 370 mA durante 70 minutos. Las membranas se incubaron en un tampón de bloqueo formado por TTBS pH 7.5 y leche en polvo no grasa al 3% durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con uno de los siguientes anticuerpos: anticuerpo primario policlonal anti-MyD88 de rata, anticuerpo primario monoclonal anti-TLR4 de rata, anticuerpo primario policlonal anti-Akt total y anti-Akt fosforilada de conejo (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), anticuerpo primario policlonal anti-TRIF de conejo (Abcam, UK) y anticuerpo primario

monoclonal anti-PI3K de conejo (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) preparados en dilución 1:500 y disueltos en tampón de bloqueo. Al día siguiente, las membranas se lavaron y después se incubaron con el anticuerpo secundario durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo y de rata conjugado con peroxidasa respectivamente (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) que fue preparado en dilución 1:2000 y disuelto en tampón de bloqueo. Después de lavar la membrana, se procedió a realizar la detección de las proteínas mediante el kit de quimioluminiscencia Immun-Star HRP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar preteñido Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Las bandas que se detectaron fueron: una banda de 33 kDa para MyD88, una banda de 62 kDa para el Akt total y fosforilada, una banda a 66 kDa para TRIF, una banda de 85 kDa para el PI3K y una banda de 95 kDa para el TLR4. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias.

La estimación cuantitativa de las proteínas en las membranas se estandarizó respecto a la  $\beta$ -actina. Para ello las membranas fueron procesadas tal y como se ha indicado en el apartado del Western blot de eNOS e iNOS donde también se describe el Western blot de  $\beta$ -actina. La banda de la  $\beta$ -actina se detectó a 42 kDa. La estimación cuantitativa de las proteínas de interés se realizó por densitometría, utilizando el sistema de análisis de imagen Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los resultados obtenidos se expresaron en unidades arbitrarias

### **6.5 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de las adipocitoquinas: adiponectina, visfatina y resistina**

La detección de la expresión génica (RNAm) de las adipocitoquinas: Adiponectina, visfatina y resistina en tejido hepático se realizó a través de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Como primer paso se realizó una extracción de RNA de tejido hepático. Para esto se utilizaron dos kits comerciales, el RNeasy Lipid Tissue kit para hígados esteatósicos y el RNeasy Mini kit para los hígados no esteatósicos (Quiagen, Hilden, Alemania). En ambos casos se partió de tejido hepático congelado y se procedió siguiendo las instrucciones de cada kit de extracción. Posteriormente se realizó la cuantificación del RNA obtenido por espectrofotometría, y se verificó la calidad del RNA calculando la relación de absorbancias 260/280 nm utilizando la misma técnica espectrofotométrica.

A continuación se realizó la retrotranscripción del RNA utilizando el kit comercial Ready-To-go You-Prime First Stry Beads (GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, Reino Unido). Se partió de 5  $\mu$ g de RNA por cada muestra y se siguieron las especificaciones del kit para obtener el cDNA. Finalmente se realizó RT-PCR partiendo de 75 ng del cDNA obtenido y usando sondas/primer TaqMan Gene Expression Assay prediseñadas y validadas por la casa comercial que las sintetiza (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las sondas/primer utilizadas en esta determinación fueron las siguientes: Rn00595250\_m1 para adiponectina, Rn00822043\_m1 para visfatina, Rn00595224\_m1 para resistina, y Rn00667869\_m1 para  $\beta$ -Actina. El ensayo de Real Time PCR para analizar la expresión génica con las sondas/primer mencionadas se realizó de acuerdo a las

instrucciones del fabricante. También se llevaron a cabo experimentos control de la eficiencia del ensayo. La cuantificación de la expresión génica de las adipocitoquinas se realizó aplicando el método de  $\Delta\Delta C_t$  usando la  $\beta$ -Actina como gen de referencia o normalizador, y el grupo experimental Sham (grupo experimental 1) como calibrador para realizar el cálculo comparativo [389]. La Real Time PCR se llevó a cabo en un termociclador iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los resultados se expresaron comparando la expresión del RNAm con respecto al grupo calibrador.

## 7. Técnicas Histológicas

### 7.1 Estudio histológico del tejido hepático

Las muestras de hígado se procesaron según el procedimiento estándar para su estudio mediante microscopía óptica. Inmediatamente después de la extracción, las muestras se fijaron al menos durante 24 horas en formaldehído tamponado al 4% (Panreac, Barcelona, España). Tras la inclusión en parafina, las muestras se cortaron con un micrótopo en secciones de 3-5  $\mu\text{m}$ . Se realizó la tinción de Hematoxilina y Eosina (HyE) siguiendo los procedimientos convencionales.

Para valorar la severidad de la lesión hepática, los cortes se evaluaron utilizando la escala siguiente: grado 0, lesión mínima o sin evidencia de lesión; grado 1, lesión leve que consistente en vacuolización citoplasmática y picnosis nuclear focal; grado 2, lesión de moderada a severa con picnosis nuclear extensa, hipereosinofilia citoplasmática y pérdida del contorno celular; grado 3, necrosis severa con desintegración de los cordones de hepatocitos, hemorragias e infiltrados de neutrófilos [273,390]. Para evaluar el porcentaje de necrosis se valoraron 40 campos de gran aumento elegidos de manera aleatoria por sección.

Para valorar el grado de esteatosis hepática se congeló el tejido hepático y se utilizó la tinción de Red Oil O, un colorante liposoluble que se utiliza para la tinción de triglicéridos y lípidos. Tras la inclusión en parafina, las muestras se cortaron con un micrótopo en secciones de 3  $\mu\text{m}$  de acuerdo con los procedimientos estándar. El índice de esteatosis hepática se determinó mediante la cuantificación de células con gotas lipídicas teñidas en 30 campos de gran aumento elegidos de manera aleatoria por sección. Y los datos se expresaron como el porcentaje de células teñidas respecto al número total de hepatocitos [185].

### 7.2 Tinción inmunohistoquímica TUNEL

Para detectar las células apoptóticas se evaluó la fragmentación nuclear del DNA de las células apoptóticas in situ mediante el método de tinción TUNEL utilizando el kit comercial ApopTag (Millipore, Billerica, MA, USA). Este método está basado en la incorporación al DNA de los nucleótidos presentes en el medio de reacción por la enzima TdT, que cataliza la adición de

nucleótidos trifosfato unidos a digoxigenina a los extremos 3'-OH libres de las cadenas de DNA, dobles o simples, fragmentadas. A continuación el DNA se une a un anticuerpo anti-digoxigenina que se conjuga a una molécula de peroxidasa. El conjugado anticuerpo-peroxidasa genera enzimáticamente mediante sustratos cromógenos una tinción intensa, localizada, que puede ser detectada por inmunohistoquímica. Esta reacción es especialmente sensible al tipo de fragmentación del DNA que tiene lugar tras la apoptosis [391].

Las muestras de tejido hepático se fijaron en formaldehído tamponado al 4% (Panreac, Barcelona, España), se incluyeron en parafina y se obtuvieron distintos cortes histológicos de cada muestra (3  $\mu$ m). Los cortes se desparafinaron y rehidrataron de la siguiente manera: 5 minutos en xilol, 2 veces; 3 minutos en alcohol absoluto, 2 veces; 3 minutos en alcohol 96°, 2 veces; 3 minutos en alcohol 50°, 2 veces; 5 minutos en agua destilada, 3 veces y 5 minutos en PBS 1X. A continuación, se les añadió una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% en PBS durante 5 minutos para bloquear la actividad de las peroxidasas endógenas. Tras lavado con agua destilada y PBS, los cortes se incubaron con el tampón de equilibrio provisto en el kit durante 15 minutos, y transcurridos éstos se incubaron con la enzima y los nucleótidos unidos a digoxigenina presentes en el tampón de reacción incluido en el kit, durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda. Por último, los cortes se incuban con un conjugado anti-digoxigenina-peroxidasa. El color se obtuvo con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y diaminobenzidina (DAB). Se contrastó con hematoxilina. Los hepatocitos TUNEL-positivos se tiñeron de color marrón. En uno de los cortes se omitió la adición de la TdT para utilizar dicho corte como control negativo.

Para evaluar la presencia de células apoptóticas se valoraron 40 campos de gran aumento elegidos de manera aleatoria por sección.

### 7.3 Tinción inmunohistoquímica de nitrotirosina

Para la detección de nitrotirosinas por inmunohistoquímica las muestras de tejido hepático se fijaron en formaldehído tamponado al 4% (Panreac, Barcelona, España), se incluyeron en parafina y se obtuvieron distintos cortes histológicos de cada muestra (3  $\mu$ m). Los cortes se desparafinaron y rehidrataron de la siguiente manera: 5 minutos en xilol, 2 veces; 3 minutos en alcohol absoluto, 2 veces; 3 minutos en alcohol 96°, 2 veces; 3 minutos en alcohol 50°, 2 veces; 5 minutos en agua destilada, 3 veces. La inmunohistoquímica de las nitrotirosinas se realizó con el kit comercial Vectastain Universal Quick (Vector Lab, Burlingame, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, como paso inicial se realizó el bloqueo de las peroxidasas endógenas de la muestra. A continuación, los cortes se incubaron con una solución de bloqueo (suministrada en el kit) al 2.5% durante 60 minutos y después se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo primario anti-Nitrotirosina (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) preparado en dilución 1:200 en PBS con solución de bloqueo al 5%. Posteriormente las muestras se incubaron durante 60 minutos con un anticuerpo secundario biotinilado y a continuación se incubaron durante 60 minutos con un complejo SA-HRP. Finalmente las muestras se trataron con DAB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con lo que se desarrolló un color marrón indicativo de la presencia de nitrotirosinas. Los cortes histológicos se tiñeron con

hematoxilina para proporcionar una tinción de contraste. En uno de los cortes se omitió la adición del anticuerpo primario frente a nitrotirosinas para utilizar dicho corte como control negativo [125,392].

El marcaje positivo para nitrotirosinas se determinó observando las muestras con microscopía convencional. La cuantificación del grado de tinción de nitrotirosinas se realizó estableciendo una escala del 0-3: grado 0, tinción mínima o ausencia de tinción; grado 1, tinción leve; grado 2, tinción moderada; y grado 3, tinción intensa [393].

#### **7.4 Tinción inmunohistoquímica de adiponectina y resistina**

Para la inmunolocalización de adiponectina y resistina, las muestras de tejido hepático se fijaron en formaldehído tamponado al 4% (Panreac, Barcelona, España) y pasadas 24 horas se incluyeron en parafina. Las muestras se cortaron con un micrótopo en secciones de 3-4  $\mu\text{m}$  de grosor, obteniendo distintos cortes histológicos de cada muestra. Los cortes se desparafinaron con xilol y se hidrataron con etanol a concentraciones decrecientes.

Las inmunohistoquímicas se llevaron a cabo mediante un kit comercial (DAKO Envision+System, peroxidase (DAB); Dako, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar se bloqueó la peroxidada interna de la muestra. Para cada detección, se incubó con el anticuerpo primario policlonal anti-adiponectina o anti-resistina respectivamente (R&D Systems, USA). Después de incubar con el anticuerpo secundario, las muestras se trataron con DAB y el sustrato cromógeno que resultó en un precipitado marrón.

#### **7.5 Tinción inmunohistoquímica de Ki-67**

La expresión de la proteína humana Ki-67 está estrictamente asociada con la proliferación celular. El hecho de que la proteína Ki-67 esté presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2, y la mitosis), pero ausente de las células en reposo (G0), hace que sea un excelente marcador para determinar la proporción de células que se están dividiendo.

Las muestras de tejido hepático se fijaron en formaldehído tamponado al 4% (Panreac, Barcelona, España) y pasadas 24 horas se incluyeron en parafina. Las muestras se cortaron con un micrótopo en secciones de 3-4  $\mu\text{m}$  de grosor. Los cortes se desparafinaron con xilol y se hidrataron con soluciones de etanol a concentraciones decrecientes.

La inmunohistoquímica se llevó a cabo mediante un kit comercial (DAKO Envision+System, peroxidase (DAB); Dako, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar se bloqueó la peroxidada interna de la muestra. Se incubó con el anticuerpo primario anti Ki-67 (clon SP6; Abcam, Cambridge, MA). Después de incubar con el anticuerpo secundario, las muestras se trataron con DAB y el sustrato cromógeno que da un precipitado marrón a las células en división. Se tiñeron los cortes con hematoxilina para dar una tinción de contraste y se montaron los portaobjetos.

El índice de marcaje de Ki-67 se determinó mediante la cuantificación de núcleos teñidos en 30 campos de gran aumento elegidos de manera aleatoria por sección. Y los datos se expresaron como el porcentaje de células teñidas respecto al número total de hepatocitos [185].

## **8. Estudio estadístico**

El estudio estadístico se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA), y seguidamente se determinó el nivel de significación estadística con un test de Student-Newman-Keuls, considerando los datos significativamente diferentes cuando  $p < 0.05$ . Los datos se expresaron como valor de la media  $\pm$  error estándar de la media. La supervivencia se estimó con el método de Kaplan-Meier y fue comparada con una prueba long-rank, considerando los datos significativamente diferentes cuando  $p < 0.05$ . Adicionalmente, los resultados se analizaron utilizando el programa Prism versión 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## **1. PRIMER ESTUDIO**

### **Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate in Rat Steatotic Liver Transplantation**

**Mónica B. Jiménez Castro**, Araní Casillas Ramírez, Marta Massip Salcedo, Maria Elías Miro, Anna Serafín, Antoni Rimola, Juan Rodés, Carmen Peralta.

*Liver Transplantation*. 2011;17(9):1099-1110.

Los niveles de AMPc en los injertos hepáticos no esteatósicos fueron similares a los observados en un grupo control (Sham). Sin embargo, se observó un aumento en los niveles de AMPc en los injertos hepáticos esteatósicos sometidos a trasplante. El bloqueo en la generación de AMPc mediante el pre-tratamiento con un inhibidor de la adenilato ciclasa o la inducción del PC resultó en los efectos siguientes: Reducción de los parámetros bioquímicos de lesión hepática y del grado de necrosis y aumento de la supervivencia en los receptores de injertos hepáticos esteatósicos; mayor preservación del ATP y reducción en la acumulación de intermediarios de la vía glucolítica (glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato) y en la producción de lactato a lo largo de la isquemia fría. Por otra parte, la administración de un activador de la adenilato ciclasa o de análogos del AMPc en los injertos preconditionados eliminó el efecto protector del PC. El bloqueo en la generación de AMPc-y a través de un mecanismo dependiente de óxido nítrico- protegió a los injertos hepáticos esteatósicos frente al estrés oxidativo (inhibiendo en sistema XDH/XOD y preservando la GSH) y los desórdenes microcirculatorios asociados a la reperfusión. De hecho, las estrategias que bloquearon el AMPc (inhibidores de la adenilato ciclasa y el PC) aumentaron la síntesis de NO derivado de la cNOS. Además la inhibición en la síntesis de NO mediante modulación farmacológica eliminó los efectos protectores del PC y de los inhibidores de la adenilato ciclasa en injertos esteatósicos sobre la lesión, estrés oxidativo y desórdenes en la microcirculación.

## ORIGINAL ARTICLE

## Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate in Rat Steatotic Liver Transplantation

Monica B. Jimenez-Castro,<sup>1\*</sup> Arani Casillas-Ramirez,<sup>1\*</sup> Marta Massip-Salcedo,<sup>1,2</sup> Maria Elias-Miro,<sup>1</sup> Anna Serafin,<sup>3</sup> Antoni Rimola,<sup>1,2,4</sup> Juan Rodes,<sup>1,2,4</sup> and Carmen Peralta<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Esther Koplowitz Center, August Pi i Sunyer Institute for Biomedical Research, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Center for Biomedical Research in Hepatic and Digestive Diseases, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Platform of Laboratory Animal Applied Research, Barcelona Scientific Park, Barcelona, Spain; and <sup>4</sup>Liver Unit, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Numerous steatotic livers are discarded as unsuitable for transplantation (TR) because of their poor tolerance of ischemia/reperfusion (I/R). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-elevating agents protect against I/R injury both in nonsteatotic livers that have been removed from non-heart-beating donors and subjected to warm ischemia or cold ischemia (CIS) and in perfused, isolated livers. Ischemic preconditioning (PC), which is based on brief periods of I/R, protects steatotic liver grafts, but the mechanism that is responsible is poorly understood. This study examines the role of cAMP in the vulnerability shown by steatotic livers to TR-associated I/R injury and the benefits of PC in this situation. Steatotic livers with or without PC were transplanted into Zucker rats. The hepatic levels of cAMP were measured and altered pharmacologically. Our results indicate that the cAMP levels in the nonsteatotic liver grafts were similar to those found in a sham group. However, high cAMP levels were observed in steatotic liver grafts. The blockage of cAMP generation by adenylyl cyclase inhibitor pre-treatment or PC had the following results: reduced hepatic injury and increased survival of steatotic graft recipients; greater preservation of adenosine triphosphate (ATP) and reduced lactate accumulation throughout CI. This blockade of cAMP by a nitric oxide-dependent mechanism protected steatotic liver grafts against oxidative stress and microvascular disorders after reperfusion. In conclusion, cAMP blocking-based strategies could protect patients against the inherent risk of steatotic liver failure after TR. *Liver Transpl* 17:1099-1110, 2011. © 2011 AASLD.

Received March 3, 2011; accepted June 5, 2011.

The increasing demand for organs for transplantation (TR) has led to the acceptance of steatotic livers despite their poor tolerance of ischemia/reperfusion (I/R) injury.<sup>1,2</sup> The use of these marginal organs is associated with an increased risk of graft dysfunction or

failure after TR.<sup>2</sup> In addition, many steatotic livers are discarded, and this exacerbates the critical shortage of donor livers.<sup>1</sup> Therefore, minimization of the adverse effects of I/R on steatotic liver TR is urgently needed.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Abbreviations: ADP, adenosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; cAMP, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate; CIS, cold ischemia; cNOS, constitutive nitric oxide synthase; DBcAMP, dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate; GSH, glutathione; iNOS, inducible nitric oxide synthase; I/R, ischemia/reperfusion; Ln, lean; L-NAME, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester; MDA, malondialdehyde; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NO, nitric oxide; Ob, obese; ONOO<sup>-</sup>, peroxynitrite; PC, ischemic preconditioning; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; SQ22536, 9-(tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine; TR, transplantation; XDH, xanthine dehydrogenase; XOD, xanthine oxidase.

This research was supported by the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs (project grant PI060021), the Spanish Ministry of Science and Innovation (project grant BFU2009-07410 and Torres Quevedo research contract PTQ-08-03-07880 to Anna Serafin), and ACCIÓ (project grant VALTEC08-2-0033). Arani Casillas-Ramirez received a fellowship from the Agency for the Administration of University and Research Grants.

\*These authors contributed equally to this work.

Address reprint requests to Carmen Peralta, M.D., Esther Koplowitz Center, August Pi i Sunyer Institute for Biomedical Research, Roselló 149-153, 3rd floor, Office 3.8, Barcelona, Spain E-08036. Telephone: +34 93 227 5400, extension 4177; FAX: +34 93 227 9240; E-mail: cperalta@clinic.ub.es

DOI 10.1002/lt.22359

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

LIVER TRANSPLANTATION.DOI 10.1002/lt. Published on behalf of the American Association for the Study of Liver Diseases.

Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) is produced by adenylate cyclase and acts as an intracellular second messenger in response to a variety of extracellular signals.<sup>3</sup> Studies evaluating the role of cAMP in hepatic I/R, which have mainly focused on nonsteatotic livers removed from non-heart-beating donors and subjected to warm ischemia or cold ischemia (CIS),<sup>4-6</sup> indicate that cAMP and cAMP analogues have beneficial effects on hepatic I/R. These studies have been corroborated by other studies involving experimental models of perfused, isolated livers.<sup>7</sup> The role of cAMP in steatotic liver TR remains to be identified.

Previous results<sup>8-12</sup> have indicated that both the reduction of oxidative stress and the preservation of the cell energy status could be involved in the benefits of cAMP. cAMP reduces the production of reactive oxygen species (ROS) in guinea pig alveolar macrophages,<sup>8</sup> in granulocytes from healthy patients,<sup>9,10</sup> and in human neutrophils.<sup>10</sup> In addition, cAMP-elevating agents attenuate the degradation of adenine nucleotides during ischemia and restore adenosine triphosphate (ATP) levels after reperfusion in livers undergoing normothermic ischemia<sup>11</sup> and in livers from non-heart-beating donors subjected to CIS.<sup>12</sup> Thus, the possibility that cAMP-elevating agents could regulate the mechanisms potentially responsible for the vulnerability of steatotic livers to TR-associated I/R injury, including oxidative stress and high-energy nucleotide depletion, should not be excluded.

In this study, we compared the effects of pharmacological treatments that modulate the action of cAMP in steatotic liver TR with the effects of ischemic preconditioning (PC). Despite intense research efforts, PC, which is based on brief periods of I/R before a subsequent period of sustained I/R, is the only surgical strategy that has been successfully applied in patients with steatotic livers undergoing warm ischemia. Further randomized clinical studies are necessary to determine whether PC is appropriate for liver TR. Although the mechanisms by which PC protects steatotic liver grafts are unknown, liver protection depends on the generation of nitric oxide (NO).<sup>13</sup> A previous study of isolated livers undergoing CIS indicated that PC protected sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury through cAMP induction.<sup>14</sup> Thus, the second purpose of this study was to determine whether the benefits of PC for hepatic I/R injury in steatotic liver TR could be explained by changes in hepatic cAMP levels. Only a full appraisal of the molecular basis of PC in steatotic liver grafts will permit the design of new clinical applications of PC as well as pharmacological strategies for simulating its effectiveness.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental Animals

This study was performed with homozygous [obese (Ob)] and heterozygous [lean (Ln)] Zucker rats [Iffa-Credo, L'Abresle, France] that were 10 to 11 weeks old.<sup>13,15</sup> Steatosis in Zucker rats is not associated

with inflammation.<sup>16</sup> The Ob rats showed moderate macrovesicular and microvesicular fatty infiltration of hepatocytes (40%-60% steatosis), whereas the Ln rats showed no evidence of steatosis.<sup>13,15</sup> All procedures were performed under isoflurane inhalation anesthesia. This study conformed to European Union regulations for animal experimentation (European Economic Community directive 86/609). The animals were randomly distributed into groups as described later.

### Experimental Design

The experimental treatments and the measurements are listed in Table 1. Standard orthotopic liver TR in Zucker rats was carried out according to the Kamada cuff technique without hepatic artery reconstruction.<sup>17</sup> The conditions of this study (including the CIS, reperfusion, and PC times) were established on the basis of the results of previous studies.<sup>13,15</sup> A cold ischemic period of 6 h is long enough to induce liver damage after transplantation in liver grafts and allow high survival at 4 h after transplantation. In addition, the PC period in this study (5 minutes of ischemia followed by 10 minutes of reperfusion) is effective against hepatic I/R injury in both liver types.<sup>13</sup> Thus, these experimental conditions were appropriate for evaluating cAMP levels in both liver types and their effects on hepatic I/R injury associated with TR. Survival studies were also performed. The survival of receptors was monitored for 14 days as previously reported.<sup>15,18</sup>

All the drugs were administered to the donor rats. They included an adenylate cyclase inhibitor [9-(tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine (SQ22536)],<sup>19,20</sup> an adenylate cyclase activator (forskolin),<sup>19,21</sup> a cAMP analogue [dibutyl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (DBcAMP)],<sup>6,20,21</sup> and an NO synthesis inhibitor [N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)].<sup>22-24</sup> The doses and pretreatment times for the different drugs (which are shown in Table 1) were selected on the basis of previous studies<sup>6,20-24</sup> and preliminary studies from our group. Control experiments were performed with the drug vehicles. For biochemical tests, plasma and liver samples were immediately frozen and were kept at -80°C until they were assayed. In addition, liver samples were removed and fixed in 10% neutral buffered formalin for light microscopy examinations and in a 2.5% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde mixture in a phosphate buffer for electron microscopy examinations. For the determination of liver vascular permeability, Evans blue (20 mg/kg) was intravenously injected 15 minutes before the end of the protocol. At the end of the protocol, the animals were exsanguinated. Then, liver samples were removed for vascular permeability analysis as described later.

### Biochemical Tests

#### *Aminotransferases and Hyaluronic Acid*

Aminotransferases were measured with a commercial kit from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Hyaluronic acid, which was used as an index of endothelial cell

TABLE 1. Experimental Groups, Treatments, and Tests

TABLE 1. Experimental Groups, Treatments, and Tests	
Protocol 1. Evaluation of cAMP Levels in Nonsteatotic and Steatotic Liver Grafts	
Group 1. Sham rats (n = 12: 6 Ln rats and 6 Ob rats)	Transverse laparotomy and silk ligatures applied in the right suprarenal vein, the diaphragmatic vein, and the hepatic artery
Group 2. TR rats (12 TRs)	Livers preserved in University of Wisconsin solution and subsequently transplanted
Group 2.1. Grafts from Ob rats with 6 hours of CIS (6 TRs)	Ln rat recipients
Group 2.2. Grafts from Ln rats with 6 hours of CIS (6 TRs)	Ln rat recipients
Group 3. PC-TR rats (12 TRs)	Same as group 2 but with previous PC (5 minutes of ischemia and 10 minutes of reperfusion)
Group 3.1. Grafts from Ob rats with PC and 6 hours of CIS (6 TRs)	Ln rat recipients
Group 3.2. Grafts from Ln rats with PC and 6 hours of CIS (6 TRs)	Ln rat recipients
<b>Tests</b>	
Groups 1-3	cAMP after 4 hours of reperfusion
Protocol 2. Evaluation of Hepatic Injury and Survival After the Modulation of cAMP	
<b>Protocol 2.1. Hepatic Injury</b>	
Group 4. TR-SQ22536 rats (6 TRs)	Same as group 2.1 but with SQ22536 treatment
Group 5. PC-TR-forskolin rats (6 TRs)	Same as group 3.1 but with forskolin treatment
Group 6. TR-SQ22536-DBcAMP rats (6 TRs)	Same as group 2.1 but with SQ22536 and DBcAMP treatment
Group 7. PC-TR-DBcAMP rats (6 TRs)	Same as group 3.1 but with DBcAMP treatment
<b>Tests</b>	
Groups 1, 2.1, 3.1, 4, 5, 6, and 7	cAMP, aminotransferases, and damage score after 4 hours of reperfusion
<b>Protocol 2.2. Survival</b>	
Groups 2.1, 3.1, 4, and 5 (10 TRs in each group)	Monitoring of the survival of receptors for 14 days
Protocol 3. Investigation of NO Involvement in the Benefits of cAMP-Blocking Strategies	
Group 8. TR-SQ22536- <i>l</i> -NAME rats (6 TRs)	Same as group 2.1 but with SQ22536 and <i>l</i> -NAME treatment
Group 9. PC-TR- <i>l</i> -NAME rats (6 TRs)	Same as group 3.1 but with <i>l</i> -NAME treatment
<b>Tests</b>	
Groups 1, 2.1, 3.1, 4, and 5	Nitrates, nitrites, cNOS, and iNOS after 4 hours of reperfusion
Groups: 1, 2.1, 3.1, 4, 5, 8, and 9	Aminotransferases, damage score, hyaluronic acid, vascular permeability, and edema after 4 hours of reperfusion
Protocol 4. Evaluation of the Effects of cAMP-Blocking Strategies on Energy Metabolism	
Group 10. CIS rats: grafts from Ob rats with 6 hours of CIS (n = 6)	Steatotic livers preserved in University of Wisconsin solution
Group 11. PC-CIS rats: grafts from Ob rats with 6 hours of CIS (n = 6)	Same as group 10 but with previous PC
Group 12. CIS-SQ22536 rats (n = 6)	Same as group 10 but with SQ22536 treatment
Group 13. PC-CIS-forskolin rats (n = 6)	Same as group 11 but with forskolin treatment
Group 14. PC-CIS- <i>l</i> -NAME rats (n = 6)	Same as group 11 but with <i>l</i> -NAME treatment
<b>Tests</b>	
Groups 1, 2.1, 3.1, 4, 5, 8, and 9	ATP and adenine nucleotides after 1, 2, and 4 hours of reperfusion
Groups 10-14	ATP, adenine nucleotides, nucleosides, bases, cAMP, hexose 6-phosphates (glucose 6-phosphate and fructose 6-phosphate), and lactate after 1, 3, and 6 hours of CIS
Protocol 5. Evaluation of the Effects of cAMP-Blocking Strategies on Oxidative Stress	
<b>Tests</b>	
Groups 1, 2.1, 3.1, 4, 5, 8, and 9	MDA, nitrotyrosines, XDH/XOD, SOD, and GSH after 4 hours of reperfusion
Drug Administration Protocol	
Drug	Dose and Pretreatment Time
SQ22536 (adenylate cyclase inhibitor)	300 µg/kg intraperitoneally to the donor 5 minutes before surgery
Forskolin (adenylate cyclase activator)	100 µg/kg intraperitoneally to the donor 5 minutes before surgery
DBcAMP (cAMP analogue)	15 mg/kg intravenously to the donor 5 minutes before surgery
<i>l</i> -NAME (NO synthesis inhibitor)	10 mg/kg intravenously to the donor 5 minutes before surgery

damage,<sup>25</sup> was determined with a commercial competitive protein-binding assay (Pharmacia & Upjohn AB, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions.

### Nucleotides

Frozen liver samples were placed in 10 volumes of 3.6% perchloric acid and then were immediately

homogenized. After homogenization, the tissues were extracted for 30 minutes at 0.5°C and then were centrifuged at 850g for 15 minutes.<sup>19</sup> The supernatants were adjusted to the pH range of 6.0 to 6.5 and were centrifuged at 14,000 rpm. Then, 50 µL of each supernatant was injected into a Waters 717 Plus Autosampler liquid chromatograph. Nucleotide profiles were obtained with a Spherisorb reversed-phase octadecylsilane column (C<sub>18</sub>, 5-µm particles, 15 × 0.4 cm, Teknokroma, San Cugat, Spain) coupled to a 600 high-performance liquid chromatography system (Waters, Milford, MA), which was equipped with a Waters 996 photodiode array detector. The absorbance was monitored at 254 nm. Nucleotide separation was allowed to proceed in an isocratic fashion with 100 mmol/L ammonium phosphate (pH 5.5) until ATP, adenosine diphosphate (ADP), hypoxanthine, xanthine, and adenosine monophosphate (AMP) were separated. At this point, a water/methanol mixture (96/4) was introduced into the column, and inosine was eluted. Another water/methanol mixture (60/40) was then introduced for the elution of adenosine. Calibration chromatograms for the standards (ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine) were generated by injections of 50-µL mixtures of known concentrations. The profiles were processed with a Millennium<sup>32</sup> system.<sup>19,24</sup> Under these experimental conditions, the retention times were 4.02 minutes for ATP, 4.74 minutes for ADP, 6.49 minutes for hypoxanthine, 7.83 minutes for xanthine, 9.18 minutes for AMP, 16.80 minutes for inosine, 21.40 minutes for nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), and 22.18 minutes for adenosine.

#### cAMP

cAMP was extracted and quantified radioimmunologically with the cAMP <sup>3</sup>H assay system (GE Healthcare, Ltd., Buckinghamshire, United Kingdom) according to the manufacturer's protocol.<sup>19</sup>

#### Hexose 6-Phosphates and Lactate

Hexose 6-phosphates (glucose 6-phosphate and fructose 6-phosphate) were extracted in 10 volumes of 6% perchloric acid. The extracts were neutralized and then centrifuged at 5000g for 10 minutes. These metabolites were assayed fluorometrically with glucose 6-phosphate dehydrogenase and phosphoglucose isomerase according to the Lang-Michal method.<sup>19</sup> Lactate was extracted with water/acetone (1/1.2 vol/vol). The lactate content was measured with a commercial kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN).<sup>19,24</sup>

#### NO Production, Lipid Peroxidation, and Nitrotyrosines

NO production was determined by the tissue accumulation of nitrites and nitrates.<sup>13,26,27</sup> Lipid peroxidation was determined via measurements of the formation of

malondialdehyde (MDA) with the thiobarbiturate reaction.<sup>13,28</sup> Nitrotyrosine levels, which were used as an index of peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), were measured with a commercial kit from TCS Biologicals (Bucks, United Kingdom).<sup>13,29</sup>

#### Xanthine Dehydrogenase (XDH) and Xanthine Oxidase (XOD) Activity

The activity of XDH and XOD was measured spectrophotometrically at 292 nm on the basis of uric acid formation in the presence and absence of NAD<sup>+</sup>, respectively. Xanthine was used as a substrate.<sup>22</sup>

#### Glutathione (GSH) and Superoxide Dismutase (SOD) Activity

After precipitation, the amount of hepatic GSH was measured with GSH transferase and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene.<sup>28</sup> The hepatic activity of SOD was assayed via the determination of the enzyme's capacity for inhibiting the superoxide anion-mediated reduction of nitroblue tetrazolium into formazan.<sup>28</sup>

#### Liver Permeability and Edema

Liver permeability was estimated with the Evans blue method. The liver samples were added to 10 volumes of deionized formamide and were incubated at room temperature for 24 hours. The Evans blue that was extracted from the tissue was quantified by spectrophotometric analysis, and the values were compared to those of standards of known concentrations.<sup>28,30</sup> For the edema evaluation, the samples were weighed and then placed in an oven at 55°C until a constant weight was obtained. In this test, hepatic edema was determined by an increase in the wet-to-dry weight ratio.<sup>28,30</sup>

#### Western Blot Analysis of NO Synthase

Liver tissue was homogenized as previously described,<sup>13,31</sup> and proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. The membranes were immunoblotted with an antibody to constitutive nitric oxide synthase (cNOS; 1:500) and an antibody to inducible nitric oxide synthase (iNOS; 1:1000; BD Transduction Laboratories, Lexington, KY). Signals were detected with enhanced chemiluminescence and were quantified with scanning densitometry. All signals were normalized to the corresponding Ponceau S.<sup>31</sup>

#### Light/Electron Microscopy

For light microscopy examinations, liver samples were fixed in 10% neutral buffered formalin and were embedded in Paraplast, and 5-µm sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin according to standard procedures. For the appraisal of the severity of hepatic injury, hematoxylin and eosin-stained sections

were evaluated by a point-counting method on an ordinal scale: (0) minimal or no evidence of injury; (1) mild injury consisting of cytoplasmic vacuolation and focal nuclear pyknosis; (2) moderate to severe injury with extensive nuclear pyknosis, cytoplasmic hyper eosinophilia, and loss of intercellular borders; and (3) severe necrosis with disintegration of hepatic cords, hemorrhaging, and neutrophil infiltration.<sup>13,28</sup> For electron microscopy, the fixation of hepatic tissue was performed with a 2.5% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde mixture in a phosphate buffer (pH 7.4). After they were rinsed in the phosphate buffer, the specimens were post-fixed with osmium tetroxide and potassium ferrocyanide, dehydrated in acetone, and embedded in Spurr. Ultrathin sections were obtained with an Ultracut-E ultramicrotome, and they were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The stained sections were reviewed with a Hitachi H-600-AB electron microscope.<sup>30</sup> Liver steatosis was evaluated by red oil staining on frozen specimens according to standard procedures.

#### Immunohistochemical Location of Nitrotyrosine

Immunohistochemical staining for nitrotyrosine was performed with the Vectastain Universal Quick kit (Vector Lab, Burlingame, CA) and with polyclonal rabbit antisera (1:200 dilution) against nitrotyrosine (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY).<sup>13,32</sup> To quantify the degree of nitrotyrosine staining, we used the following grading system: (0) minimal or no staining, (1) mild staining, (2) moderate staining, and (3) strong staining.<sup>13</sup>

#### Statistics

Data are expressed as means and standard errors, and they were compared statistically with a 1-way analysis of variance and then a post hoc Student-Newman-Keuls test.  $P < 0.05$  was considered significant. Survival was estimated with the Kaplan-Meier method and was compared with a log-rank test. Differences in values were considered significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

#### Evaluation of the cAMP Levels in Nonsteatotic and Steatotic Liver Grafts

We evaluated whether the benefits of PC for hepatic injury in both types of liver grafts, which have been previously reported,<sup>15</sup> could be mediated by changes in cAMP. As shown in Supporting Fig. 1, the cAMP levels in the nonsteatotic liver grafts of the TR and PC-TR groups were similar to the levels found in the nonsteatotic liver grafts of the sham group. The cAMP levels in the steatotic liver grafts of the TR group were higher than the levels in the steatotic liver grafts of the sham group. The cAMP levels were reduced in the steatotic liver grafts of the PC-TR group versus the TR group (Supporting Fig. 1).

#### Evaluation of Hepatic Injury and Survival After the Modulation of cAMP

Nonsteatotic liver grafts were not protected against hepatic injury in the TR-SQ22536 group. Indeed, the aminotransferase levels and damage scores for the nonsteatotic liver grafts of the TR-SQ22536 group were similar to those for the TR group (aspartate aminotransferase levels,  $2250 \pm 262$  and  $2069 \pm 332$  IU/L for the TR-SQ22536 and TR groups, respectively; alanine aminotransferase levels,  $1630 \pm 138$  and  $1590 \pm 210$  IU/L, respectively; damage scores,  $1.80 \pm 0.30$  and  $1.80 \pm 0.20$ , respectively). With respect to hepatic injury, we evaluated the relevance of the changes in cAMP levels observed in transplanted steatotic liver grafts. For this, we modified the cAMP levels in steatotic liver grafts through the inhibition or activation of adenylate cyclase, and the effects on hepatic injury were evaluated. In the TR-SQ22536 group, the cAMP (Supporting Fig. 2A) and aminotransferase levels (Supporting Fig. 2B,C) were reduced in comparison with the levels in the TR group. The administration of an adenylate cyclase activator in the PC-TR group (PC-TR-forskolin group) abolished the benefits of PC-TR and resulted in cAMP and aminotransferase levels similar to those obtained for the TR group (Supporting Fig. 2A-C). SQ22536 is an adenylate cyclase inhibitor, and forskolin is an adenylate cyclase activator. These agents induce changes in cAMP levels by modifying the activity of adenylate cyclase.<sup>19-21</sup> To confirm that the effects of these agents on hepatic injury are caused by changes induced in cAMP, we used DBcAMP, which is a cAMP analogue. Exogenous DBcAMP increases the endogenous levels of cAMP.<sup>33,34</sup> This increase appears to be due to the deacylation of intracellular DBcAMP into *N*<sup>6</sup>-monobutyl cAMP. *N*<sup>6</sup>-Monobutyl cAMP inhibits cAMP phosphodiesterase, and this results in increased intracellular levels of cAMP.<sup>33,34</sup> The administration of DBcAMP in the TR-SQ22536 group (the TR-SQ22536-DBcAMP group) resulted in cAMP levels and parameters of hepatic injury similar to those of the TR group (Supporting Fig. 2A-C). Similarly, the administration of DBcAMP in the other PC-TR group (the PC-TR-DBcAMP group) resulted in cAMP levels and parameters of hepatic injury similar to those observed in the PC-TR-forskolin and TR groups (Supporting Fig. 2A-C). The damage score (Supporting Fig. 2D) showed a pattern similar to that described for aminotransferases (Supporting Fig. 2B,C). The histological findings revealed that the steatotic livers in the TR group had severe, extensive, and confluent areas of coagulative necrosis with neutrophil infiltration (Fig. 1A); these areas were reduced in number and extent in the TR-SQ22536 group (Fig. 1B). The hepatic lesions in the steatotic liver grafts of the PC-TR (Fig. 1C) and PC-TR-forskolin groups (Fig. 1D) were comparable to those observed in the TR-SQ22536 and TR groups, respectively.

The effects of cAMP-blocking strategies on the survival of recipients undergoing steatotic liver TR were

also evaluated. The recipients undergoing TR with steatotic grafts without any treatment (the TR group) had a survival rate of 30% (3/10) at 14 days; most of the deaths occurred within 2 days (Supporting Fig. 3). The treatment with the adenylate cyclase inhibitor (the TR-SQ22536 group) and the induction of PC (the PC-TR group) reduced the lethality rate for recipients undergoing TR with steatotic grafts, and they resulted in a 70% survival rate (7/10) at 14 days (Supporting Fig. 3). The recipients undergoing TR with steatotic grafts that previously had been treated with PC and an adenylate cyclase activator (the PC-TR-forskolin group) had a 30% survival rate (3/10) at 14 days.

#### Investigation of NO Involvement in the Benefits of cAMP-Blocking Strategies

In steatotic liver grafts, NO production (reflected in the values of tissue nitrites and nitrates) was increased for the TR group versus the sham group. The nitrite and nitrate levels of the TR-SQ22536 and PC-TR groups (with reduced cAMP levels) were higher than those of the TR group (Supporting Fig. 4A). In the PC-TR-forskolin group (with increased cAMP levels), the nitrite and nitrate levels were similar to those of the TR group. The cNOS protein levels (Supporting Fig. 4B) showed a pattern similar to that described for nitrites and nitrates. The newly synthesized NO originated from cNOS because western blots did not reveal iNOS changes in any of the study groups (Supporting Fig. 4B). We then evaluated the relevance of NO to the benefits of cAMP-blocking strategies (adenylate cyclase inhibitors and PC induction) for hepatic injury in steatotic liver grafts. The inhibition of NO synthesis in the TR-SQ22536 and PC-TR groups (the TR-SQ22536-L-NAME and PC-TR-L-NAME groups) resulted in hepatic injury parameters (Supporting Fig. 5A-C) similar to those of the TR groups and thus eliminated the benefits of cAMP-blocking strategies. The inhibition of NO synthesis by L-NAME was confirmed by the nitrate and nitrite levels. Thus, the nitrate and nitrite values for the TR-SQ22536-L-NAME and PC-TR-L-NAME groups were significantly lower than those for the TR-SQ22536 and PC-TR groups, respectively ( $16.25 \pm 3.01$ ,  $17.16 \pm 2.32$ ,  $53.53 \pm 5.63$ , and  $56.03 \pm 2.35$  nmol/mg protein for the TR-SQ22536-L-NAME, PC-TR-L-NAME, TR-SQ22536, and PC-TR groups, respectively). According to our results, these strategies that inhibit cAMP levels (adenylate cyclase inhibitors and PC) reduce endothelial cell damage and microvascular diseases in transplanted steatotic livers. Indeed, the levels of hyaluronic acid, vascular permeability, and edema of the TR-SQ22536 and PC-TR groups were reduced in comparison with those of the TR group (Supporting Fig. 5D-F). Conversely, the administration of an adenylate cyclase activator in the PC-TR group (the PC-TR-forskolin group) resulted in levels of hyaluronic acid, vascular permeability, and edema similar to those of the TR group. The benefits of cAMP-blocking strategies for endothelial cell damage and microvascular diseases could be mediated by

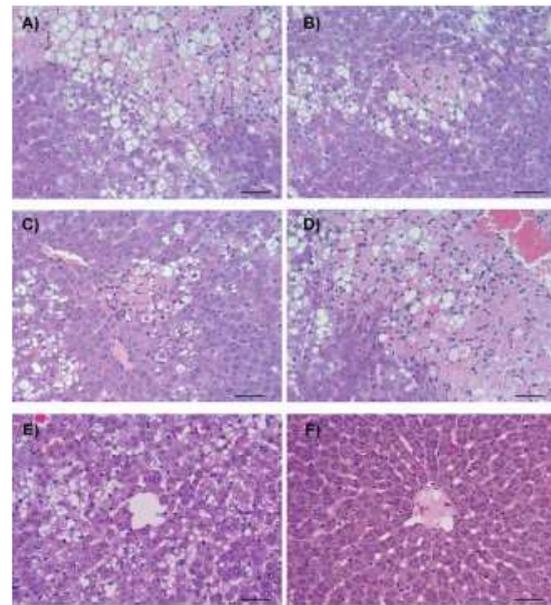


Figure 1. Representative photographs of histological changes after 4 hours of reperfusion in steatotic liver grafts: (A) widespread coagulative hepatic necrosis with neutrophil infiltration was found in the TR group, (B) a small area of coagulative hepatic necrosis with neutrophil infiltration was found in the TR-SQ22536 group, and (C) hepatic lesions similar to those in the TR-SQ22536 group were found in the PC-TR group. (D) In the PC-TR-forskolin group, hepatic lesions similar to those in the TR group were found. (E) Sham Ob rats and (F) sham Ln rats showed normal hepatic parenchyma (hematoxylin and eosin staining, bar = 50  $\mu$ m).

NO. In fact, the levels of hyaluronic acid, vascular permeability, and edema of the TR-SQ22536-L-NAME and PC-TR-L-NAME groups were similar to those of the TR group (Supporting Fig. 5D-F). Electron microscopy analysis revealed the following in the steatotic liver grafts of the TR (Fig. 2A,B), TR-SQ22536-L-NAME, and PC-TR-forskolin groups: cytoplasmic degeneration, a loss of endothelial integrity indicated by the extravasation of red blood cells, and a reduction and/or complete absence of microvilli projected into the space of Disse. In contrast, hepatocytes and sinusoidal lining cells were more preserved in the TR-SQ22536 (Fig. 2C) and PC-TR groups. For instance, Fig. 2D shows the presence of hepatocyte microvilli projected into the space of Disse in the TR-SQ22536 group.

#### Evaluation of the Effects of cAMP-Blocking Strategies on Energy Metabolism

As expected, after 4 hours of reperfusion, significantly lower levels of ATP and adenine nucleotides were observed in the steatotic liver grafts of the TR group versus the sham group (Supporting Fig. 6A,B). cAMP does not seem to be crucial in restoring the ATP and

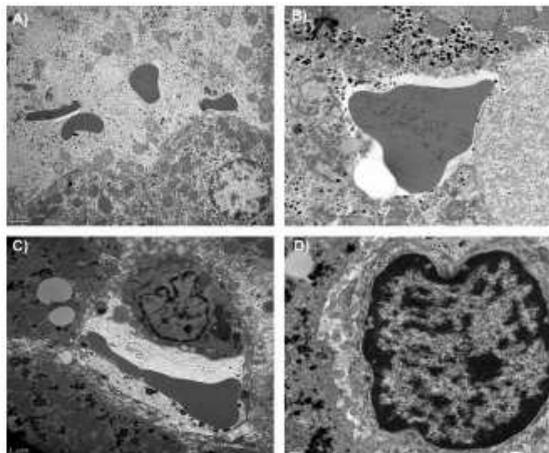


Figure 2. Electron microscopy images of steatotic liver grafts after 4 hours of reperfusion. The TR group was characterized by (A) the cytoplasmic degeneration and extravasation of blood cells and (B) the reduction and/or absence of microvilli and sinusoidal lining cells. The TR-SQ22536 group showed (C) more preserved hepatocytes and sinusoidal lining cells and (D) the presence of microvilli projected into the space of Disse.

adenine nucleotide pool for steatotic liver grafts during reperfusion. Indeed, after 4 hours of reperfusion, the ATP and adenine nucleotide levels in all the studied groups (the TR-SQ22536, PC-TR, PC-TR-forskolin, TR-SQ22536-L-NAME, and PC-TR-L-NAME groups) were similar to those obtained for the TR group (Supporting Fig. 6). In addition, the pattern of ATP and adenine nucleotides found in all the groups at early time points (1 and 2 hours after reperfusion) was comparable to the pattern observed 4 hours after reperfusion (Supporting Fig. 6). We also evaluated the adenine nucleotides and hepatic glycolytic metabolites during CIS. Supporting Fig. 7 shows the levels of ATP, adenine nucleotides (ATP, ADP, and AMP), adenine nucleosides, and bases after 1, 3, and 6 hours of CIS. In the CIS group, the ATP and adenine nucleotide levels decreased as a function of the length of the evaluated CIS period (1, 3, or 6 hours). This was associated with increased levels of adenine nucleosides and bases. However, the blockade of cAMP (the CIS-SQ22536 and PC-CIS groups) slowed the decrease in the levels of ATP and adenine nucleotides and the accumulation of nucleosides and bases (Supporting Fig. 7). In the PC-CIS-forskolin group, the effects of PC-CIS on ATP, adenine nucleotides, adenine nucleosides, and bases were abolished. We also evaluated whether the benefits of cAMP-blocking strategies for ATP could be mediated by NO, but this was not the case. Indeed, in the CIS-SQ22536-L-NAME and PC-CIS-L-NAME groups, the hepatic levels of ATP, adenine nucleotides, adenine nucleosides, and bases were similar to the levels of the CIS-SQ22536 and PC-CIS groups, respectively (Supporting Fig. 7). The effects of cAMP on glycolytic intermediates (glucose 6-phosphate and fructose 6-phosphate) and lactate pro-

duction were also evaluated after 1, 3, and 6 hours of CIS. The differences in the cAMP levels during CIS (Supporting Fig. 8A) were reflected in the changes in the accumulation of hexose 6-phosphates (Supporting Fig. 8B,C) and lactate (Supporting Fig. 8D). Thus, the cAMP, hexose 6-phosphate, and lactate levels were increased in the CIS groups versus the sham group. The accumulation of hexose 6-phosphates and lactate was reduced in the CIS-SQ22536 and PC-CIS groups (with reduced cAMP levels) versus the TR group. In the PC-CIS-forskolin group (with increased cAMP levels), the effects of PC-CIS were abolished, and this resulted in hexose 6-phosphate and lactate levels similar to those of the CIS group (Supporting Fig. 8). Thus, cAMP-blocking strategies limited the accumulation of hexose 6-phosphates and lactate in steatotic liver grafts during CIS. This effect on glycolytic metabolites seems to be independent of NO. Indeed, the CIS-SQ22536-L-NAME and PC-CIS-L-NAME groups had hepatic levels of hexose 6-phosphates and lactate similar to those of the CIS-SQ22536 and PC-CIS groups, respectively (Supporting Fig. 8). According to our results, cAMP levels increased in steatotic liver throughout the CIS period (Supporting Fig. 8A) and decreased during reperfusion (Supporting Fig. 2A). Thus, the cAMP levels in steatotic livers were  $4.12 \pm 0.22$  nmol/g of wet weight after 6 hours of CIS and  $2.83$  nmol/g  $\pm 0.15$  wet weight after 4 hours of reperfusion. These values agree with previous reports indicating that ischemia is responsible for inducing increases in cAMP levels.<sup>19,35,36</sup> Indeed, the cAMP levels after TR with fatty liver grafts without 6 hours of ischemia ( $0.62 \pm 0.09$  nmol/g of wet weight) were similar to those of the sham group ( $0.59 \pm 0.05$  nmol/g of wet weight).

#### Evaluation of the Effects of cAMP-Blocking Strategies on Oxidative Stress

ONOO<sup>-</sup> is formed when high levels of both NO and ROS are produced.<sup>37-39</sup> This agrees with our results because higher NO levels (Supporting Fig. 4), greater lipid peroxidation, and higher nitrotyrosine levels (Supporting Fig. 9) were observed in the steatotic liver grafts of the TR group versus the sham group. The cAMP levels were reduced in the steatotic liver grafts of the TR-SQ22536 and PC-TR groups versus the TR group (Supporting Fig. 2A). This was associated with increased nitrite and nitrite levels (Supporting Fig. 4) and reduced levels of MDA, nitrotyrosine, and hepatic injury (Supporting Fig. 9). However, the administration of a cAMP-elevating agent (forskolin) to preconditioned steatotic livers (the PC-TR-forskolin group) abolished the benefits of PC-TR and resulted in nitrate, nitrite, MDA, and nitrotyrosine levels similar to those found in the TR group (Supporting Figs. 4A and 9). The results of immunohistochemical studies of nitrotyrosine (Fig. 3 and Supporting Fig. 9C) were consistent with those obtained by biochemical methods (Supporting Fig. 9B). The immunohistochemical analysis revealed positive staining in the steatotic liver

grafts of the TR group (Fig. 3B). The nitrotyrosine staining was reduced in the steatotic liver grafts of the TR-SQ22536 (Fig. 3C) and PC-TR groups (Fig. 3D) versus the TR group. The nitrotyrosine staining in the PC-TR-forskolin group (Fig. 3E) was similar to the staining in the TR group. Our results indicate that changes in cAMP levels were reflected in changes in NO, nitrotyrosine, and MDA levels. NO synthesis inhibition in the TR-SQ22536 and PC-TR groups (the TR-SQ22536-L-NAME and PC-TR-L-NAME groups) resulted in oxidative stress parameters (MDA and nitrotyrosine levels) similar to those of the TR groups (Supporting Fig. 9). This suggests that if NO is inhibited, cAMP-blocking strategies do not protect against oxidative stress. Thus, cAMP inhibition by adenylate cyclase inhibitors or PC induction increases NO levels, and this in turn reduces oxidative stress in steatotic liver grafts. To explain the way in which NO reduces oxidative stress, we evaluated the ROS-generating system (XDH/XOD) and the antioxidant system (SOD/GSH) in steatotic liver TR. No changes in overall XDH/XOD activity were observed in steatotic liver grafts versus the sham group. However, the level of XOD (the oxygen radical-producing form) reached approximately 90% of the total activity level in steatotic liver grafts from the TR group (Supporting Fig. 10A). The XOD level was reduced in the TR-SQ22536 and PC-TR groups versus the TR group. The PC-TR-forskolin group had XOD levels similar to those of the TR group. According to our results, cAMP blockers, which are mediated by NO, reduce the conversion of XDH to XOD. Indeed, the XOD values for the TR-SQ22536-L-NAME and PC-TR-L-NAME groups were similar to those for the TR group; thus, the effects of cAMP-blocking strategies on XOD were abolished. The SOD and GSH levels were reduced in the steatotic liver grafts of the TR group versus the sham group (Supporting Fig. 10B,C). Changes in the cAMP or NO levels affected the GSH levels but not the SOD levels. Indeed, the SOD levels of all studied groups (the TR-SQ22536, PC-TR, PC-TR-forskolin, TR-SQ22536-L-NAME, and PC-TR-L-NAME groups) were similar to those of the TR group (Supporting Fig. 10B). The GSH levels were higher in the TR-SQ22536 and PC-TR groups versus the TR group, whereas the administration of an adenylate cyclase inhibitor (the PC-TR-forskolin group) abolished the effects of PC-TR and resulted in GSH levels similar to those of the TR group (Supporting Fig. 10C). According to our results, GSH preservation that is induced by cAMP-blocking strategies may depend on NO. Indeed, NO inhibition (the TR-SQ22536-L-NAME and PC-TR-L-NAME groups) resulted in GSH levels similar to those of the TR group (Supporting Fig. 10C).

## DISCUSSION

Many studies of nonsteatotic livers removed from non-heart-beating donors and subjected to warm ischemia or CIS<sup>4,6</sup> and perfused, isolated livers<sup>7</sup> have described cAMP-elevating agents as promising protec-

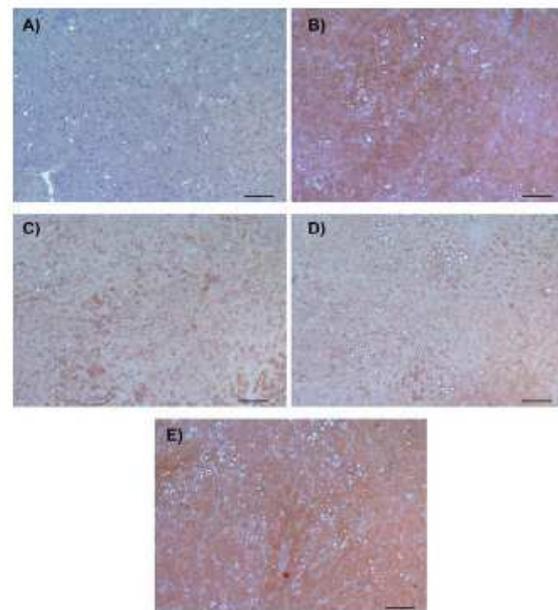


Figure 3. Immunohistochemical detection of nitrotyrosines after 4 hours of reperfusion in steatotic liver grafts: (A) no staining in the sham group, (B) moderate staining in the TR group, (C) slight staining in the TR-SQ22536 group, (D) slight staining in the PC-TR group, and (E) moderate staining in the PC-TR-forskolin group.

tive strategies for the treatment of hepatic I/R injury. However, our results indicate that cAMP does not play a crucial role in I/R injury in nonsteatotic liver grafts. This type of liver had cAMP levels similar to those of the sham group, and pharmacological strategies that regulate cAMP levels did not provide protection against hepatic injury. Moreover, PC protected nonsteatotic liver grafts against damage,<sup>13</sup> but according to the results of the current study, its benefits were not associated with changes in cAMP levels; this indicates a minor role for cAMP in this situation. The utility of strategies aimed at regulating cAMP in the setting of steatotic liver TR was not previously determined. Here we report evidence of the injurious effects of cAMP on steatotic liver grafts and suggest the clinical potential of cAMP-blocking-based drugs in steatotic liver TR; this potential is specific to this type of liver. This is also supported by our results indicating that cAMP inhibition seems to be involved in the benefits of PC in steatotic liver TR. There are considerable differences between the experimental models evaluated by others<sup>4,7</sup> and the model used in this study; among other things, these differences include the use of ex situ or in vivo models of liver TR, the evaluated CIS times, the presence or absence of steatosis, and the induction or lack of induction of cardiac arrest. Thus, cAMP shows differential effects on hepatic injury that depend on the surgical conditions. It is well known that multiple cAMP-mediated pathways

exist<sup>3</sup>; the 2 intracellular cAMP receptors (protein kinase A and exchange protein activated by cAMP) may mediate opposing effects of cAMP on protein kinase B,<sup>10,40</sup> and the net outcome of cAMP signaling is dependent on the dynamic abundance and distribution of intracellular exchange protein activated by cAMP and protein kinase A.<sup>3</sup> All this could at least partially explain the divergent roles of cAMP in hepatic I/R.

We evaluated the ways in which a reduction in cAMP levels induced by an adenylylase inhibitor or PC protects steatotic livers against hepatic I/R injury associated with TR. It is well known that ATP degradation during ischemia leads to an acceleration of glycolysis. Although glycolysis is essential for cell survival, it may also be detrimental because of the accumulation of glycolytic products such as lactate.<sup>19</sup> In the liver, the increase in cAMP levels due to ischemia triggers the activation of glycolysis. This causes the accumulation of hexose 6-phosphates, which proceed down the glycolytic pathway to form lactate.<sup>19,36,41</sup> Metabolic and functional tolerance of ischemia can be obtained by interventions that reduce the loss of critical metabolites such as ATP and limit anaerobic glycolysis and the consequent production of lactate.<sup>19,42</sup> We evaluated the effects of strategies blocking cAMP (adenylylase inhibitors and PC induction) on energy metabolism throughout the CIS period. This blockade of cAMP by a mechanism that is independent of NO preserved more of the ATP and adenosine nucleotide pool throughout CIS. This ATP preservation does not seem to be related to ATP production via anaerobic glycolysis because there is a close inverse relationship between ATP and glycolytic activity (as estimated by the accumulation of hexose 6-phosphates and the production of lactate). Consequently, ATP preservation induced by adenylylase inhibitors or PC throughout CIS may result from decreased ATP utilization. This could also explain the slower degradation of ATP in the liver that is induced by these strategies.

In the context of hepatic I/R, NO is an important protective molecule because of its vasodilator, antioxidant, and antineutrophil actions.<sup>29,43-45</sup> In addition, NO is one of the most promising candidates for mediating PC.<sup>13,23,26,28,46</sup> However, NO is detrimental if it combines with ROS to form ONOO<sup>-</sup>.<sup>13,47-50</sup> This may have occurred in the steatotic liver grafts of the TR group because all these factors (high NO levels, high ROS levels, and the presence of ONOO<sup>-</sup>) were observed. The oxidative and cytotoxic effects of ONOO<sup>-</sup> are well documented.<sup>37-39</sup> ONOO<sup>-</sup> leads to the depletion of cellular antioxidant defenses, the inactivation of enzymes, and the nitration of tyrosine residues in proteins, which may adversely affect their function and affect signal transduction processes.<sup>51</sup> Different results in cultured cells have been reported for the effects of cAMP on NO<sup>52-54</sup> and ROS<sup>8,9,10,55</sup>; these results have depended on the cell type and the experimental conditions. Moreover, it is not yet clear that the actions of cAMP on NO and ROS *in vitro* can be extrapolated to conditions *in vivo*. In our hands,

pharmacological and surgical blockers of cAMP (adenylylase inhibitors and PC induction) increased NO levels and reduced ROS levels in steatotic liver grafts in comparison with the levels of the TR group. Under these conditions, reduced nitrotyrosine levels were observed. Despite the high NO levels, the ROS levels observed after adenylylase inhibition or PC induction (which were at sham levels) might have been insufficient for combination with NO and the formation of ONOO<sup>-</sup>. These hypotheses about the relationship of NO and ROS are based on the fact that ONOO<sup>-</sup> forms when high levels of both NO and ROS are produced.<sup>37-39</sup> Given all these data and the results indicating that the benefits of cAMP-blocking strategies for oxidative stress and hepatic injury were abolished when NO was inhibited, we suggest that NO generation is a possible mechanism for the protection of cAMP-blocking strategies against oxidative stress in steatotic liver TR. The effects of NO on the ROS-generating system (XDH/XOD) and the antioxidant system (GSH) could explain how NO reduces oxidative stress in steatotic liver grafts. Indeed, low levels of antioxidant systems and high ROS production from the xanthine/XOD system have been observed in steatotic livers undergoing TR. XOD plays a crucial role in hepatic I/R injury when a significant conversion of XDH to XOD occurs (80%-90%).<sup>46,56</sup> This occurred in our study because the percentage of XOD in steatotic livers undergoing TR was 90%. In the same experimental model of liver TR described here, the inhibition of XOD with allopurinol prevented the production of ROS and effectively protected steatotic liver grafts against damage<sup>46</sup>; this indicates the involvement of XOD in hepatic damage in steatotic liver TR. Thus, any mechanism able to modulate the conversion of XDH to XOD or the amount of the requisite substrate for XOD (xanthine and hypoxanthine) could protect steatotic livers against damage. It is well known that high levels of either hypoxanthine or xanthine are markers of low survival rates for those undergoing liver TR.<sup>57-59</sup> The results of this study indicate that pharmacological and surgical blockers of cAMP (adenylylase inhibitors and PC induction) increase the levels of NO, which in turn reduces the percentage of XOD. Also, this blockade of cAMP, which is independent of NO, reduces the accumulation of a substrate for XOD. The preservation of GSH by NO might also contribute to the attenuation of the damaging effects of ROS on steatotic liver TR.

According to our results, these strategies that inhibit cAMP (adenylylase inhibitors and PC), which is mediated by NO, protect against endothelial cell damage and microvascular disorders in steatotic liver TR because they reduce the levels of hyaluronic acid, microvascular permeability, and edema. Microvascular dysfunction is known to be a very important event in I/R injury. An early sign of microvascular dysfunction is increased microvascular permeability to macromolecules. This increase in permeability allows the extravasation of proteins into the interstitium and accounts for the formation of edema.<sup>30,60,61</sup>

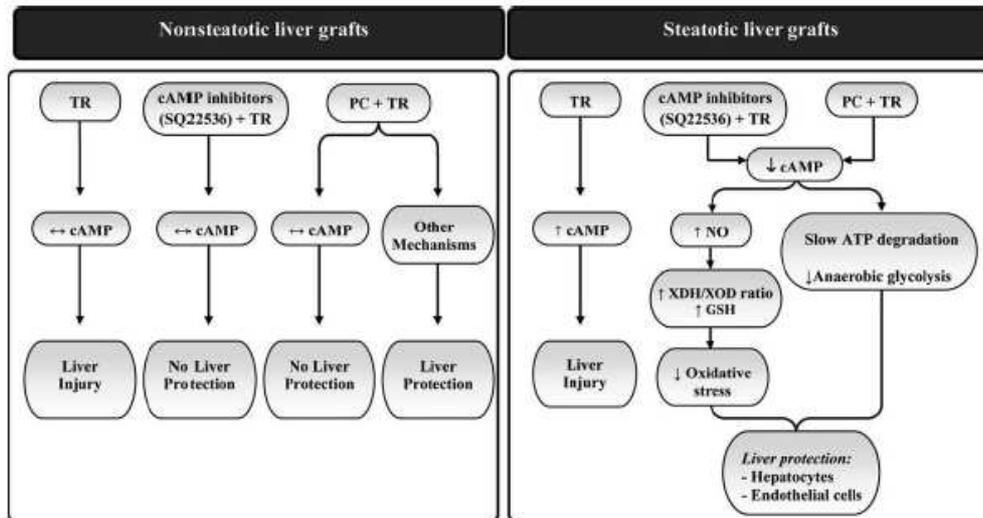


Figure 4. Schematic representation of the proposed mechanism by which cAMP-blocking strategies protect against liver injury during steatotic liver TR.

Together, the results of this study indicate that in liver TR, strategies based on cAMP blocking might be useful only in the presence of steatosis. In nonsteatotic liver grafts, pharmacological strategies blocking cAMP (SQ22536) did not protect against damage, and cAMP is not involved in the underlying protective mechanism of PC (Fig. 4). This study allows us to explain how cAMP-blocking strategies (the pharmacological cAMP inhibitor SQ22536 and PC induction) protect against injury in steatotic liver TR. These strategies slow ATP degradation and limit lactate accumulation, and they probably allow cells to survive under adverse conditions. Also, these cAMP blockers generate NO during steatotic liver TR. NO reduces XOD activity, preserves antioxidant systems such as GSH, and protects against endothelial cell damage and microvascular disorders in steatotic liver TR (Fig. 4). All of these could protect against damage in steatotic liver TR. With respect to clinical applications, our results support approaches aimed at blocking cAMP during steatotic liver TR. These approaches could include improvements in the initial conditions of donor livers with low levels of steatosis that are available for TR but have high rates of initial poor graft function or primary nonfunction. Such strategies could also increase the use of donor livers with severe steatosis, which are presently discarded because they are unsuitable for TR. Further studies are needed to confirm the feasibility of these cAMP-reducing strategies, especially in unstable donors who already experience donor stress secondary to hypotension and pressors.

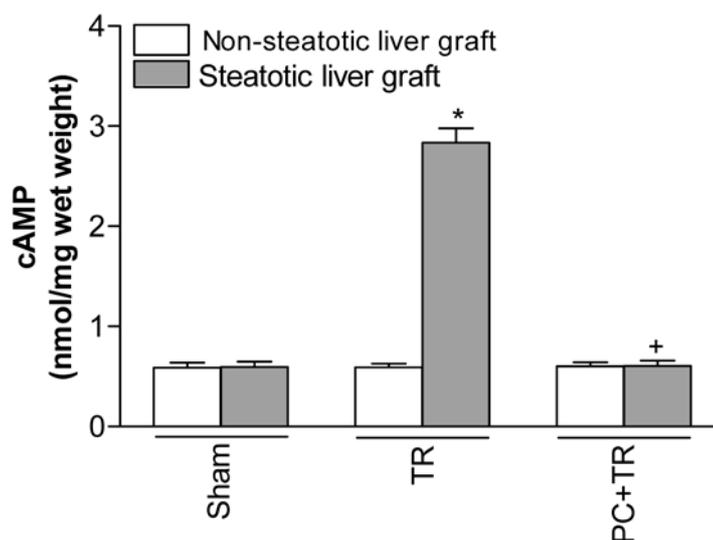
## REFERENCES

- D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW, Hoffmann RM, Reed A, Knechtle SJ, et al. The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary non-function after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1991;51:157-163.
- Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle ST, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation—a multivariate analysis. *Transplantation* 1993;55:807-813.
- Mei FC, Qiao J, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Quilliam LA, Cheng X. Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *J Biol Chem* 2002;277:11497-11504.
- Minor T, Akbar S, Yamamoto Y. Adenosine A2 receptor stimulation protects the predamaged liver from cold preservation through activation of cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A pathway. *Liver Transpl* 2000;6:196-200.
- Akbar S, Minor T. Significance and molecular targets of protein kinase A during cAMP-mediated protection of cold stored liver grafts. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1708-1714.
- Tomita I, Sawa M, Munakata T, Tanaka K, Kasai S. The beneficial effect of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on warm ischemic injury of the rat liver induced by cardiac arrest. *Transplantation* 1996;62:167-173.
- Van Ness K, Podkameni D, Schwartz M, Boros P, Miller C. Dibutyryl cAMP reduces nonparenchymal cell damage during cold preservation of rat livers. *J Surg Res* 1995;58:728-731.
- Takei K, Tokuyama K, Kato M, Morikawa A. Role of cyclic adenosine monophosphate in reducing superoxide anion generation in guinea pig alveolar macrophages. *Pharmacology* 1998;57:1-7.
- Chaves MM, Costa DC, Souza DA, Lima e Silva FC, Machado JA. Correlation between ROS production and InsP3 released by granulocytes from type 1 diabetic patients in a cAMP-dependent manner. *Curr Aging Sci* 2008;1:51-55.
- Nogueira-Machado JA, Lima e Silva FC, Cunha EP, Cal-solari MR, Costa DC, Perilo CS, et al. Modulation of the production of reactive oxygen species (ROS) by cAMP-

- elevating agents in granulocytes from diabetic patients: an Akt/PKB-dependent phenomenon. *Diabetes Metab* 2006;32:331-335.
11. Ishikawa H, Jin MB, Ogata T, Taniguchi M, Suzuki T, Shimamura T, et al. Role of cyclic nucleotides in ischemia and reperfusion injury of canine livers. *Transplantation* 2002;73:1041-1048.
  12. Minor T, Akbar S. Enhancement of endogenous cyclic AMP signal: a new approach to allow for cold preservation of rat livers from non-heart-beating donors? *Transplantation* 1998;66:990-994.
  13. Carrasco-Chaumeil E, Roselló-Catafau J, Bartrons R, Franco-Gou R, Xaus C, Casillas A, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase and nitric oxide in rat steatotic liver transplantation. *J Hepatol* 2005;43:997-1006.
  14. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Contribution of adenosine A<sub>2</sub> receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury in rat livers. *Hepatology* 2000;32:297-302.
  15. Alfany-Fernandez I, Casillas-Ramirez A, Bintanel-Morcillo M, Brosnihan KB, Ferrario CM, Serafin A, et al. Therapeutic targets in liver transplantation: angiotensin II in nonsteatotic grafts and angiotensin-(1-7) in steatotic grafts. *Am J Transplant* 2009;9:439-451.
  16. Selzner M, Rüdiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology* 2000;32:1280-1288.
  17. Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 1979;28:47-50.
  18. Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 1999;104:1631-1639.
  19. Peralta C, Bartrons R, Riera L, Manzano A, Xaus C, Gelpi E, Roselló-Catafau J. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G163-G171.
  20. Tolliver BK, Ho LB, Fox LM, Berger SP. Necessary role for ventral tegmental area adenylylase and protein kinase A in induction of behavioral sensitization to intraventricular tegmental area amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:38-47.
  21. Avendano CE, Billman GE. Effect of interventions that increase cyclic AMP levels on susceptibility to ventricular fibrillation in unanesthetized dogs. *Eur J Pharmacol* 1994;255:99-109.
  22. Franco-Gou R, Peralta C, Massip-Salcedo M, Xaus C, Serafin A, Roselló-Catafau J. Protection of reduced-size liver for transplantation. *Am J Transplant* 2004;4:1408-1420.
  23. Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P, Williams JW. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1998;66:152-157.
  24. Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blázquez C, Guzmán M, Prats N, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 2001;34:1164-1173.
  25. Peralta C, Rull R, Rimola A, Deulofeu R, Roselló-Catafau J, Gelpi E, Rodés J. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001;71:529-536.
  26. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Roselló-Catafau J. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A<sub>2</sub> receptors. *Hepatology* 1999;29:126-132.
  27. Hortelano S, Genaro AM, Bosca L. Phorbol esters induce nitric oxide synthase activity in rat hepatocytes. Antagonism with the induction elicited by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1992;267:24937-24940.
  28. Serafin A, Roselló-Catafau J, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Peralta C. Ischemic preconditioning increases the tolerance of fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am J Pathol* 2002;161:587-601.
  29. Greenacre SA, Evans P, Halliwell B, Brain SD. Formation and loss of nitrated proteins in peroxynitrite-treated rat skin in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:781-786.
  30. Peralta C, Bulbena O, Bargalló R, Prats N, Gelpi E, Roselló-Catafau J. Strategies to modulate the deleterious effects of endothelin in hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation* 2000;70:1761-1770.
  31. Vázquez-Gil MJ, Mesonero MJ, Flores O, Criado M, Hidalgo F, Arévalo MA, et al. Sequential changes in redox status and nitric oxide synthases expression in the liver after bile duct ligation. *Life Sci* 2004;75:717-732.
  32. Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Raheemulla A, Thomas P, Dannenberg AJ. Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-kappa B-dependent genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G321-G327.
  33. Hsle AW, Kawashima K, O'Neill JP, Schröder CH. Possible role of adenosine cyclic 3':5'-monophosphate phosphodiesterase in the morphological transformation of Chinese hamster ovary cells mediated by N<sub>6</sub>,O<sub>2</sub>-dibutyl adenosine cyclic 3':5'-monophosphate. *J Biol Chem* 1975;250:984-989.
  34. O'Neill JP, Schröder CH, Hsle AW. Hydrolysis of butyryl derivatives of adenosine cyclic 3':5'-monophosphate by Chinese hamster ovary cell extracts and characterization of the products. *J Biol Chem* 1975;250:990-995.
  35. Sandhu R, Thomas U, Diaz RJ, Wilson GJ. Effect of ischemic preconditioning of the myocardium on cAMP. *Circ Res* 1996;78:137-147.
  36. Hers HG, Hue L. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu Rev Biochem* 1983;52:617-653.
  37. Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994;78:931-936.
  38. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271(pt 1):C1424-C1437.
  39. Grisham MB, Jourdain D, Wink DA. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999;276(pt 1):G315-G321.
  40. Nogueira-Machado JA, Lima e Silva FC, Medina LO, Costa DC, Chaves MM. Modulation of the reactive oxygen species (ROS) generation mediated by cyclic AMP-elevating agents or interleukin 10 in granulocytes from type 2 diabetic patients (NIDDM): a PKA-independent phenomenon. *Diabetes Metab* 2003;29:533-537.
  41. Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res* 1997;33:243-257.
  42. Neely JR, Grotyohann LW. Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ Res* 1984;55:816-824.
  43. Caplan MS, Hedlund E, Hill N, MacKendrick W. The role of endogenous nitric oxide and platelet-activating factor in hypoxia-induced intestinal injury in rats. *Gastroenterology* 1994;106:346-352.

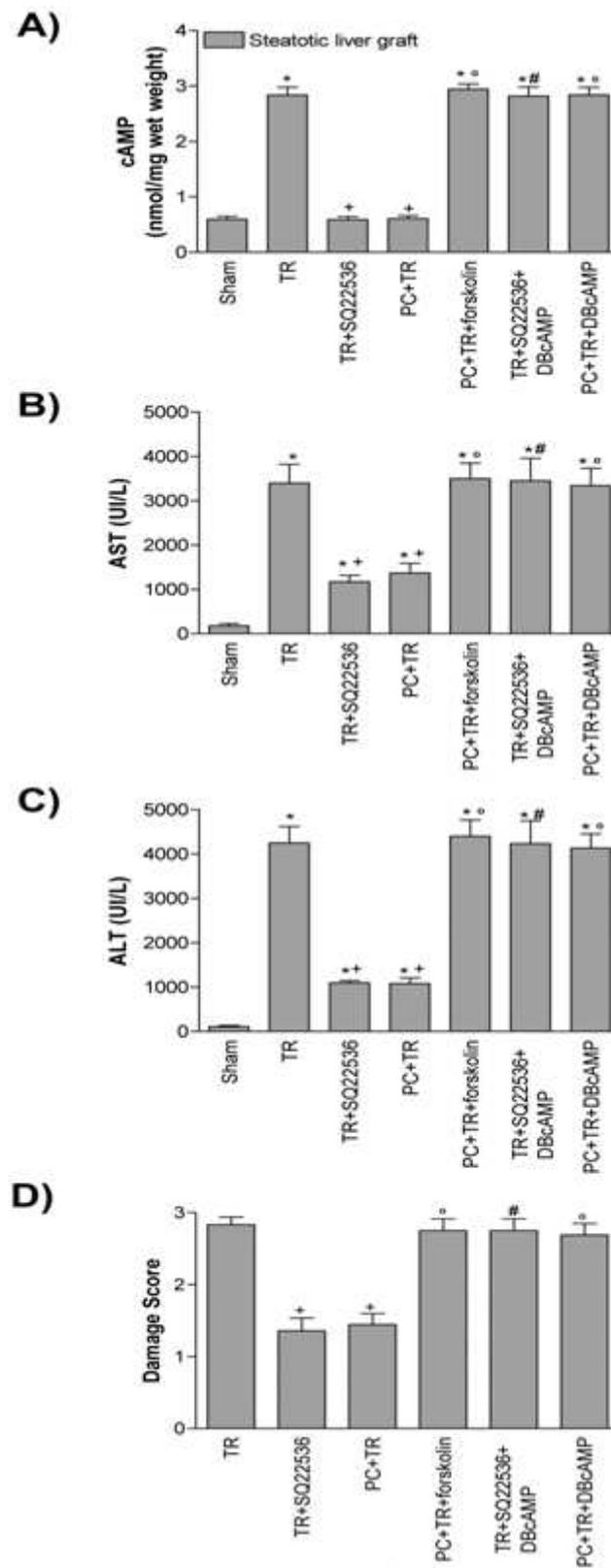
44. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Takeuchi Y, Harada A, Nakao A, Takagi H. Role of endogenous nitric oxide in ischemia reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995;59:772-779.
45. Williams MW, Taft CS, Ramnauth S, Zhao ZQ, Vinten Johansen J. Endogenous nitric oxide (NO) protects against ischemia reperfusion injury in the rabbit. *Cardiovasc Res* 1995;30:79-86.
46. Fernández L, Carrasco Chaumel E, Serafin A, Kaus C, Grande L, Rimola A, et al. Is ischemic preconditioning a useful strategy in steatotic liver transplantation? *Am J Transplant* 2004;4:888-899.
47. Jaeschke H, Schini VB, Fathood A. Role of nitric oxide in the oxidant stress during ischemia/reperfusion injury of the liver. *Life Sci* 1992;50:1797-1804.
48. López Nebliña F, Paez AJ, Toledo AH, Toledo Pereyra LH. Role of nitric oxide in ischemia/reperfusion of the rat kidney. *Circ Shock* 1994;44:91-95.
49. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:214-220.
50. Ferdinandy P, Schuk R. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in myocardial ischemia reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* 2003;138:532-543.
51. MacMillan Crow LA, Crow JP, Thompson JA. Peroxynitrite mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 1998;37:1613-1622.
52. Mustafa SB, Olson MS. Expression of nitric oxide synthase in rat Kupffer cells is regulated by cAMP. *J Biol Chem* 1998;273:5073-5080.
53. Zhang XF, Hintze TH. cAMP signal transduction induces eNOS activation by promoting PKB phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H2376-H2384.
54. Nogueira Machado JA, Lima E Silva FC, Lima E Silva R, Medina LO, Costa DC, Chaves MM. Effect in vitro of cyclic nucleotides elevating agents on nitric oxide production by human granulocytes from type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 2002;28:45-50.
55. Isoni CA, Borges EA, Veloso CA, Mattos RT, Chaves MM, Nogueira Machado JA. cAMP activates the generation of reactive oxygen species and inhibits the secretion of IL-6 in peripheral blood mononuclear cells from type 2 diabetic patients. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2:317-321.
56. Jaeschke H. Xanthine oxidase induced oxidant stress during hepatic ischemia reperfusion: are we coming full circle after 20 years? *Hepatology* 2002;36:761-763.
57. Nagayama M, Katsuramaki T, Kimura H, Isebe M, Meguro M, Matsuno T, et al. Prediction of graft viability from non heart beating donor pigs using hepatic microdialysate hypoxanthine levels. *J Surg Res* 2002;107:210-218.
58. Harvey PR, Lu S, McKeown CM, Petrunka CN, Ison RG, Strasberg SM. Adenine nucleotide tissue concentrations and liver allograft viability after cold preservation and warm ischemia. *Transplantation* 1988;45:1016-1020.
59. Nieto M, Valero R, Almenara R, Rull R, Gonzalez FJ, Taurá F, et al. Hepatic xanthine levels as viability predictor of livers procured from non heart beating donor pigs. *Transplantation* 2001;71:1232-1237.
60. Noel AA, Hobson RW II, Durán WN. Platelet activating factor and nitric oxide mediate microvascular permeability in ischemia reperfusion injury. *Microvasc Res* 1996;52:210-220.
61. Verrier E. The microvascular cell and ischemia reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27(suppl 1):S26-S30.

Figura Suplementaria 1.



Supporting Information Figure 1. Cyclic AMP (cAMP) levels were determined 4 h after reperfusion in steatotic and non-steatotic liver grafts. TR: transplantation, PC+TR: TR with previous ischemic preconditioning. \*P < 0.05 versus Sham, +P < 0.05 versus TR

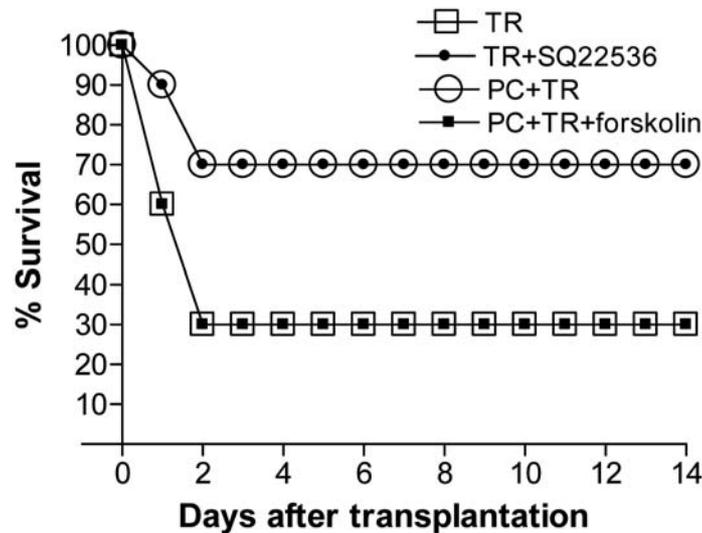
Figura Suplementaria 2.



Supporting Information Figure 2. Cyclic AMP (cAMP) (A), transaminase (B and C) and damage score (D) levels were determined 4 h after reperfusion in steatotic liver grafts. AST: aspartate

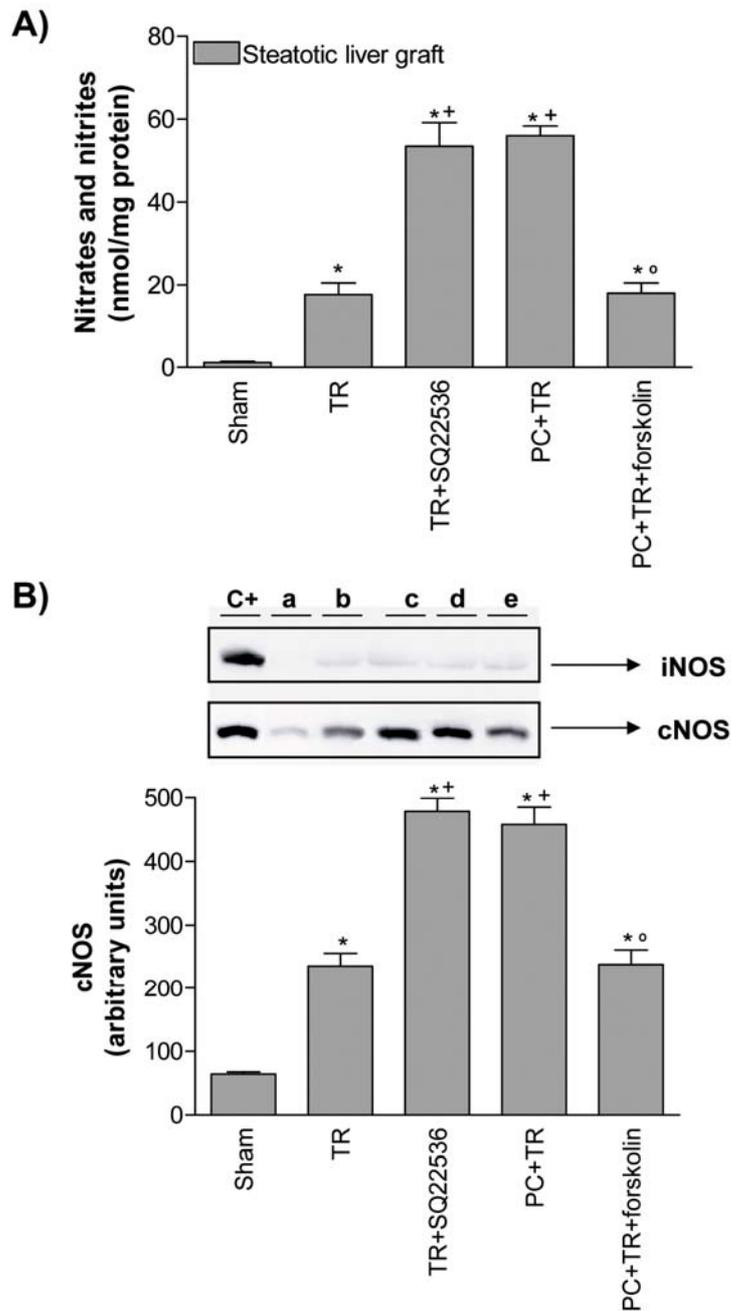
aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; TR: transplantation, TR+SQ22536: TR treated with adenylate cyclase inhibitor, 9-(tetra-hydro-2-furanyl)-9H-purin-6 amine (SQ22536); PC+TR: TR with previous ischemic preconditioning; PC+TR+forskolin: PC+TR treated with adenylate cyclase activator (forskolin); TR+SQ22536+DBcAMP: TR treated with SQ22536 and cAMP analog, dibutyryl cAMP (DBcAMP); PC+TR+DBcAMP: PC+TR treated with DBcAMP. \*P < 0.05 versus Sham, +P < 0.05 versus TR, #P < 0.05 versus TR+SQ22536; and °P < 0.05 versus PC+TR

Figura Suplementaria 3.



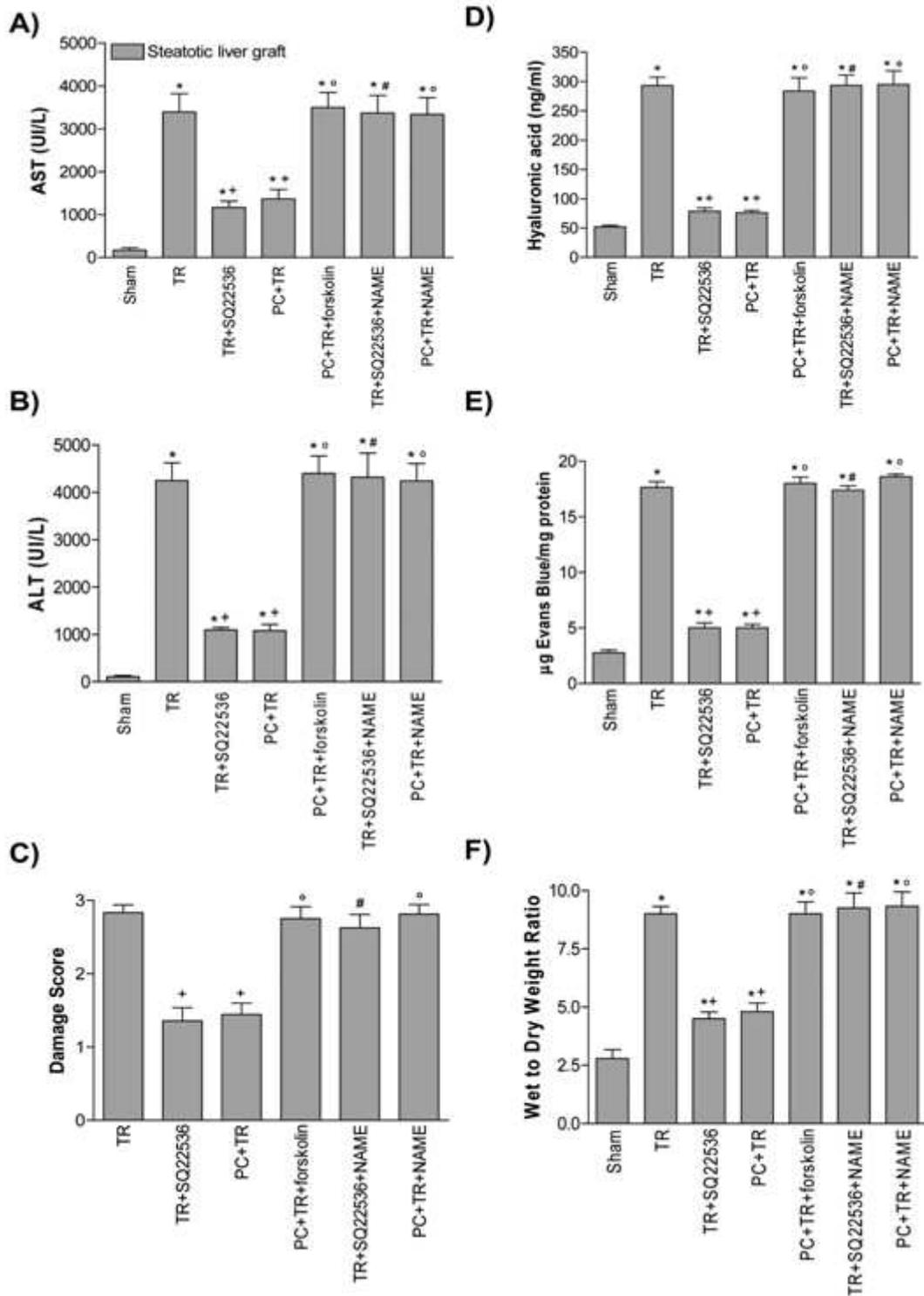
Supporting Information Figure 3. Survival of recipients transplanted with steatotic liver grafts at 14 days after transplantation. Recipients transplanted with steatotic liver grafts without treatment (TR group, □), recipients transplanted with steatotic liver grafts treated with adenylate cyclase inhibitor (TR+SQ22536 group, •), recipients transplanted with steatotic liver grafts with previous ischemic preconditioning (PC+TR group, ○), recipients transplanted with steatotic liver grafts with previous ischemic preconditioning and administration of adenylate cyclase activator (PC+TR+forskolin group, ▣). TR: transplantation, TR+SQ22536: TR treated with adenylate cyclase inhibitor, 9-(tetra-hydro-2-furanyl)-9H-purin-6 amine (SQ22536); PC+TR: TR with previous ischemic preconditioning; PC+TR+forskolin: PC+TR treated with adenylate cyclase activator (forskolin). Survival curves were calculated using Kaplan-Meier's method. 14-day survival rate: TR+SQ22536 group versus TR group (P < 0,05); TR+SQ22536 group versus PC+TR group (P=NS); PC+TR group versus TR group (P < 0,05); PC+TR+forskolin group versus PC+TR group (P < 0,05); PC+TR+forskolin group versus TR group (P=NS).

Figura Suplementaria 4.



Supporting Information Figure 4. A) Nitrites and nitrites and B) Representative Western blot of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and constitutive nitric oxide synthase (cNOS) at the top (a: Sham; b: TR; c: TR+SQ22536; d: PC+TR; e: PC+TR+forskolin) and densitometric analysis of cNOS at the bottom were analysed 4 h after reperfusion in steatotic liver grafts. TR: transplantation, TR+SQ22536: TR treated with adenylate cyclase inhibitor, 9-(tetra-hydro-2-furanyl)-9H-purin-6 amine (SQ22536); PC+TR: TR with previous ischemic preconditioning; PC+TR+forskolin: PC+TR treated with adenylate cyclase activator (forskolin). Mouse macrophages stimulated with interferon gamma/lipopolysaccharide and human endothelial cell lysate were used as positive controls (C+) for iNOS and cNOS, respectively. \*P < 0.05 versus Sham, +P < 0.05 versus TR, °P < 0.05 versus PC+TR.

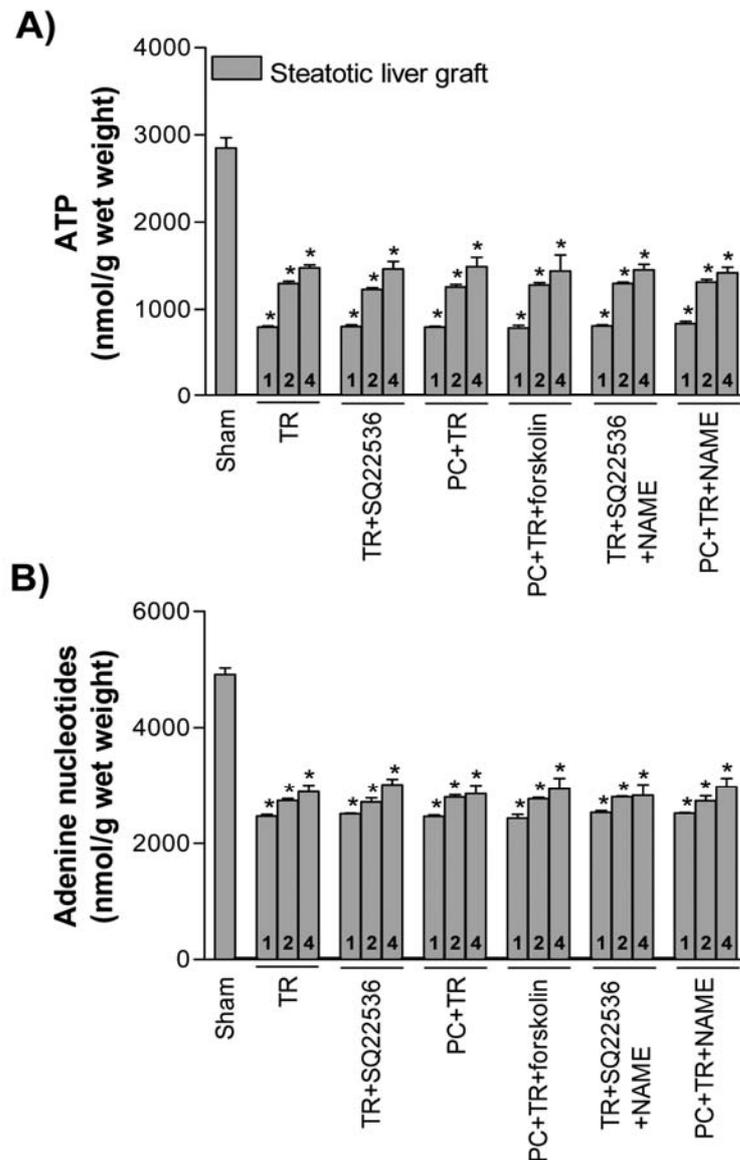
Figura Suplementaria 5.



Supporting Information Figure 5. Transaminases (A, B), damage score (C), hyaluronic acid (D), vascular permeability (E) and edema (F) were determined 4 h after reperfusion in steatotic liver grafts. AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; TR: transplantation, TR+SQ22536: TR treated with adenylate cyclase inhibitor, 9-(tetra-hydro-2-furanyl)-9H-purin-6 amine (SQ22536); PC+TR: TR with previous ischemic preconditioning; PC+TR+forskolin:

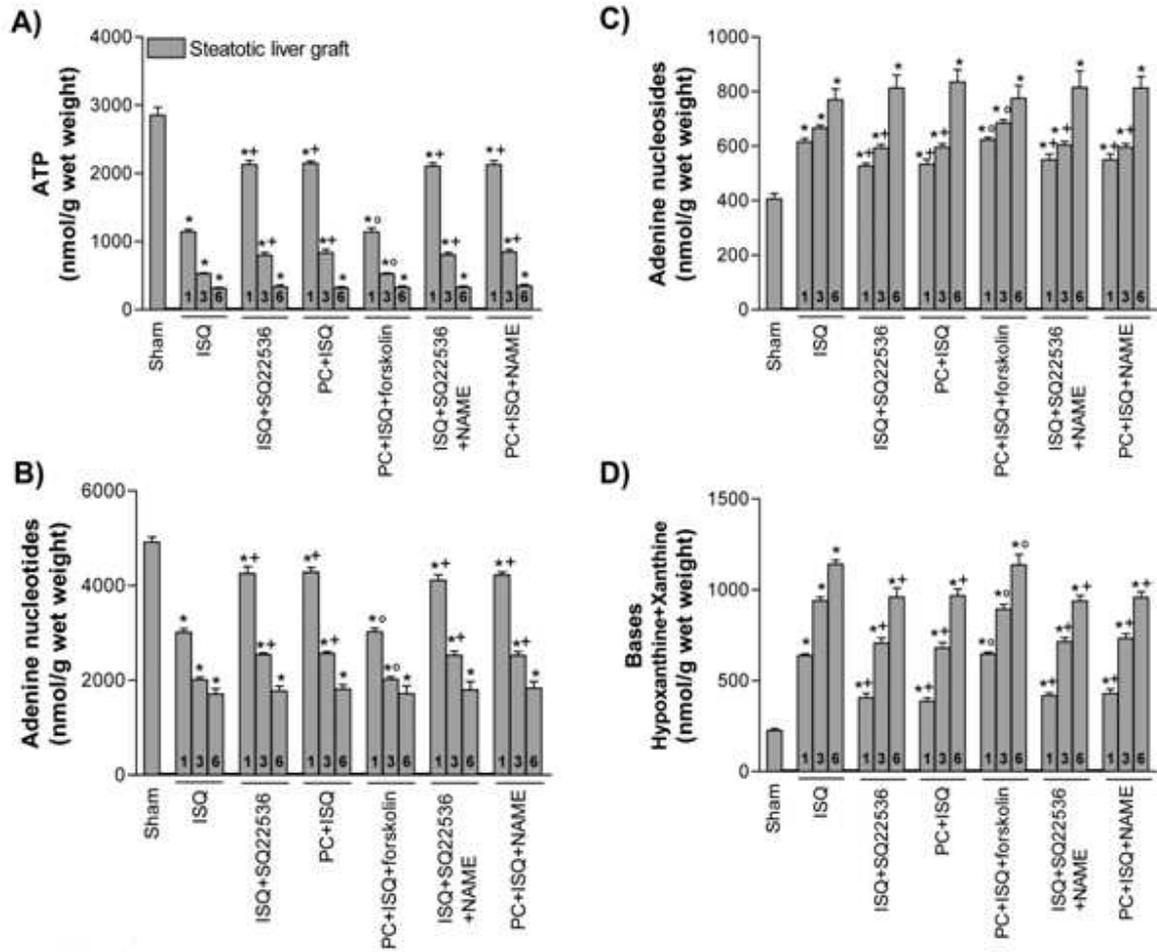
PC+TR treated with adenylate cyclase activator (forskolin); TR+SQ22536+NAME: TR treated with SQ22536 and nitric oxide synthesis inhibitor, N-Nitro-L-Arginine methylester (L-NAME); PC+TR+NAME: PC+TR treated with L-NAME. \*P < 0.05 versus Sham, +P < 0.05 versus TR, #P < 0.05 versus TR+SQ22536; and °P < 0.05 versus PC+TR.

Figura Suplementaria 6.



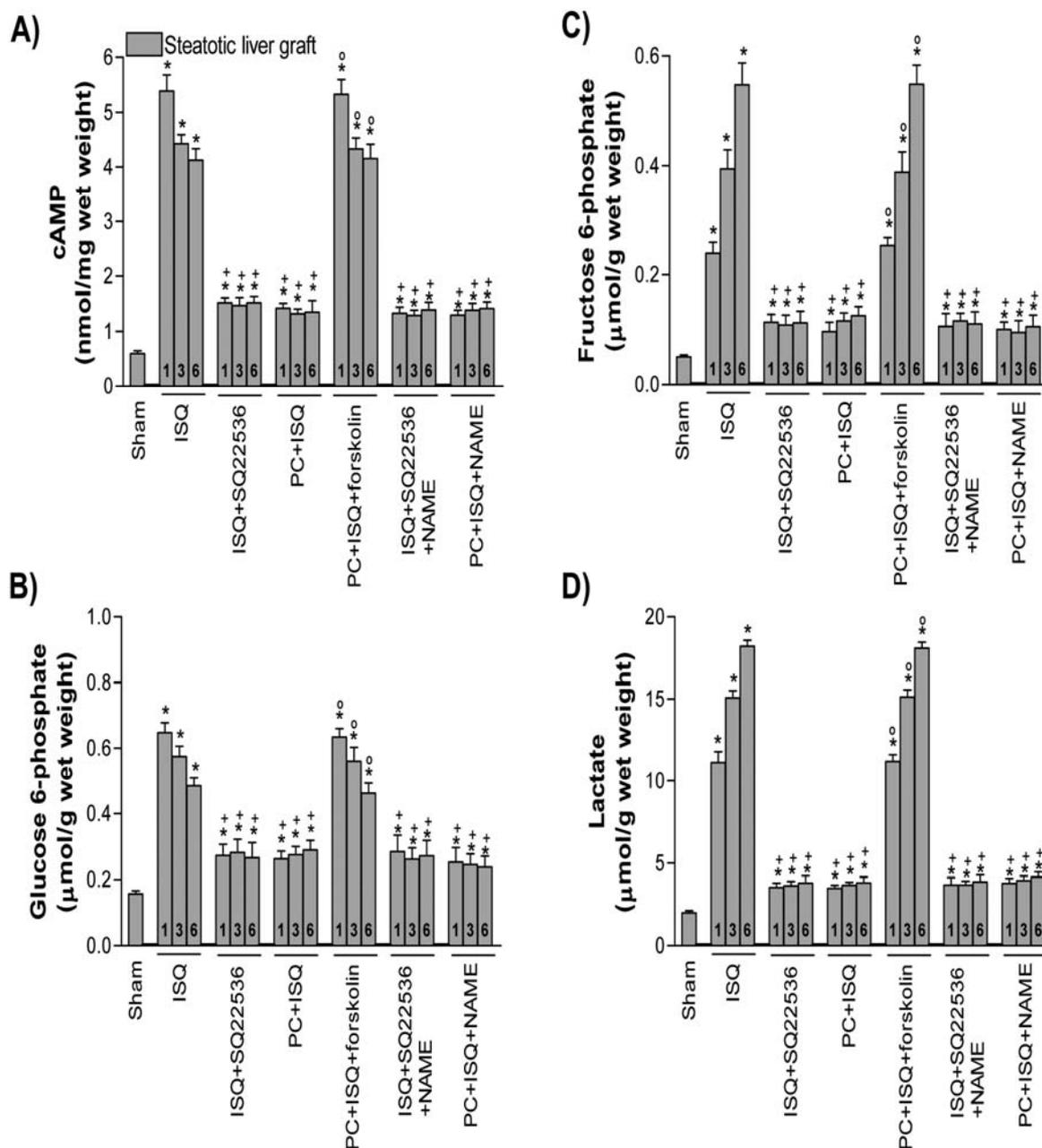
Supporting Information Figure 6. ATP (A) and adenine nucleotides (ATP+ADP+AMP) (B) were determined in steatotic liver grafts after 1 h, 2 h and 4 h of reperfusion (bars labeled as 1, 2 and 4, respectively). TR: transplantation, TR+SQ22536: TR treated with adenylate cyclase inhibitor, 9-(tetra-hydro-2-furanyl)-9H-purin-6 amine (SQ22536); PC+TR: TR with previous ischemic preconditioning; PC+TR+forskolin: PC+TR treated with adenylate cyclase activator (forskolin); TR+SQ22536+NAME: TR treated with SQ22536 and nitric oxide synthesis inhibitor, N-Nitro-L-Arginine methylester (L-NAME); PC+TR+NAME: PC+TR treated with L-NAME. \*P < 0.05 versus Sham.

Figura Suplementaria 7.



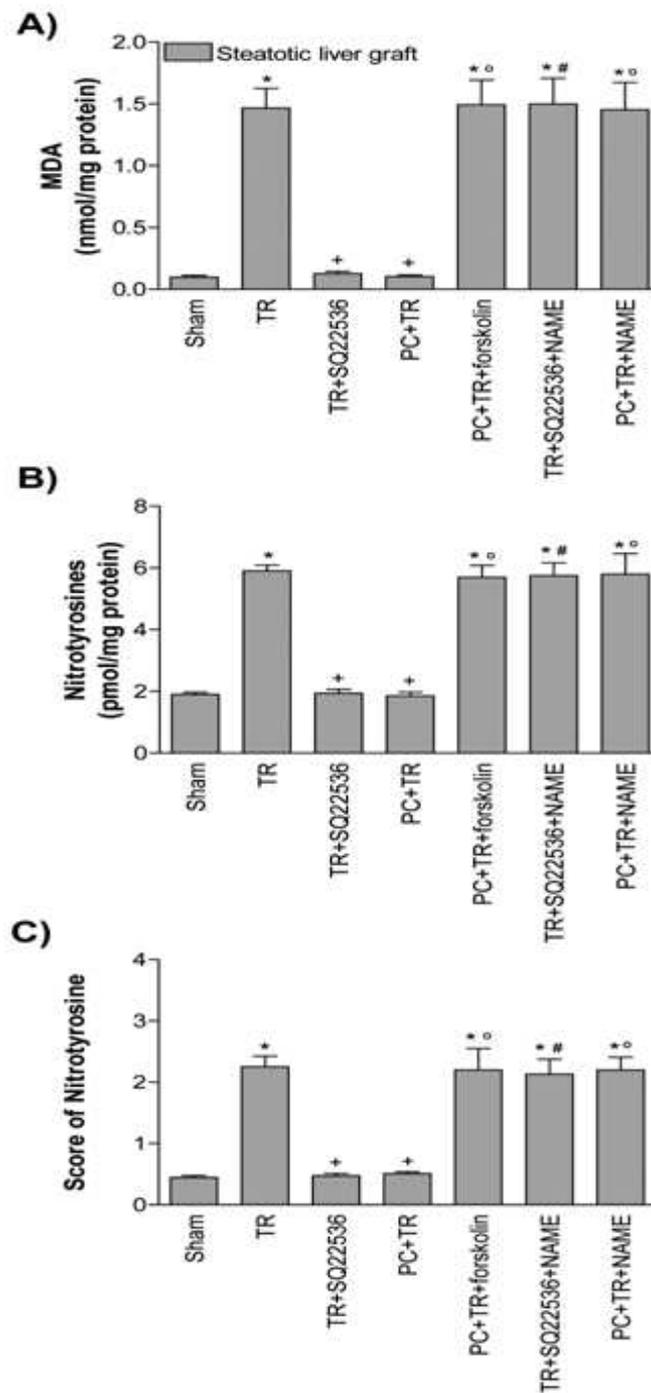
Supporting Information Figure 7. ATP (A), adenine nucleotides (B), nucleosides (C) and bases (hypoxanthine and xanthine) (D) were determined in steatotic liver grafts after 1 h, 3 h and 6 h of cold ischemia (bars labeled as 1, 3 and 6, respectively). ISQ: cold ischemia; ISQ+SQ22536: ISQ treated with adenylylase inhibitor, 9-(tetra-hydro-2-furanyl)-9H-purin-6 amine (SQ22536); PC+ISQ: cold ischemia with previous ischemic preconditioning; PC+ISQ+forskolin: PC+ISQ treated with adenylylase activator (forskolin); ISQ+SQ22536+NAME: ISQ treated with SQ22536 and nitric oxide synthesis inhibitor, N-Nitro-L-Arginine methylester (L-NAME); PC+ISQ+NAME: PC+ISQ treated with L-NAME. \*P < 0.05 versus Sham, +P < 0.05 versus ISQ and °P < 0.05 versus PC+ISQ.

Figura Suplementaria 8.



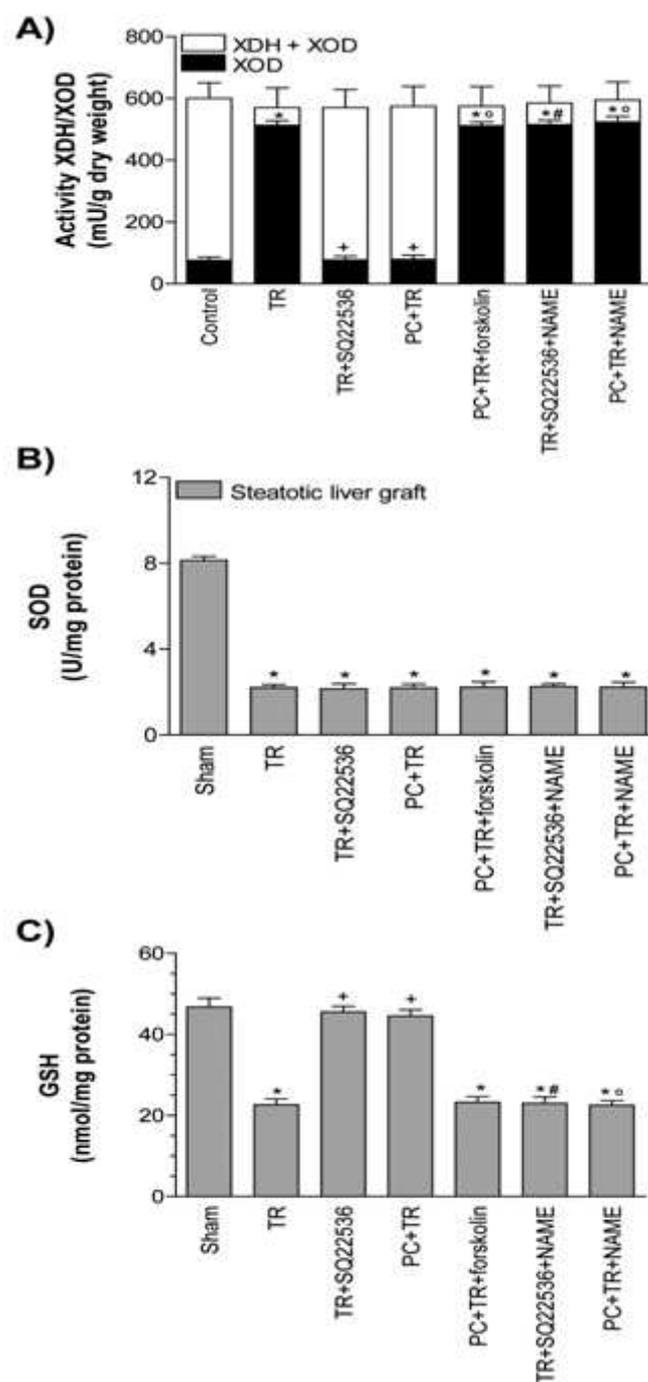
Supporting Information Figure 8. cyclic AMP (cAMP) (A), hexoses 6-phosphate [(glucose 6-phosphate (B) and fructose 6-phosphate (C)] and lactate (D) were analysed in steatotic liver grafts after 1 h, 3 h and 6 h of cold ischemia (bars labeled as 1, 3 and 6, respectively). ISQ: cold ischemia; ISQ+SQ22536: ISQ treated with adenylylase inhibitor, 9-(tetra-hydro-2-furanyl)-9H-purin-6 amine (SQ22536); PC+ISQ: cold ischemia with previous ischemic preconditioning; PC+ISQ+forskolin: PC+ISQ treated with adenylylase activator (forskolin); ISQ+SQ22536+NAME: ISQ treated with SQ22536 and nitric oxide synthesis inhibitor, N-Nitro-L-Arginine methylester (L-NAME); PC+ISQ+NAME: PC+ISQ treated with L-NAME. \*P < 0.05 versus Sham, +P < 0.05 versus ISQ and °P < 0.05 versus PC+ISQ.

Figura Suplementaria 9.



Supporting Information Figure 9. Malondialdehyde (MDA) (A), nitrotyrosines (B) and score of nitrotyrosine (C) were determined 4 h after reperfusion in steatotic liver grafts. TR: transplantation, TR+SQ22536: TR treated with adenylate cyclase inhibitor, 9-(tetra-hydro-2-furanyl)-9H-purin-6 amine (SQ22536); PC+TR: TR with previous ischemic preconditioning; PC+TR+forskolin: PC+TR treated with adenylate cyclase activator (forskolin); TR+SQ22536+NAME: TR treated with SQ22536 and nitric oxide synthesis inhibitor, N-Nitro-L-Arginine methylester (L-NAME); PC+TR+NAME: PC+TR treated with L-NAME. \*P < 0.05 versus Sham, +P < 0.05 versus TR, #P < 0.05 versus TR+SQ22536 and °P < 0.05 versus PC+TR.

Figura Suplementaria 10.



Supporting Information Figure 10. Xanthine dehydrogenase (XDH)/xanthine oxidase (XOD) (A), superoxide dismutase (SOD) (B) and glutathione (GSH) (C) were determined 4 h after reperfusion in steatotic liver grafts. TR: transplantation, TR+SQ22536: TR treated with adenylate cyclase inhibitor, 9-(tetra-hydro-2-furanyl)-9H-purin-6 amine (SQ22536); PC+TR: TR with previous ischemic preconditioning; PC+TR+forskolin: PC+TR treated with adenylate cyclase activator (forskolin); TR+SQ22536+NAME: TR treated with SQ22536 and nitric oxide synthesis inhibitor, N-Nitro-L-Arginine methylester (L-NAME); PC+TR+NAME: PC+TR treated with L-NAME. \* $P < 0.05$  versus sham, + $P < 0.05$  versus TR, # $P < 0.05$  versus TR+SQ22536 and ° $P < 0.05$  versus PC+TR.

## 2. SEGUNDO ESTUDIO

### **Tauroursodeoxycholic Acid Affects PPAR $\gamma$ y TLR4 in Steatotic Liver Transplantation**

**Mónica B. Jiménez Castro**, Maria Elías Miro, Mariana Mendes Braz, Antoniette Lemoine, Antoni Rimola, Juan Rodés, Araní Casillas Ramírez\*, Carmen Peralta\*.

*American Journal of Transplantation.* 2012;12(12):3257-3271.

No se observaron alteraciones ni en la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) ni en el estrés del retículo endoplasmático en injertos hepáticos esteatósicos y no esteatósicos después de 6 horas de preservación en solución UW y sometidos a trasplante. De hecho los niveles de proteína GRP78 en los injertos hepáticos fueron similares a los del grupo Sham. Las tres ramas de la vía del UPR (ATF6, IRE1 y PERK) se encontraron inactivadas en los injertos hepáticos. Los niveles de la proteínas ATF6 $\alpha$  p-50 y ATF6 $\beta$  p-50, XBP1(s), TRAF2, PERK fosforilada y eIF2 $\alpha$  fosforilada y la acumulación de ATF4 y de la proteína CHOP en injertos hepáticos fueron similares a el grupo Sham. Esto ocurrió en trasplante hepático tanto singénico como alogénico.

La administración de TUDCA protegió únicamente a los injertos hepáticos esteatósicos y lo hizo a través de un mecanismo independiente del estrés del retículo endoplasmático. El TUDCA redujo PPAR $\gamma$  y la lesión hepática por I/R en injertos esteatósicos. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que cuando el PPAR $\gamma$  es activado, el TUDCA ya no es capaz de reducir la lesión hepática. Además de lo anterior, se demostró que los inhibidores del PPAR $\gamma$  (TUDCA y antagonistas de PPAR $\gamma$ ) aumentaron la expresión de TLR4, en concreto la vía del dominio-TIR que contiene el adaptador inductor de interferón- $\beta$  (TRIF). En consonancia con lo anterior, el tratamiento con agonistas del TLR4 redujo la lesión por I/R en injertos hepáticos esteatósicos sometidos a trasplante. Cuando se inhibió la acción del TLR4, se eliminaron los efectos beneficiosos del antagonista del PPAR $\gamma$  sobre la lesión por I/R en injertos esteatósicos. Así pues, el TUDCA redujo el PPAR $\gamma$ , y este a su vez aumentó la expresión de TLR4 y protegió frente a la lesión hepática. Esta vía de señalización se ha evidenciado tanto en trasplante hepático singénico como alogénico con injertos esteatósicos.

## Tauroursodeoxycholic Acid Affects PPAR $\gamma$ and TLR4 in Steatotic Liver Transplantation

M. B. Jiménez-Castro<sup>a</sup>, M. Elias-Miro<sup>a</sup>,  
M. Mendes-Braz<sup>a,b</sup>, A. Lemoine<sup>c</sup>, A. Rimola<sup>d,e</sup>,  
J. Rodés<sup>a,e</sup>, A. Casillas-Ramírez<sup>a,†</sup>  
and C. Peralta<sup>a,d,\*,†</sup>

<sup>a</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBPAs), Barcelona, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

<sup>c</sup>APHP, Biochimie et Oncogénétique Moléculaire, Inserm U1004/Université Paris 11, Institut du Foie, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

<sup>d</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain

<sup>e</sup>Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

\*Corresponding author: Carmen Peralta,  
cperalta@clinic.ub.es

†Both authors contributed equally to this work.

Numerous steatotic livers are discarded for transplantation because of their poor tolerance to ischemia-reperfusion (I/R). We examined whether tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), a known inhibitor of endoplasmic reticulum (ER) stress, protects steatotic and nonsteatotic liver grafts preserved during 6 h in University of Wisconsin (UW) solution and transplanted. The protective mechanisms of TUDCA were also examined. Neither unfolded protein response (UPR) induction nor ER stress was evidenced in steatotic and nonsteatotic liver grafts after 6 h in UW preservation solution. TUDCA only protected steatotic livers grafts and did so through a mechanism independent of ER stress. It reduced proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and damage. When PPAR $\gamma$  was activated, TUDCA did not reduce damage. TUDCA, which inhibited PPAR $\gamma$ , and the PPAR $\gamma$  antagonist treatment up-regulated toll-like receptor 4 (TLR4), specifically the TIR domain-containing adaptor inducing IFN $\beta$  (TRIF) pathway. TLR4 agonist treatment reduced damage in steatotic liver grafts. When TLR4 action was inhibited, PPAR $\gamma$  antagonists did not protect steatotic liver grafts. In conclusion, TUDCA reduced PPAR $\gamma$  and this in turn up-regulated the TLR4 pathway, thus protecting steatotic liver grafts. TLR4 activating-based strategies could reduce the inherent risk of steatotic liver failure after transplantation.

**Key words:** ER stress, PPAR- $\gamma$ , steatotic liver grafts, TLR4, transplantation, TUDCA

**Abbreviations:** ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ATF4, activating transcription factor 4; ATF6, activating transcription factor 6; CHOP, C/EBP homologous protein; eIF2 $\alpha$ , eukaryotic translation initiation factor 2 subunit  $\alpha$ ; ER, endoplasmic reticulum; GRP78, 78-kDa glucose-regulated/binding immunoglobulin protein; GW9662, 2-chloro-5-nitro-N-phenylbenzamide; HTK, histidine tryptophan ketoglutarate; IRE1, inositol-requiring enzyme 1; I/R, ischemia-reperfusion; Ln, lean; MDA, malondialdehyde; MPL-A, monophosphoryl lipid A; MyD88, myeloid differentiation factor 88; Ob, obese; PPAR- $\gamma$ , peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ ; Rosiglitazone, (RS)-5-[4-(2-[methyl(pyridine-2-yl)-amino]ethoxy)benzyl]thiazolidine-2,4-dione; ROS, reactive oxygen species; TLR4, toll-like receptor 4; TR, transplantation; TRAF2, tumor necrosis factor-associated factor 2; TRIF, TIR domain-containing-adaptor inducing IFN- $\beta$ ; TUDCA, tauroursodeoxycholic acid; UPR, unfolded protein response; UW, University of Wisconsin; XBP-1, X-box-binding protein 1.

Received 31 May 2012, revised 13 July 2012 and accepted for publication 30 July 2012

### Introduction

Ischemia-reperfusion (I/R) injury is a major cause of early graft dysfunction after liver transplantation. Steatosis is currently estimated to be present in up to 50% of deceased donor livers and is recognized as the key donor variable predicting posttransplant outcomes (1–3). The use of steatotic livers for transplantation is associated with increased risk of graft dysfunction or failure after surgery. In addition, many steatotic livers are discarded for transplantation, exacerbating the critical shortage of donor livers (1, 4, 5).

Endoplasmic reticulum (ER) stress is emerging as an important component of inflammatory responses in the liver associated with I/R processes (6, 7). In response to ER stress, a signal transduction cascade termed “the unfolded protein response (UPR)” is induced (8, 9). The UPR has three branches: inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), PKR-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor (ATF6). These proteins are normally held in inactive states in ER membranes by binding to intra-ER chaperones, particularly the 78-kDa glucose-regulated/binding immunoglobulin protein (GRP78). When injury is excessive, these ER stress

Jiménez-Castro et al.

signal transduction pathways can also induce cell death (8,9).

Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), a natural hydrophilic bile salt that modulates ER stress (9,10), has been approved for clinical use as a protective agent in various liver diseases, including cholestatic liver diseases and cirrhosis (11–15). In our knowledge, only two studies evaluate ER stress in both steatotic and nonsteatotic livers subjected to I/R (6,7). In one study, TUDCA treatment protected both liver types against ER stress under warm ischemia (7). In the second study, the authors preserved liver grafts with histidine tryptophan ketoglutarate (HTK) solution for 2 h. ER stress responses occurred in both liver grafts undergoing transplantation, but were greater in the presence of steatosis (6). Under these conditions, TUDCA reduced ER stress posttransplantation, thus protecting against I/R damage. Potential action mechanisms of TUDCA other than ER stress were not evaluated in the study (6).

In this study, we investigated whether the benefits of TUDCA on ER damage in liver grafts undergoing 2 h of cold ischemia in HTK solution (6) could be also extrapolated to both steatotic and nonsteatotic liver grafts during 6 h of cold preservation in University of Wisconsin (UW) solution. UW solution has become the standard for organ preservation for transplantation (1). Furthermore, liver grafts are usually preserved from 6 to 8 h during clinical transplantation (16–19).

The molecular mechanisms involved in the therapeutic effect of TUDCA are not fully elucidated. Given the inactivation of proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) induced by TUDCA in isolated hepatocytes (20), we investigated the effects of TUDCA on PPAR $\gamma$  in steatotic liver grafts undergoing transplantation. The key role of PPAR $\gamma$  in the vulnerability of this liver type to I/R injury associated with transplantation and the benefits of PPAR $\gamma$  antagonists under these conditions have been previously reported (21). In this study, we will also investigate whether the benefits of PPAR $\gamma$  antagonists could be explained by the regulation of toll-like receptor 4 (TLR4), a member of a highly conserved family of pattern recognition receptors. Indeed, changes in TLR4 expression induced by PPAR $\gamma$  regulators have been reported in nonsteatotic livers undergoing warm ischemia (22). TLR4 signaling is mediated by two distinct intracellular adaptor proteins: myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and TIR domain-containing-adaptor inducing IFN $\beta$  (TRIF). MyD88 and TRIF activate intracellular signaling cascades that ultimately trigger an inflammatory response (23,24). Indeed, numerous studies have reported that the TLR4 signaling pathway is responsible for the I/R damage in nonsteatotic livers under warm ischemia (25–30) and liver transplantation (31,32). In addition, a recent report indicated that disruption of TLR4 signaling ameliorated hepatic damage in steatotic livers under warm I/R (33). To date, the role of TLR4 in steatotic liver grafts under cold ischemia has not been reported.

The data presented herein indicate: ER stress is not induced when steatotic and nonsteatotic liver grafts are preserved for 6 h in UW solution; new TUDCA properties based on the modulation of PPAR $\gamma$  in steatotic liver transplantation; TLR4 signaling pathway induction by PPAR $\gamma$  antagonists and the benefits of TLR4 signaling pathway activation in steatotic liver transplantation. These results could be useful in the design of pharmacological strategies to protect steatotic livers during liver transplantation.

## Materials and Methods

### Experimental animals

**Syngeneic liver transplantation:** This study was performed using male homozygous (obese [Ob]) and heterozygous (lean [Ln]) Zucker rats aged 10 to 11 weeks.

**Allogeneic liver transplantation:** Male Sprague Dawley (SD) and Wistar (WS) rats weighing 200–222 g, were either choline-deficient or standard chow diet for 10 days, respectively (34). This strain combination (SD to WS) is fully allogenic and results in acute liver transplant rejection (35).

Ob Zucker and Ob SD rats develop moderate macrovesicular and microvesicular infiltration in hepatocytes (40–60% steatosis). All procedures were performed under isoflurane inhalation anesthesia (21,36). This study conformed to European Union regulations (Directive 86/609 EEC) for animal experiments. Animals were randomly distributed into groups as described below.

### Experimental design (summarized in Table 1)

#### Protocol 1. Syngeneic liver transplantation:

##### 1.1. Effect of TUDCA on hepatic injury in steatotic and nonsteatotic livers in syngeneic liver transplantation

Group 1. Sham. Ln and Ob Zucker animals were subjected to transverse laparotomy.

Group 2. TR. In subgroup 2.1, steatotic livers from donor rats (Ob Zucker rats) were flushed and then preserved in ice-cold UW solution for 6 h (21,36) and implanted into Ln Zucker rats, according to the Kamada cuff technique without hepatic artery reconstruction (37). In subgroup 2.2, the same surgical procedure was repeated, but with Ln Zucker rats as donor and recipients (37). The time of anhepatic phase was 17–19 minutes (38).

Group 3. TR+TUDCA. Subgroups 3.1 and 3.2: same as subgroup 2.1 and 2.2, respectively, but donor rats were treated with TUDCA (7).

##### 1.2. PPAR $\gamma$ involvement in TUDCA-induced effects on hepatic injury in steatotic livers in syngeneic liver transplantation

Group 4. TR+PPAR $\gamma$  antagonist. Same as group 2.1, but donor rats were treated with a PPAR $\gamma$  antagonist (21).

Group 5. TR+TUDCA+PPAR $\gamma$  agonist. Same as group 2.1, but donor rats were treated with TUDCA (7) and a PPAR $\gamma$  agonist (21).

##### 1.3. Modulation of the TLR4 pathway by PPAR $\gamma$ in steatotic livers in syngeneic liver transplantation

Group 6. TR+PPAR $\gamma$  antagonist+anti-TLR4. Same as group 2.1, but donor rats were treated with a PPAR $\gamma$  antagonist (21) and anti-TLR4 antibody (39).

*American Journal of Transplantation* 2012; 12: 3257–3271

## TUDCA in Steatotic Liver Transplantation

**Table 1:** Experimental groups, treatments and determinations of this study

<i>PROTOCOL 1. Syngeneic liver transplantation</i>	
Protocol 1.1. Effect of TUDCA on hepatic injury in steatotic and nonsteatotic livers in syngeneic liver transplantation	
Group 1. Sham	Dissection of hepatic ilium vessels from Ob and Ln Zucker rats
Group 2. TR	Livers preserved in UW solution and transplanted
Group 2.1 TR	Steatotic grafts from Ob Zucker rats with 6 h of cold ischemia and transplanted in recipient Ln Zucker rats.
Group 2.2 TR	Nonsteatotic grafts from Ln Zucker rats with 6 h of cold ischemia and transplanted in recipient Ln Zucker rats.
Group 3. TR+TUDCA	Same as group 2, but treated with TUDCA
Group 3.1 TR+TUDCA	Same as group 2.1, but treated with TUDCA
Group 3.2 TR+TUDCA	Same as group 2.2, but treated with TUDCA
Protocol 1.2. PPAR $\gamma$ involvement in TUDCA-induced effects on hepatic injury in steatotic livers in syngeneic liver transplantation	
Group 4. TR+PPAR $\gamma$ antagonist	Same as group 2.1, but treated with PPAR $\gamma$ antagonist
Group 5. TR+ TUDCA+PPAR $\gamma$ agonist	Same as group 2.1, but treated with TUDCA and PPAR $\gamma$ agonist
Protocol 1.3. Modulation of the TLR4 pathway by PPAR $\gamma$ in steatotic livers in syngeneic liver transplantation	
Group 6. TR+ PPAR $\gamma$ antagonist +anti-TLR4	Same as group 2.1, but treated with PPAR $\gamma$ antagonist and anti-TLR4 antibody
Group 7. TR+TLR4 agonist	Same as group 2.1, but treated with TLR4 agonist
Group 8. TR+anti-TLR4	Same as group 2.1, but treated with anti-TLR4 antibody
<i>Tests at 4 h after reperfusion.</i> Transaminases and damage score (Groups 1-8); ER stress markers, MDA, Nitrotyrosines and PPAR $\gamma$ levels (Groups 1, 2.1, 3.1); TLR4 pathway (Groups 1, 2.1, 3.1, 4, 5) and MPO, TNF, IL1 and IL6 (Groups 1, 2.1, 8).	
<i>Tests at 1, 2, 4, 12 and 18 h after reperfusion.</i> Additional groups were subjected to intervention similar to that used for groups 2.1 and 3.1. ER stress markers, PPAR $\gamma$ levels and TLR4 pathway were evaluated at the mentioned reperfusion times.	
<i>Survival tests.</i> Additional groups were subjected to intervention similar to that used for groups 2.1, 3.1, 4, 5, 6 and 7 and the survival of receptors was monitored for 14 days.	
<i>PROTOCOL 2. Allogeneic liver transplantation</i>	
Protocol 2.1. Effect of TUDCA and TLR4 on hepatic injury in steatotic and nonsteatotic livers in allogeneic liver transplantation	
Group 9. Sham	Dissection of hepatic ilium vessels from Ob SD and Ln WS rats
Group 10. TR <sub>Allograft</sub>	Livers preserved in UW solution and transplanted
Group 10.1 TR <sub>Allograft</sub>	Steatotic grafts from Ob SD rats with 6 h of cold ischemia and transplanted in recipient Ln WS rats.
Group 10.2 TR <sub>Allograft</sub>	Nonsteatotic grafts from Ln SD rats with 6 h of cold ischemia and transplanted in recipient Ln WS rats.
Group 11. TR <sub>Allograft</sub> +TUDCA	Same as group 10, but treated with TUDCA
Group 11.1 TR <sub>Allograft</sub> +TUDCA	Same as group 10.1, but treated with TUDCA
Group 11.2 TR <sub>Allograft</sub> +TUDCA	Same as group 10.2, but treated with TUDCA
Group 12. TR <sub>Allograft</sub> +TLR4 agonist	Same as group 10.1, but treated with TLR4 agonist
<i>Tests at 4 h after reperfusion.</i> Transaminases and damage score (Groups 9–12); ER stress markers, PPAR $\gamma$ levels and TLR4 pathway (Groups 9, 10.1, 11.1).	
<i>Survival tests.</i> Additional groups were subjected to intervention similar to that used for groups 10.1, 11.1 and 12 and the survival of receptors was monitored for 14 days.	
<i>Drug Administration Protocol</i>	
TUDCA	Dose and pretreatment time 100 mg/kg i.v., in donor rats 10 min before the surgical procedure
PPAR $\gamma$ antagonist (GW9662)	1 mg/kg i.p., in donor rats 1 h before the surgical procedure
PPAR $\gamma$ agonist (Rosiglitazone)	3 mg/kg i.p., in donor rats 1 h before the surgical procedure
TRL4 agonist (Nontoxic MPLA)	500 $\mu$ g/kg i.v., in donor rats 10 min before the surgical procedure
Anti-TLR4	3 mg/kg i.v., in donor rats 30 min before the surgical procedure

Abbreviations: anti-TLR4-antibody from Santa Cruz, USA; ER = endoplasmic reticulum; GW9662, 2-chloro-5-nitro-N-phenylbenzamide from Alexis Biochemical, SW; lean; MDA = malondialdehyde; MPLA = monophosphoryl lipid A from Enzo Life Sciences, SW; Ob = obese; PPAR- $\gamma$ , peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ ; Rosiglitazone, (RS)-5-[4-(2-[methyl(pyridine-2-yl)-amino]ethoxy)benzyl]thiazolidine-2,4-dione from Alexis Biochemical SW; SD = Sprague-Dawley; TLR4 = Toll-like receptor 4; TR = transplantation; TUDCA, sodium tauroursodeoxycholate from Sigma-Aldrich, MO; UW = University of Wisconsin; WS = Wistar.

Group 7. TR+TLR4 agonist. Same as group 2.1, but donor rats were treated with a TLR4 agonist (40).

Group 8. TR+anti-TLR4. Same as group 2.1, but donor rats were treated with an anti-TLR4 antibody (39).

The dose and pretreatment times for the different drugs are shown in Table 1.

Liver and plasma samples were collected from groups 1 to 8 at 4h after reperfusion. Plasma transaminases and hepatic damage score were determined in groups 1–8. Hepatic ER stress markers, MDA, nitrotyrosines and PPAR $\gamma$  levels were determined in groups 1, 2.1 and 3.1. Hepatic TLR4 pathway was determined in groups 1, 2.1, 3.1, 4 and 5. Hepatic MPO, TNF, IL-1 and IL-6 were also determined in groups 1, 2.1 and 8. A cold ischemia period of 6 h is long enough to induce damage after transplantation in both liver grafts and to allow high survival at 4h after reperfusion (21). This

**Jiménez-Castro et al.**

reperfusion times is included into the range in which maximum levels in the hepatic injury parameters have been shown. Therefore, these experimental conditions were appropriate to evaluate the underlying protective mechanisms of TUDCA in I/R injury associated with liver transplantation.

To evaluate the reperfusion time-dependent effect of TUDCA on ER stress, PPAR $\gamma$  and TLR4 pathway, animals were subjected to intervention similar to that used for groups 2.1 and 3.1 but liver samples were obtained at 1, 2, 4, 12 and 18 h after reperfusion. Hepatic ER stress parameters, PPAR $\gamma$  levels and TLR4 pathway were also determined.

For survival studies in isograft model, animals were subjected to intervention similar to that used for groups 2.1, 3.1, 4, 5, 6 and 7 and the survival of receptors was monitored for 14 days (36).

**Protocol 2. Allogeneic liver transplantation:****2.1. Effect of TUDCA and TLR4 on hepatic injury in steatotic and non-steatotic livers in allogeneic liver transplantation**

Group 9. Sham. Ob SD and Ln WS were subjected to transverse laparotomy.

Group 10. TR<sub>Allograft</sub>. In subgroup 10.1, steatotic allografts from donor rats (Ob SD rats) were flushed and then preserved in ice-cold UW solution for 6 h (21, 36) and implanted into Ln WS rats, according to the Kamada cuff technique without hepatic artery reconstruction (37). In subgroup 10.2, the same surgical procedure was repeated, but with Ln SD rats as donors and Ln WS rats as recipients (37). All recipients were treated with cyclosporine A 3 mg/kg/d (35). In line with previous results (35), no sign of rejection (evaluated according to the Banff schema; Ref. 41) were found in all groups of protocol 2. Our preliminary data indicate that all recipients that received steatotic liver allografts with 6 h of cold ischemia and without immunosuppressor died immediately within 1 h after reperfusion.

Group 11. TR<sub>Allograft</sub>+TUDCA. Subgroups 11.1 and 11.2: same as subgroups 10.1 and 10.2, respectively, but donor rats were treated with TUDCA (7).

Group 12. TR<sub>Allograft</sub>+TLR4 agonist. Same as group 10.1, but donor rats were treated with a TLR4 agonist (40).

Liver and plasma samples were collected from groups 9 to 12 at 4 h after reperfusion. Plasma transaminases and hepatic damage score were determined in groups 9-12. Hepatic ER stress markers, PPAR $\gamma$  levels and TLR4 pathway were determined in groups 9, 10.1 and 11.1.

For survival studies in allograft model, animals were subjected to intervention similar to that used for groups 10.1, 11.1 and 12 and the survival of receptors was monitored for 14 days (36).

**Biochemical determinations**

Transaminases, malondialdehyde (MDA), nitrotyrosine levels (as an index of peroxynitrite), MPO (as an index of neutrophil accumulation), TNF, IL-1 and IL-6 were measured as described elsewhere (30,42-44).

**Western blotting**

This was done as described elsewhere (7) using the following antibodies: GRP78, C/EBP homologous protein-10 (CHOP), total and phospho-PERK (p-PERK), total and phospho-eukaryotic translation initiation factor 2 subunit  $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ), activating transcription factor 4 (ATF4), ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$ , X-box binding protein 1 (sXBP-1), TLR4, MyD88 and  $\beta$ -actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and PPAR $\gamma$  and TRIF (Abcam, UK). Signals were quantified with scanning densitometry.

**Histology**

To appraise the severity of hepatic injury, hematoxylin and eosin-stained sections were evaluated by a point-counting method on an ordinal scale (36,43).

**Statistics**

Data are expressed as means  $\pm$  standard error and were compared statistically via one way analysis of variance (ANOVA), followed by post hoc Student-Newman-Keuls test. Survival was estimated with the Kaplan-Meier method and was compared with a long-rank test.  $p < 0.05$  was considered significant.

**Results****Effect of TUDCA on hepatic injury in steatotic and nonsteatotic livers in syngeneic liver transplantation**

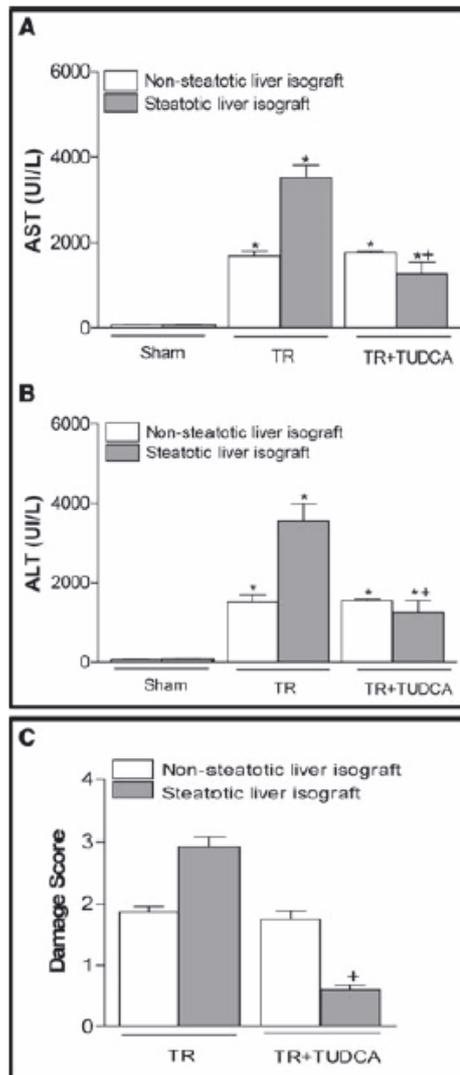
Nonsteatotic grafts were not protected against hepatic injury in the TR+TUDCA group. However, TUDCA treatment protected steatotic grafts, as the biochemical and histological parameters of hepatic injury were lower than those recorded in the TR group (Figure 1).

Next, we investigated why TUDCA protected steatotic grafts against damage. GRP78 protein levels in steatotic grafts of the TR and TR+TUDCA groups were similar to those in the sham group (Figure 2A). Given these results, we examined whether the three branches of the UPR (ATF6, IRE1 and PERK) are inactivated in steatotic grafts.

During ER stress, ATF6 is converted from a 90-kDa protein to a 50-kDa protein (p-50 ATF6 $\alpha$  or p-50 ATF6 $\beta$ ; Refs. 7,45). The protein levels of p-50 ATF6 $\alpha$  (Figure 2B) and p-50 ATF6 $\beta$  (data not shown) in steatotic grafts of the TR and TR+TUDCA groups were similar to those in the sham group. IRE1 activation results in the splicing of XBP1 mRNA for translation of XBP1(s; Refs. 7,8). XBP1(s) and TRAF2 protein levels in steatotic grafts of the TR and TR+TUDCA groups were similar to those in the sham group (Figure 2C). PERK phosphorylates eIF2 $\alpha$  in response to ER stress. The p-eIF2 $\alpha$  facilitates translation of ATF4, which induces CHOP (7,8,45). The p-PERK and p-eIF2 $\alpha$ , ATF4 accumulation and CHOP protein levels in steatotic grafts of the TR and TR+TUDCA groups were similar to those in the sham group (Figure 2D).

TR increased MDA and nitrotyrosine levels in steatotic grafts when compared with the sham group (Figure 2E), which indicated the presence of peroxynitrite, a predominant form of reactive oxygen species in steatotic grafts (36,42). In contrast to anti-oxidant properties of TUDCA under warm hepatic ischemia (7,46), the benefits of TUDCA in steatotic liver transplantation might not be explained by a reduction in oxidative stress, because TR+TUDCA group resulted in MDA and nitrotyrosine levels in steatotic grafts similar to those in the TR group (Figure 2E). In the TR group, PPAR $\gamma$  protein levels were higher in steatotic grafts than in the sham group (Figure 2F). TR+TUDCA group

## TUDCA in Steatotic Liver Transplantation



**Figure 1: Effect of TUDCA on hepatic injury in steatotic and nonsteatotic liver isografts 4 h after reperfusion.** Transaminases (A and B) and damage score (C). The severity of hepatic injury was evaluated by a point-counting method on an ordinal scale as follows: grade 0, minimal or no evidence of injury; grade 1, mild injury consisting of cytoplasmic vacuolation and focal nuclear pyknosis; grade 2, moderate to severe injury with extensive nuclear pyknosis, cytoplasmic hypereosinophilia and loss of intercellular borders; and grade 3, severe necrosis with disintegration of hepatic cords, hemorrhage and neutrophil infiltration. For all parts of the figure, 6 transplantations with nonsteatotic liver isografts and 6 transplantations with steatotic livers isografts for each group were included in each measurement. \* $p < 0.05$  versus Sham, + $p < 0.05$  versus TR.

reduced PPAR $\gamma$  protein levels in steatotic grafts with respect to those recorded in the TR group.

**PPAR $\gamma$  Involvement in TUDCA-induced effects on hepatic injury in steatotic livers in syngeneic liver transplantation**

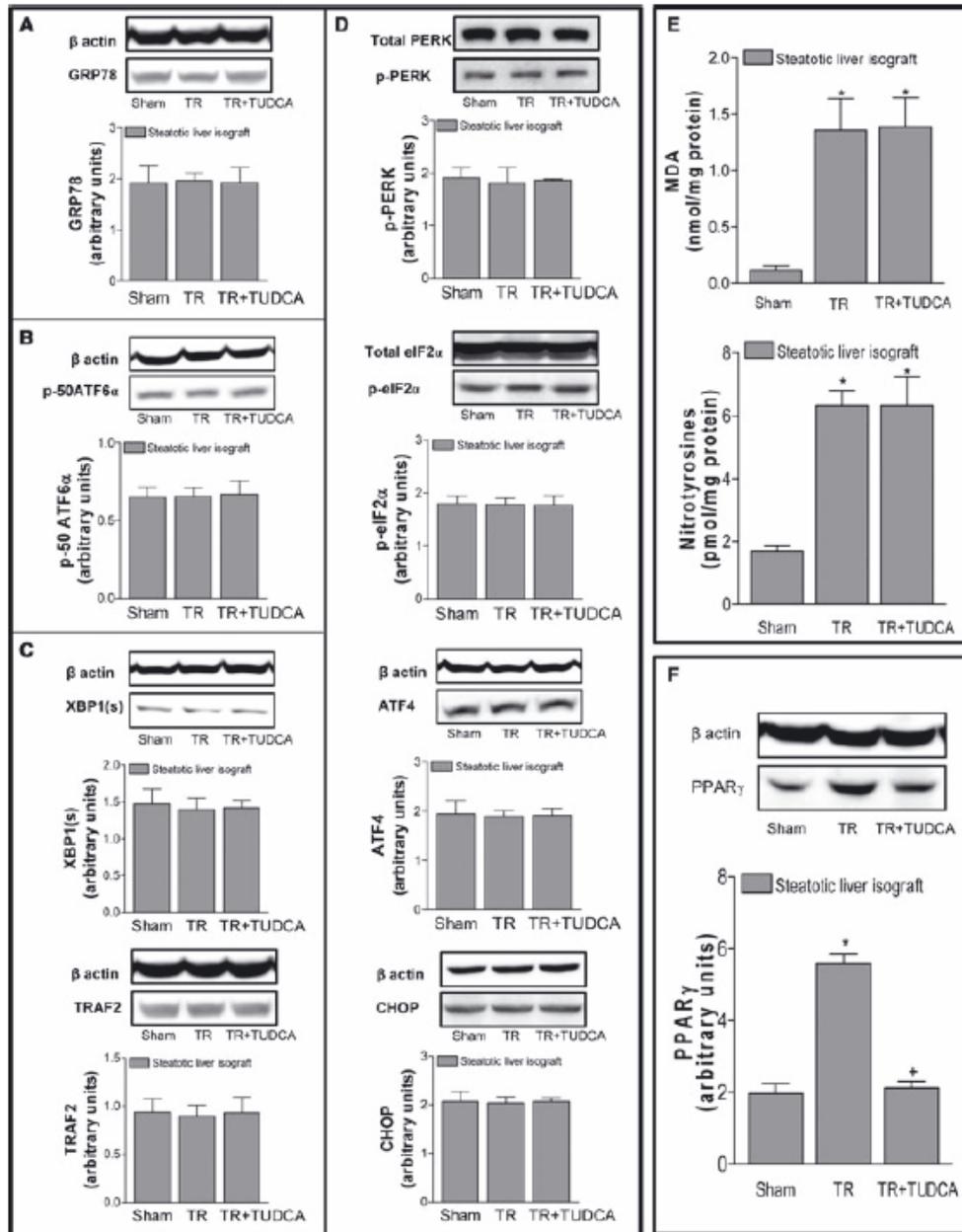
TR+PPAR $\gamma$  antagonist group resulted in lower hepatic injury parameters in steatotic grafts than in the TR group (Figures 3A–D). TR+TUDCA+PPAR $\gamma$  agonist group abolished the benefits of TUDCA, resulting in transaminase (Figures 3A and B) and damage score values (Figure 3C) in steatotic grafts similar to those in the TR group. This indicated that when PPAR $\gamma$  was activated, TUDCA did not protect steatotic grafts against damage. Steatotic grafts of the TR group showed extensive and confluent areas of coagulative necrosis with neutrophil infiltration that were reduced in number and extension in the TR+TUDCA group (Figure 3D). The hepatic lesions observed in TR+TUDCA+PPAR $\gamma$  agonist and TR+PPAR $\gamma$  antagonist groups were similar to those in the TR and TR+TUDCA groups, respectively (Figure 3D).

**Modulation of the TLR4 pathway by PPAR $\gamma$  in steatotic livers in syngeneic liver transplantation**

As mentioned before, TUDCA treatment reduced PPAR $\gamma$ , and therefore ameliorated damage in steatotic grafts. We next evaluated whether TUDCA-induced PPAR $\gamma$  inhibition affected the TLR4 pathway in steatotic grafts. In the TR group, TLR4 protein levels were lower in steatotic grafts than in the sham group (Figure 3E). In the TR+TUDCA and TR+PPAR $\gamma$  antagonist groups, TLR4 protein levels were higher in steatotic grafts than in the TR group. TR+TUDCA+PPAR $\gamma$  agonist group abolished the effects of TUDCA on TLR4, because it resulted in TLR4 protein levels in steatotic grafts similar to those in the TR group (Figure 3E). Thus, TUDCA treatment reduced PPAR $\gamma$  and this PPAR $\gamma$  inhibition was associated with higher TLR4 levels than those observed in the TR group. Protein levels of MyD88 were unchanged in all groups (Figure 3F). However, a pattern similar to that observed for TLR4 protein levels were observed for TRIF protein levels in the groups evaluated (Figure 3G).

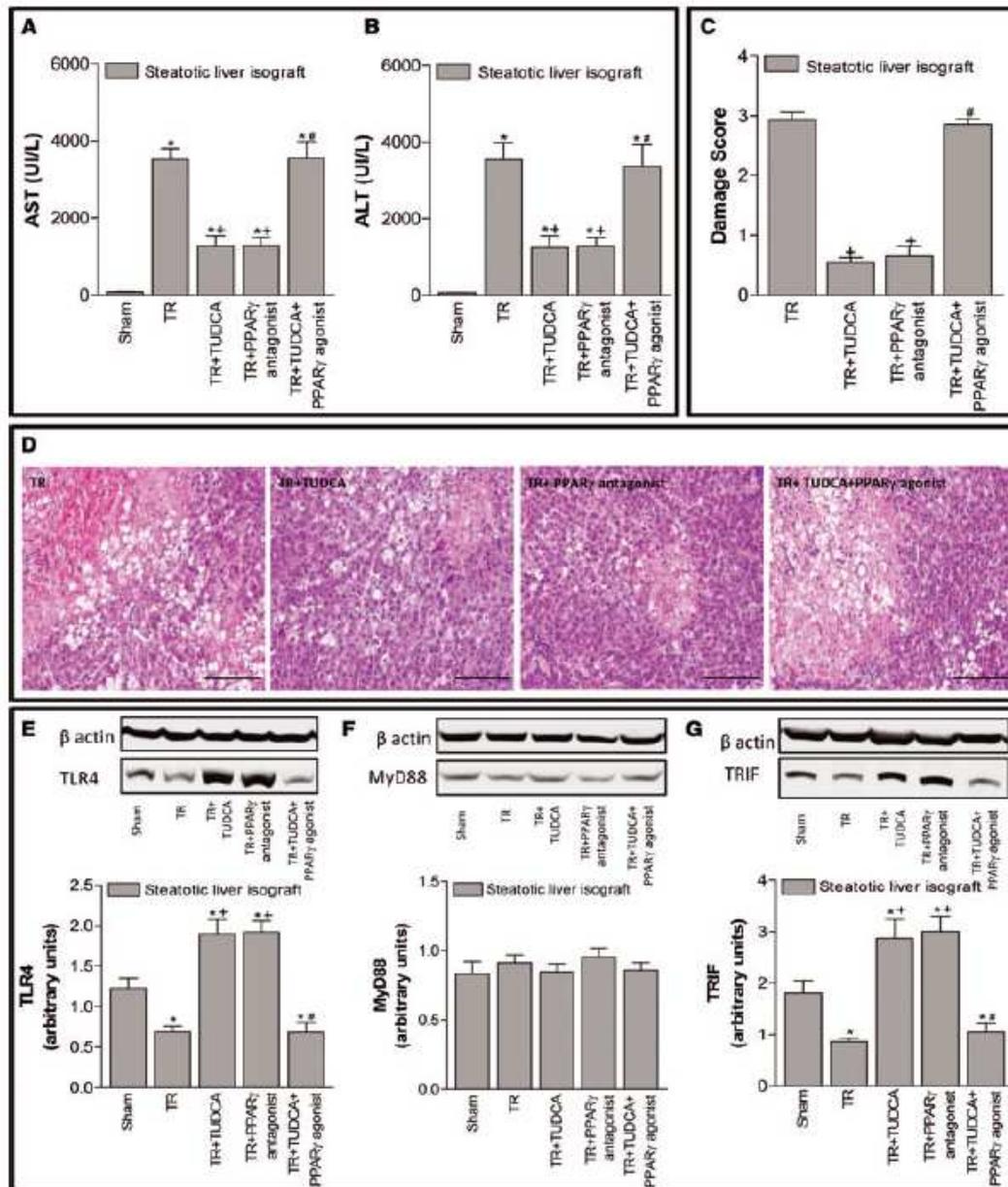
Next, we conducted experiments to evaluate whether TLR4 up-regulation consequent to PPAR $\gamma$  inhibition protected steatotic liver grafts. TR+PPAR $\gamma$  antagonist group, which increased TLR4, protected steatotic grafts (Figures 4A–C). In contrast, TR+PPAR $\gamma$  antagonist+anti-TLR4 group resulted in hepatic injury parameters similar to those in the TR group. Thus, TLR4 action inhibition abolished the benefits of PPAR $\gamma$  antagonists in steatotic liver grafts. We then activated TLR4 by administering a TLR4 agonist in the TR group (TR+TLR4 agonist group). Under these conditions steatotic liver grafts were protected (Figures 4A–C). The hepatic lesions observed in the TR+PPAR $\gamma$  antagonist+anti-TLR4 groups (Figure 4C) were similar to those in the TR group (Figure 3D). In the

Jiménez-Castro et al.



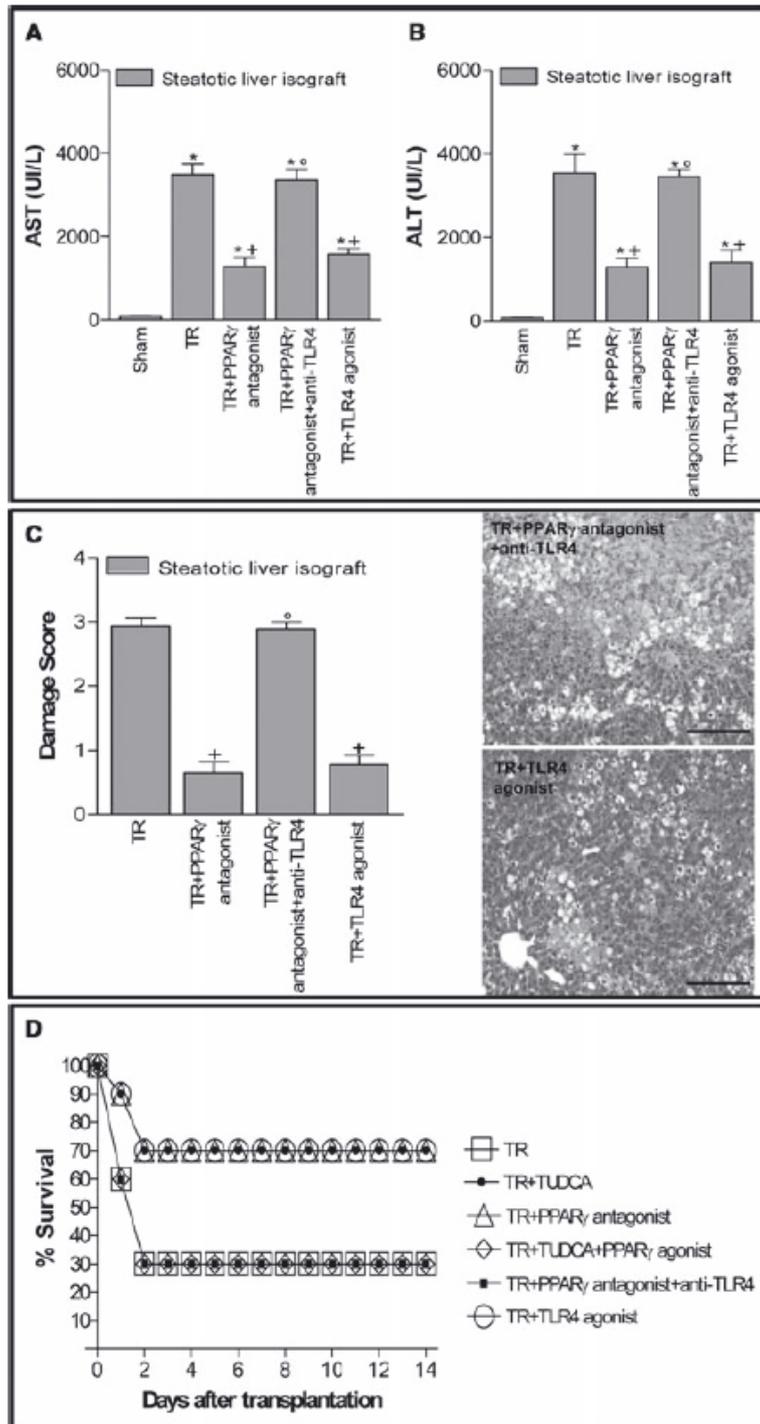
**Figure 2: Effect of TUDCA on UPR induction, oxidative stress and PPAR $\gamma$  protein expression in steatotic liver isografts 4 h after reperfusion.** (A) Protein levels of GRP78, (B) p-50 ATF6 $\alpha$ , (C) XBP1(s) and TRAF2, (D) p-PERK, p-eIF2 $\alpha$ , ATF4 and CHOP, (E) MDA and nitrotyrosine levels and (F) PPAR $\gamma$  protein expression. Representative western blots at the top and densitometric analysis at the bottom. The scanning values for GRP78, ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$ , XBP1(s), TRAF2, ATF4, CHOP and PPAR $\gamma$  were divided by the scanning values for  $\beta$ -actin, and those of p-PERK and p-eIF2 $\alpha$  by the total PERK and eIF2 $\alpha$ , respectively. For all parts of the figure, six transplantations with steatotic liver isografts for each group were included in each measurement. For UPR induction: TR < versus Sham ( $p = NS$ ), TR+TUDCA < versus TR ( $p = NS$ ), TR+TUDCA < versus Sham ( $p = NS$ ). For MDA and PPAR $\gamma$ , \* $p < 0.05$  versus Sham, + $p < 0.05$  versus TR.

TUDCA in Steatotic Liver Transplantation



**Figure 3: PPAR $\gamma$  involvement in TUDCA-induced effects on hepatic injury and TLR4 pathway in steatotic liver isografts 4 h after reperfusion.** Transaminases (A and B) and damage score (C) as described in Figure 1 legend. Representative changes in steatotic livers are shown in Figure 3D. (TR), widespread coagulative hepatic necrosis. (TR+TUDCA), small area of coagulative hepatic necrosis. (TR+PPAR $\gamma$  antagonist), hepatic lesions similar to the TR+TUDCA group. (TR+TUDCA+PPAR $\gamma$  agonist), hepatic lesions similar to the TR group (Bars, 1000  $\mu$ m). TLR4, MyD88 and TRIF are shown in parts (E), (F) and (G), respectively. Representative western blots at the top and densitometric analysis at the bottom. The scanning values for TLR4, MyD88 and TRIF were divided by the scanning values for  $\beta$ -actin. For all parts of the figure, six transplantations with steatotic liver isografts for each group were included in each measurement. \* $p < 0.05$  versus Sham, + $p < 0.05$  versus TR, \*\* $p < 0.05$  versus TR+TUDCA.

Jiménez-Castro et al.



**Figure 4: Effect of TLR4 regulation on damage in steatotic liver isografts 4 h after reperfusion and survival of recipients transplanted with steatotic liver isografts at 14 days after transplantation.** Transaminases (A and B) and damage score (C) as described in Figure 1 legend. Representative photographs of histological changes in steatotic livers are shown in part (C). (TR+PPAR $\gamma$  antagonist+anti-TLR4), widespread coagulative hepatic necrosis with neutrophil infiltration. (TR+TLR4 agonist), small area of coagulative hepatic necrosis (Bars, 1000  $\mu$ m). For all parts of the figure, 6 transplantations with steatotic livers for each group were included in each measurement. \* $p < 0.05$  versus Sham,  $^{\dagger}p < 0.05$  versus TR,  $^{\ddagger}p < 0.05$  versus TR+PPAR $\gamma$  antagonist. Survival studies are shown in part (D). 10 transplantations with steatotic liver isografts for each group. TR ( $\square$ ), TR+TUDCA ( $\bullet$ ), TR+PPAR $\gamma$  antagonist ( $\Delta$ ), TR+TUDCA+PPAR $\gamma$  agonist ( $\diamond$ ), TR+PPAR $\gamma$  antagonist+anti-TLR4 ( $\blacksquare$ ), TR+TLR4 agonist ( $\circ$ ).

## TUDCA in Steatotic Liver Transplantation

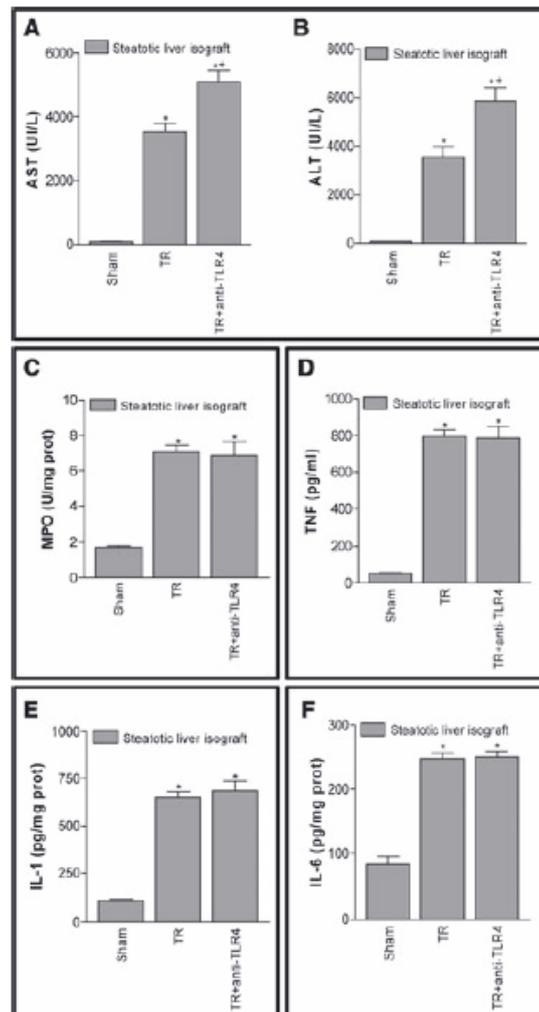
TR+TLR4 agonist group (Figure 4C), the extent and the number of necrotic areas in steatotic liver grafts was less than the TR group (Figure 3D). The recipients transplanted with steatotic grafts without any treatment (TR group) showed 30% survival at 14 days, most of the deaths occurring within 2 days (Figure 4D). The treatment with TUDCA, PPAR $\gamma$  antagonist and TLR4 agonist reduced lethality in recipients transplanted with steatotic grafts, and resulted in a 70% survival rate at 14 days (Figure 4D). The survival rates in TR+TUDCA+PPAR $\gamma$  agonist and TR+PPAR $\gamma$  antagonist+anti-TLR4 groups were similar to those of the TR group.

TLR4 blockade reduced hepatic injury, neutrophil accumulation and TNF $\alpha$ , IL-1 and IL-6 release from Kupffer cells in nonsteatotic livers undergoing I/R (27,30). Then, we evaluated the effects of TLR4 inhibition on hepatic damage, inflammatory cell infiltration and proinflammatory cytokine levels in steatotic grafts. In line with previous studies (44,47,48), the results presented herein indicate that hepatic damage in steatotic livers does not correspond to either the degree of inflammatory cell infiltration or proinflammatory cytokines. Indeed, TR+anti-TLR4 group resulted in hepatic injury parameters higher than those of the TR group (Figures 5A and B). However, hepatic MPO, TNF, IL-1 and IL-6 levels observed in TR+anti-TLR4 group were similar to those in the TR group (Figures 5C–F).

The reperfusion time dependent effects of TUDCA on ER stress markers, PPAR $\gamma$  levels and TLR4 pathway in steatotic livers were measured throughout reperfusion (Figure 6). ER stress parameters were similar in Sham, TR and TR+TUDCA groups at each time (Figures 6A–D). PPAR $\gamma$  levels were lower in TR+TUDCA than in TR group at each time (Figure 6E). TLR4 and TRIF (but not MyD88) levels were higher in TR+TUDCA than in TR group at each time (Figures 6F–H).

#### Effect of TUDCA and TLR4 on hepatic injury in steatotic and nonsteatotic livers in allogeneic liver transplantation

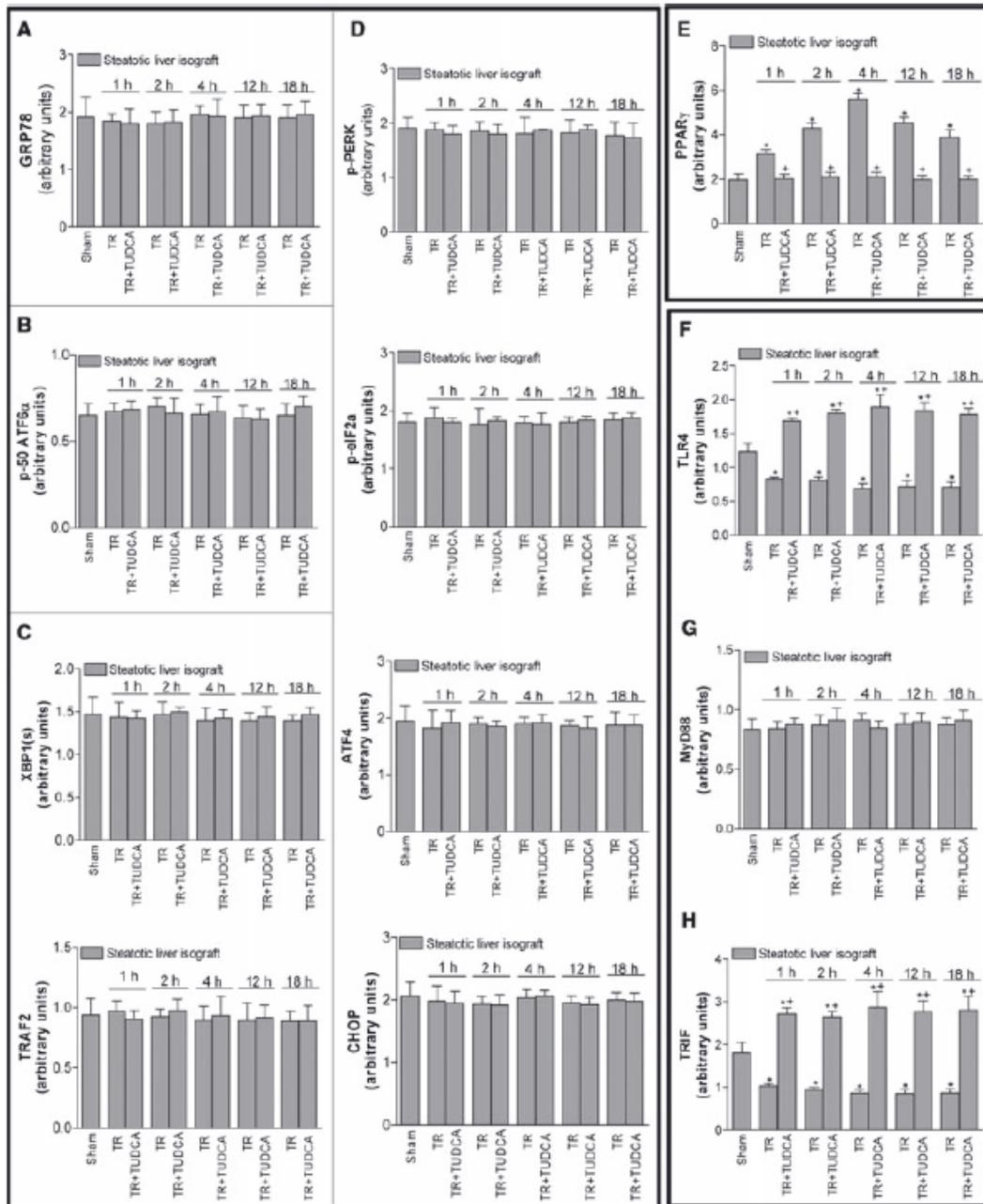
As described below, the effects of TUDCA and TLR4 on hepatic injury, ER stress parameters, oxidative stress, PPAR $\gamma$  levels and TLR4 pathway in allograft model followed a similar pattern to those described in isograft model. Thus, nonsteatotic allografts were not protected against hepatic injury in the TR<sub>Allograft</sub>+TUDCA group. However, TR<sub>Allograft</sub>+TUDCA group protected steatotic allografts, as the hepatic injury parameters were lower than those recorded in the TR group (Figure 7). GRP78 and the three branches of the UPR are inactivated in steatotic allografts. The protein levels of p-50 ATF6 $\beta$  (data not shown), GRP78, p-50 ATF6 $\alpha$ , XBP-1(S), TRF2, p-PERK, p-eIF2 $\alpha$ , ATF4 accumulation and CHOP (Figures 8A–D) in steatotic allografts of the TR<sub>Allograft</sub> and TR<sub>Allograft</sub>+TUDCA groups were similar to those found in the Sham group. As shown in Figure 8E, TR<sub>Allograft</sub>+TUDCA group resulted in MDA



**Figure 5: Effect of TLR4 inhibition on inflammatory cell infiltration and proinflammatory cytokine levels in steatotic liver isografts 4 h after reperfusion.** (A and B) Transaminase levels and (C) MPO, (D) TNF, (E) IL-1 and (F) IL-6. For all parts of the figure, six transplantations with steatotic livers for each group were included in each measurement. \* $p < 0.05$  versus Sham, \*\* $p < 0.05$  versus TR.

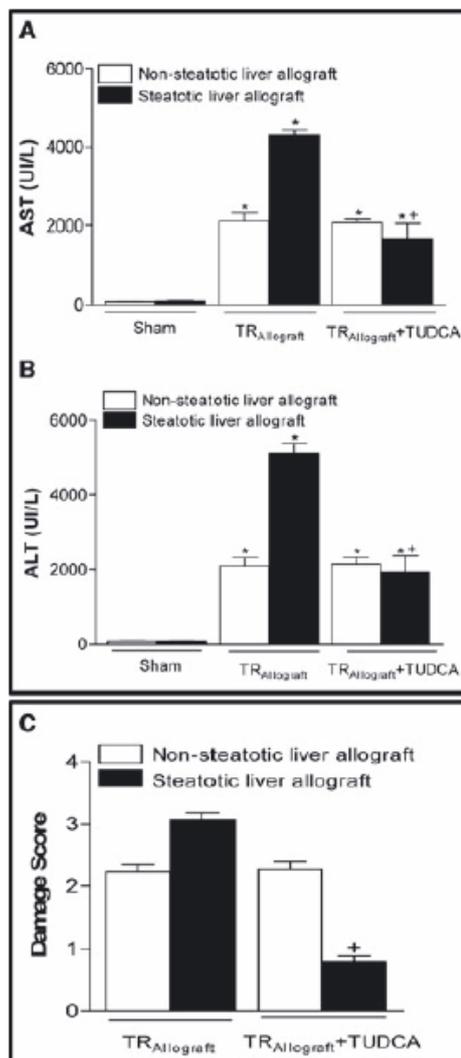
and nitrotyrosine levels in steatotic allografts similar to those in the TR<sub>Allograft</sub> group. TR<sub>Allograft</sub>+TUDCA group reduced PPAR $\gamma$  protein levels in steatotic allografts with respect to those in the TR<sub>Allograft</sub> group (Figure 8F). TLR4 and TRIF protein levels were lower in steatotic allografts of TR<sub>Allograft</sub> group than in the sham group (Figures 9A–C). In the TR<sub>Allograft</sub>+TUDCA group, TLR4 and TRIF protein levels were higher in steatotic allografts than in the TR<sub>Allograft</sub> group (Figures 9A and C). The protein levels of MyD88

Jiménez-Castro et al.



**Figure 6: Reperfusion time dependent effect of TUDCA in steatotic liver isografts on UPR induction, PPAR $\gamma$  protein expression and TLR4 pathway.** (A) Protein levels of GRP78, (B) p-50 ATF6 $\alpha$ , (C) XBP1(s) and TRAF2, (D) p-PERK, p-eIF2 $\alpha$ , ATF4 and CHOP, (E) PPAR $\gamma$ , (F) TLR4, (G) MyD88 and (H) TRIF in steatotic livers at 1, 2, 4, 12 and 18 h after reperfusion. The scanning values for GRP78, ATF6 $\alpha$ , XBP1(s), TRAF2, ATF4, CHOP, PPAR $\gamma$ , TLR4, MyD88 and TRIF were divided by the scanning values for  $\beta$ -actin, and those of p-PERK and p-eIF2 $\alpha$  by the total PERK and eIF2 $\alpha$ , respectively. For all parts of the figure, 6 transplantations with steatotic livers for each group were included in each measurement. \*p < 0.05 versus Sham, +p < 0.05 versus TR.

## TUDCA in Steatotic Liver Transplantation



**Figure 7: Effect of TUDCA on hepatic injury in steatotic liver allografts 4 h after reperfusion.** (A and B) Transaminases and (C) damage score. The severity of hepatic injury was evaluated by a point-counting method on an ordinal scale as described in Figure 1 legend. For all parts of the figure, six transplantations with steatotic livers grafts for each group were included in each measurement. \* $p < 0.05$  versus Sham, + $p < 0.05$  versus TR<sub>Allograft</sub>.

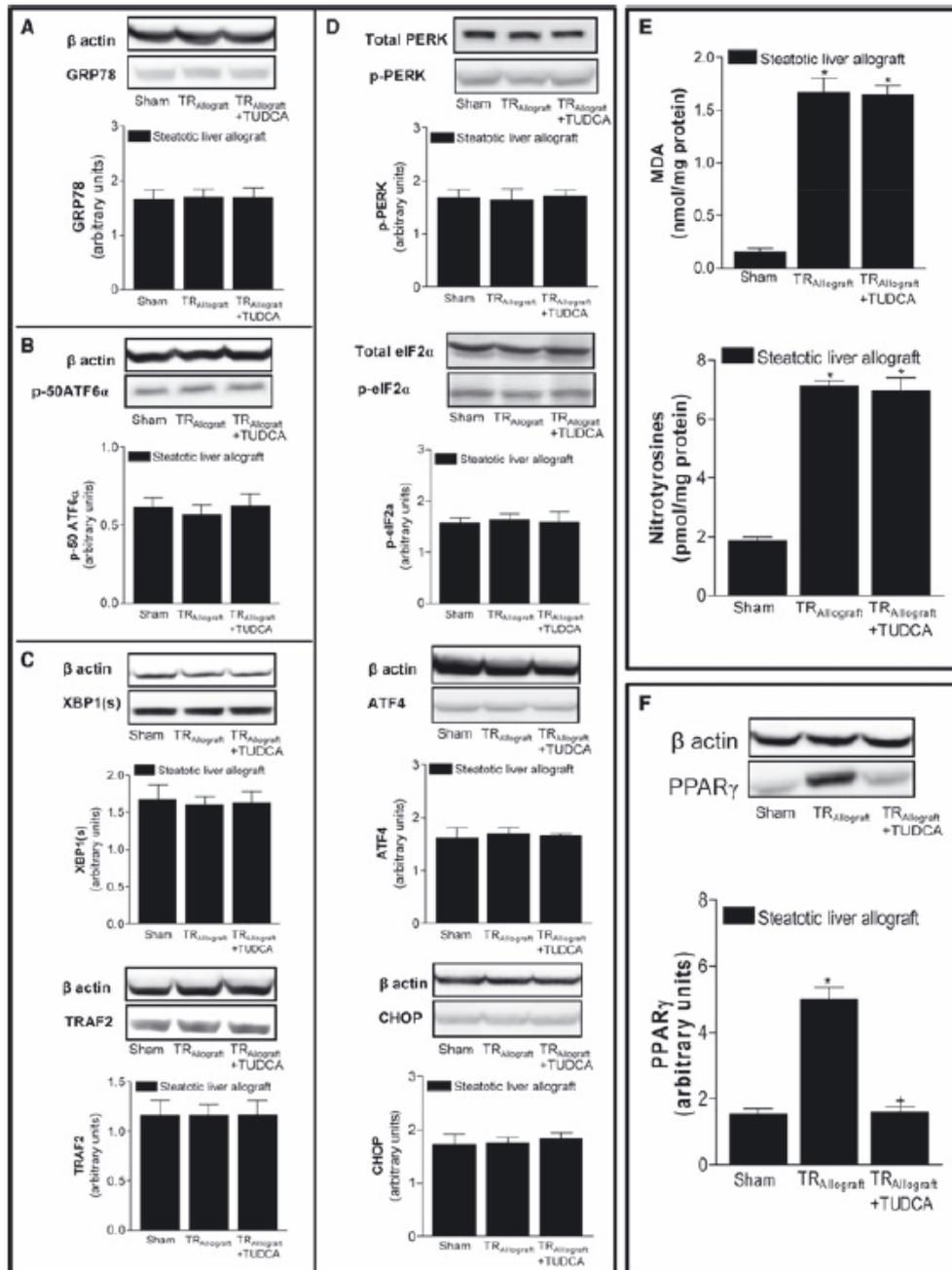
were unchanged in all groups (Figure 9B). Recipients transplanted with steatotic allografts without any treatment (TR<sub>Allograft</sub> group) showed 30% survival at 14 days, most of the deaths occurring within 2 days (Figure 9D). The treatment with TUDCA and TLR4 agonist reduced lethality in recipients transplanted with steatotic grafts, and resulted in a 70% survival rate at 14 days (Figure 9D).

## Discussion

Data obtained herein suggest that TUDCA may play a beneficial role in the protection of steatotic grafts in experimental models of syngeneic and allogeneic steatotic liver transplantation. In our conditions, ER stress is not induced in steatotic and nonsteatotic liver grafts and TUDCA was only effective in steatotic grafts, through a mechanism independent of ER stress. Thus, targeting the ER with TUDCA may not be a useful therapeutic approach in clinical conditions in which steatotic liver grafts are preserved in UW solution for 6 h of cold ischemia.

In the same conditions evaluated herein, PPAR $\gamma$  worsened hepatic injury in steatotic livers (21). Here, we report that TUDCA reduced PPAR $\gamma$  over-expression in both steatotic liver isografts and allografts. We evaluated whether TUDCA-induced PPAR $\gamma$  inhibition affected the TLR4 pathway in steatotic grafts. The inhibition of PPAR $\gamma$  action with PPAR $\gamma$  antagonists increased TLR4 and TRIF in steatotic liver grafts. This protected them against the damage associated with transplantation. Moreover, the activation of PPAR $\gamma$  abolished the benefits of TUDCA on the TLR4 pathway and damage in steatotic grafts. Thus, we suggest a new mechanism, namely TLR4 pathway induction, to explain why TUDCA-induced PPAR $\gamma$  inhibition protects steatotic liver grafts. Our results in isograft and allograft model indicate that in steatotic liver transplantation, the reduction in TLR4 protein expression was associated with reduced TRIF protein expression, whereas no changes in MyD88 expression were observed. This suggests that TRIF (but not MyD88) is the branch of downstream signaling pathways of TLR4 in steatotic liver transplantation. Further studies (beyond the scope of this work) will be required to answer why TLR4 pathway is down-regulated in steatotic liver transplantation compared with steatotic liver without a surgical procedure (sham group). Several molecules that play key roles in the down-regulation of TLR4 signaling, such as suppressor or cytokine signaling (SOCS)-1, SOCS-3 and interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK)-M (49–52), should be explored as possible answers to this question. Here, we report by first time evidence of the beneficial effects of strategies to up-regulate TLR4 in steatotic liver isografts and allografts. TLR4 agonists and TUDCA (which increased TLR4) were administered only in donors, before cold ischemia period. Our results would be in line with previous studies in normothermic hepatic ischemia indicating that the induction of chemical preconditioning using TLR4 ligands protects the liver against the deleterious effects of a subsequent I/R (52). This study does not analyze why TLR4 signaling protect steatotic liver grafts against damage associated with transplantation. To answer this question, previous results obtained in isolated cells should be considered (49). These suggest that increased TLR4 signaling triggers beneficial responses; namely the induction of protective Type I IFNs in hepatocytes and antiinflammatory IL-10 in macrophages in an IRF3-dependent manner.

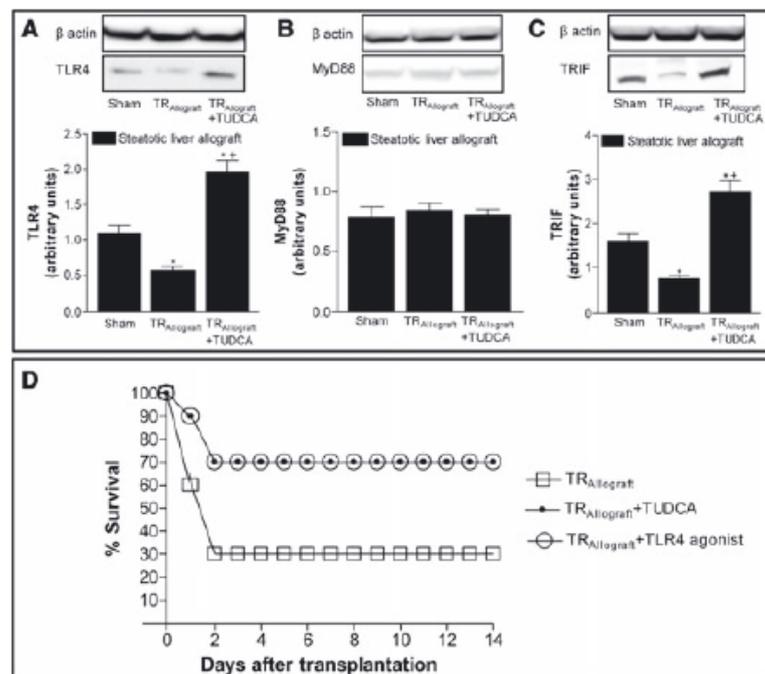
Jiménez-Castro et al.



**Figure 8: Effect of TUDCA on UPR induction, oxidative stress and PPAR<sub>γ</sub> protein expression in steatotic liver allografts 4 h after reperfusion.** (A) Protein levels of GRP78, (B) p-50 ATF6 $\alpha$ , (C) XBP1(s) and TRAF2, (D) p-PERK, p-eIF2 $\alpha$ , ATF4 and CHOP, (E) MDA and nitrotyrosine levels and (F) PPAR $\gamma$ . Representative western blots at the top and densitometric analysis at the bottom. The scanning values for GRP78, ATF6 $\alpha$ , ATF6 $\beta$ , XBP1(s), TRAF2, ATF4, CHOP and PPAR $\gamma$  were divided by the scanning values for  $\beta$ -actin, and those of p-PERK and p-eIF2 $\alpha$  by the total PERK and eIF2 $\alpha$ , respectively. For all parts of the figure, six transplantations with steatotic livers for each group were included in each measurement. For UPR induction, TR<sub>Allograft</sub> < versus Sham ( $p = NS$ ), TR+TUDCA < versus TR<sub>Allograft</sub> ( $p = NS$ ), TR<sub>Allograft</sub>+TUDCA < versus Sham ( $p = NS$ ). For MDA and PPAR $\gamma$ , \* $p < 0.05$  versus Sham, + $p < 0.05$  versus TR.

## TUDCA in Steatotic Liver Transplantation

**Figure 9: Effect of TUDCA on TLR4 pathway in steatotic liver allografts 4 h after reperfusion and survival of recipients transplanted with steatotic liver allografts at 14 days after transplantation.** (A) TLR4, (B) MyD88 and (C) TRIF. Representative western blots at the top and densitometric analysis at the bottom. The scanning values for TLR4, MyD88 and TRIF were divided by the scanning values for  $\beta$ -actin. For all parts of the figure, six transplantations with steatotic livers for each group were included in each measurement. \* $p < 0.05$  versus Sham, + $p < 0.05$  versus TR<sub>Allograft</sub>. Survival studies are shown in part (D). Ten transplantations with steatotic livers for each group. TR<sub>Allograft</sub> (□), TR<sub>Allograft</sub>+TUDCA (●), TR<sub>Allograft</sub>+TLR4 agonist (○).



Strategies based on TLR4 signaling pathway regulation could improve the postoperative outcome of patients undergoing hepatic resections and increase the number of organs suitable for transplantation. These strategies may improve the outcome of patients receiving marginal grafts that would not otherwise have been transplanted, leading to new possibilities for clinical transplantation. However, before a successful therapeutic strategy based on the TLR4 signaling pathway regulation is defined, several additional points need to be addressed. The effects of TLR4 differ according to the surgical conditions. Therefore, it seems plausible that in contrast to approaches that would completely abrogate TLR4 signaling, as in warm ischemic conditions, we could activate the TLR4 pathway to protect steatotic liver grafts against damage associated with transplantation. Moreover, the response of TLR4 might vary and involve different signal transduction pathways depending on the surgical procedure. These pathways are poorly understood at present.

To sum up, TUDCA protected steatotic liver grafts preserved in UW solution for 6 h, though a mechanism independent of ER stress. Our results report new properties of TUDCA in steatotic liver transplantation, based on a relationship between TUDCA, PPAR $\gamma$  and TLR4. We also describe the role of the TLR4 pathway in steatotic liver transplantation. TUDCA reduced PPAR $\gamma$  and this up-regulated the TLR4 pathway, specifically the TRIF pathway, protecting steatotic liver grafts. The results point to new possibilities for therapeutic interventions based on TLR4 signaling

activation to protect steatotic liver grafts against damage associated with transplantation.

### Acknowledgments

This research was supported by the *Ministerio de Ciencia e Innovación* (project grant BFU2009-07410) Madrid, Spain. Jiménez-Castro M.B. is in receipt of a fellowship from the *Sociedad Española de Transplante Hepático* (SETH Foundation; Barcelona, Spain). We are grateful to Michael Maudsley at the Language Advisory Service of the University of Barcelona for revising the English text.

### Disclosure

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

### References

- Casillas-Ramírez A, Mosbah IB, Ramalho F, Roselló-Catafau J, Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci* 2006; 79: 1881–1894.
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 523–534.
- Nocito A, El-Badry AM, Clavien PA. When is steatosis too much for transplantation?. *J Hepatol* 2006; 45: 494–499.
- Elias-Miro M, Massip-Salcedo M, Jiménez-Castro MB, Peralta C. Does adiponectin benefit steatotic liver transplantation? *Liver Transpl* 2011; 17: 993–1004.

## Jiménez-Castro et al.

5. Degli Esposti D, Sebah M, Pham P, et al. Ischemic preconditioning induces autophagy and limits necrosis in human recipients of fatty liver grafts, decreasing the incidence of rejection episodes. *Cell Death Dis* 2011; 2: e111: doi:10.1038/cddis.2010.89.
6. Anderson CD, Upadhyay G, Conzen KD, et al. Endoplasmic reticulum stress is a mediator of posttransplant injury in severely steatotic liver allografts. *Liver Transpl* 2011; 17: 189–200.
7. Ben Mosbah I, Alfany-Fernández I, Martel C, et al. Endoplasmic reticulum stress inhibition protects steatotic and non-steatotic livers in partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. *Cell Death Dis* 2010; 1: 1–12e52.
8. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; 115: 2656–2664.
9. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006; 313: 1137–1140.
10. Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC, et al. Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. *Hepatology* 2002; 36: 592–601.
11. Setchell KD, Rodrigues CM, Podda M, Crosignani A. Metabolism of orally administered tauroursodeoxycholic acid in patients with primary biliary cirrhosis. *Gut* 1996; 38: 439–446.
12. Invernizzi P, Setchell KD, Crosignani A, et al. Differences in the metabolism and disposition of ursodeoxycholic acid and of its taurine-conjugated species in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999; 29: 320–327.
13. Rost D, Rudolph G, Kloeters-Plachky P, Stiehl A. Effect of high-dose ursodeoxycholic acid on its biliary enrichment in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2004; 40: 692–698.
14. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 1261–1273.
15. Baiocchi L, Tisone G, Russo MA, et al. TUDCA prevents cholestasis and canalicular damage induced by ischemia-reperfusion injury in the rat, modulating PKC $\alpha$ -ezrin pathway. *Transpl Int* 2008; 21: 792–800.
16. Yersiz H, Shaked A, Olthoff K, et al. Correlation between donor age and the pattern of liver graft recovery after transplantation. *Transplantation* 1995; 60: 790–794.
17. Adam R, Cailliez V, Majno P, et al. Normalised intrinsic mortality risk in liver transplantation: European Liver Transplant Registry study. *Lancet* 2000; 356: 621–627.
18. Villa R, Fondevila C, Erill I, et al. Real-time direct measurement of human liver allograft temperature from recovery to transplantation. *Transplantation* 2006; 81: 483–486.
19. Durand F, Renz JF, Alkofer B, et al. Report of the Paris consensus meeting on expanded criteria donors in liver transplantation. *Liver Transpl* 2008; 14: 1694–1707.
20. Nonaka M, Tazuma S, Hyogo H, Kanno K, Chayama K. Cytoprotective effect of tauroursodeoxycholate on hepatocyte apoptosis induced by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23(7 Pt 2): e198–206.
21. Casillas-Ramírez A, Alfany-Fernández I, Massip-Salcedo M, et al. Retinol-binding protein 4 and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in steatotic liver transplantation. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 338: 143–153.
22. Zhai D, Zhang J, Zheng Q, Li Z, Zhang J, Tian Y. Significance of rosiglitazone inhibiting TLR4 expression in partial hepatic ischemia/reperfusion of mice. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2008; 28: 564–567.
23. Soares JB, Pimentel-Nunes P, Roncon-Albuquerque R, Leite-Moreira A. The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. *Hepatol Int* 2010; 4: 659–672.
24. Gao B, Seki E, Brenner DA, et al. Innate immunity in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G516–525.
25. Tsung A, Hoffman RA, Izuishi K, et al. Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in non-parenchymal cells. *J Immunol* 2005; 175: 7661–7668.
26. Zhai Y, Shen XD, O'Connell R, et al. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol* 2004; 173: 7115–7119.
27. Shen XD, Ke B, Zhai Y, et al. Toll-like receptor and heme oxygenase-1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant* 2005; 5: 1793–1800.
28. Zhai Y, Qiao B, Shen XD, et al. Evidence for the pivotal role of endogenous toll-like receptor 4 ligands in liver ischemia and reperfusion injury. *Transplantation* 2008; 85: 1016–1022.
29. Ellett JD, Atkinson C, Evans ZP, et al. Toll-like receptor 4 knockout mice are protected from endothelial overactivation in the absence of Kupffer cells after total hepatic ischemia/reperfusion. *Liver Transpl* 2011; 17: 1089–1098.
30. Jiang N, Zhang X, Zheng X, et al. Targeted gene silencing of TLR4 using liposomal nanoparticles for preventing liver ischemia reperfusion injury. *Am J Transplant* 2011; 11: 1835–1844.
31. Shen XD, Ke B, Zhai Y, et al. Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in the donor organ reduces ischemia and reperfusion injury in a murine liver transplantation model. *Liver Transpl* 2007; 13: 1435–1443.
32. Shen XD, Ke B, Uchida Y, et al. Native macrophages genetically modified to express heme oxygenase 1 protect rat liver transplants from ischemia/reperfusion injury. *Liver Transpl* 2011; 17: 201–210.
33. Ellett JD, Evans ZP, Atkinson C, Schmidt MG, Schnellmann RG, Chavin KD. Toll-like receptor 4 is a key mediator of murine steatotic liver warm ischemia/reperfusion injury. *Liver Transpl* 2009; 15: 1101–1109.
34. Caraceni P, Domenicali M, Vendemiale G, et al. The reduced tolerance of rat fatty liver to ischemia reperfusion is associated with mitochondrial oxidative injury. *J Surg Res* 2005; 124: 160–168.
35. Zhang A, Wang Y, Xie H, Zheng S. Calcitriol inhibits hepatocyte apoptosis in rat allograft by regulating apoptosis-associated genes. *International Immunopharmacology* 2007; 7: 1122–1128.
36. Jiménez-Castro MB, Casillas-Ramírez A, Massip-Salcedo M, et al. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in rat steatotic liver transplantation. *Liver Transpl* 2011; 17: 1099–1110.
37. Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 1979; 28: 47–50.
38. Fernández L, Heredia N, Grande L, et al. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: Role of Xanthine/Xanthine oxidase. *Hepatology* 2002; 36: 562–572.
39. Miao HL, Qiu ZD, Hao FL, et al. Significance of MD-2 and MD-2B expression in rat liver during acute cholangitis. *World J Hepatol* 2010; 2: 233–238.
40. Yang CH, Zhang MS, Li J, Zhang XP, Wang H, Hao YB. Monophosphoryl lipid A-induced delayed preconditioning in rat small intestine is mediated by calcitonin gene-related peptide. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 1333–1341.
41. An International panel. Banff schema for grading liver allograft rejection: An international consensus document. *Hepatology* 1997; 25: 658–633.
42. Carrasco-Chaumeil E, Roselló-Catafau J, Bartrons R, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase and nitric oxide in rat steatotic liver transplantation. *J Hepatol* 2005; 43: 997–1006.
43. Serafin A, Roselló-Catafau J, Prats N, Gelpí E, Rodés J, Peralta C. Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers

- of rats undergoing ischemia/reperfusion. *Hepatology* 2004; 39: 688–698.
44. Fernández L, Carrasco-Chaumel E, Serafín A, et al. Is ischemic preconditioning a useful strategy in steatotic liver Transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 888–899.
45. Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 2004; 11: 372–380.
46. Oveson BC, Iwase T, Hackett SF, et al. Constituents of bile, bilirubin and TUDCA, protect against oxidative stress-induced retinal degeneration. *J Neurochem* 2011; 116: 144–153.
47. Serafín A, Roselló-Catafau J, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Peralta C. Ischemic preconditioning increases the tolerance of fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am J Transplant* 2002; 161: 587–601.
48. Yamada S, Ida T, Tabata T, et al. Alcoholic fatty liver differentially induces a neutrophil-chemokine and hepatic necrosis after ischemia-reperfusion in rat. *Hepatology* 2000; 32: 278–288.
49. Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002; 110: 191–202.
50. Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* 2002; 17: 677–687.
51. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 454–465.
52. Sano T, Izuishi K, Hossain MA, et al. Hepatic preconditioning using lipopolysaccharide: Association with specific negative regulators of the Toll-like receptor 4 signaling pathway. *Transplantation* 2011; 91: 1082–1089.

#### TUDCA in Steatotic Liver Transplantation

### 3. TERCER ESTUDIO

#### **Adiponectin y resistin protect steatotic livers undergoing transplantation**

**Mónica B. Jiménez Castro**, Araní Casillas Ramírez, Mariana Mendes Braz, Marta Massip Salcedo, Jordi Gracia Sancho, Maria Elías Miro, Juan Rodés, Carmen Peralta.

*Journal of Hepatology.* 2013;59:1208-1214.

No se observaron cambios en los niveles de estas adipocitoquinas (adiponectina, resistina y visfatina) en hígados no esteatósicos, lo cual está en consonancia con la ineffectividad del pre-tratamiento de tales adipocitoquinas en este tipo de injertos. No se observaron alteraciones en los niveles de visfatina en los injertos esteatósicos y por consiguiente la modulación farmacológica no indujo cambios en el daño hepático. Por otra parte, los injertos esteatósicos exhibieron una reducción en los niveles de adiponectina y resistina (tanto en los niveles de proteína como de mRNA) cuando se sometieron a trasplante. La adiponectina se localizó principalmente en las células endoteliales de los vasos portales, en los sinusoides y en los hepatocitos. La inmunorreactividad para resistina se limitó a los sinusoides hepáticos y a los hepatocitos. El pre-tratamiento con adiponectina protegió a los injertos esteatósicos, y lo hizo a través de un mecanismo dependiente de resistina e independiente de visfatina. De hecho, la administración de resistina en hígados esteatósicos sometidos a trasplante redujo la lesión hepática y aumentó la proliferación celular y la supervivencia de los receptores mientras que si se inhibe la resistina, la adiponectina no protege a los injertos hepáticos esteatósicos. La acumulación de resistina inducida por adiponectina activó a la vía PI3K/Akt. La administración de adiponectina o resistina aumentó la expresión de PI3K/Akt mientras que la inhibición de la resistina eliminó los beneficios de la adiponectina sobre esta vía de señalización celular. Los resultados de este estudio señalaron al AMPK como un mediador cascada arriba en la vía adiponectina-resistina-PI3K/Akt en injertos hepáticos esteatósicos sometidos a trasplante. Nuestros estudios basados en la modulación farmacológica del AMPK indicaron que estrategias dirigidas a aumentar la adiponectina incluyendo activadores del AMPK o la inducción del PC isquémico (el cual activa AMPK) aumentaron los niveles de resistina y activaron la vía PI3K/Akt, protegiendo así a los injertos hepáticos esteatósicos.

## Adiponectin and resistin protect steatotic livers undergoing transplantation

Mónica B. Jiménez-Castro<sup>1,†</sup>, Araní Casillas-Ramírez<sup>1,2,†</sup>, Mariana Mendes-Braz<sup>1</sup>, Marta Massip-Salcedo<sup>1,3</sup>, Jordi Gracia-Sancho<sup>4</sup>, María Elias-Miró<sup>1</sup>, Juan Rodés<sup>1,5</sup>, Carmen Peralta<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Campus de la Salud, Universidad La Salle Victoria, Cd. Victoria, Mexico; <sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Liver Unit, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Transplantation

**Background & Aims:** Numerous steatotic livers are discarded for transplantation because of their poor tolerance to ischemia-reperfusion. Controversial roles for adiponectin and related adipocytokines visfatin and resistin have been described in different liver pathologies, nevertheless it is unknown their possible implication in ischemia-reperfusion injury associated with liver transplantation. Our study aimed at characterizing the role of the adiponectin-derived molecular pathway in transplantation with steatotic and non-steatotic liver grafts.

**Methods:** Steatotic and non-steatotic liver transplantation was carried out and the hepatic levels of adiponectin, visfatin and resistin were measured and modulated either pharmacologically or surgically.

**Results:** Steatotic liver grafts exhibited downregulation of both adiponectin and resistin when subjected to transplantation. Adiponectin pre-treatment only protected steatotic grafts and did it so through a visfatin-independent and resistin-dependent mechanism. Adiponectin-derived resistin accumulation activated the PI3K/Akt pathway, unravelling AMPK as an upstream mediator of adiponectin's actions in steatotic grafts. Strategies aimed at increasing adiponectin including either AMPK activators or the induction of ischemic preconditioning (which activates AMPK) increased resistin accumulation, prevented the downregulation of PI3K/Akt pathway and protected steatotic liver grafts. Conversely, PI3K/Akt pathway upregulation and hepatic protection induced by adiponectin were abolished when resistin action was inhibited.

**Conclusions:** Our findings reveal a new protective pathway in steatotic liver transplantation, namely AMPK-adiponectin-resistin-PI3K/Akt, which may help develop new strategies aimed at increasing either adiponectin or resistin in the steatotic liver undergoing transplant to ultimately increase organ donor pool and reduce waiting list.

© 2013 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

Owing to the discrepancy between organ donation and the demand for liver transplantation, expanding the liver donor pool is of vital importance. The potential use of steatotic livers, which are among the most common types of organs from extended-criteria donors, has become a major focus of investigation for transplantation. Unfortunately, more than 50% of livers that are considered as not suitable for transplantation due to their pathological conditions are discarded because of the presence of fatty infiltration. Steatotic livers are more susceptible to ischemia/reperfusion (I/R) injury, and when they are transplanted, they lead to poorer outcomes in comparison with non-steatotic livers. Indeed, the use of steatotic livers for transplantation is associated with an increased risk of primary non-function or dysfunction after surgery [1,2].

It has been suggested that the pathogenesis of fatty liver diseases is associated with deregulated production and release of novel adipocytokines, including adiponectin, visfatin and resistin [3]. Since the discovery of adiponectin, diverse experimental and clinical studies have demonstrated that adiponectin mediates anti-inflammatory effects [4–6]. To the best of our knowledge, only 2 studies have reported a role for adiponectin in steatotic livers subjected to I/R. Massip-Salcedo *et al.* [7] showed injurious effects of adiponectin on steatotic livers subjected to 60 min of warm ischemia. However, Man *et al.* [4] demonstrated the anti-inflammatory effects of adiponectin in small fatty grafts subjected to 40 min of cold ischemia. The aforementioned data suggest that the role of adiponectin depends on the surgical conditions. Therefore, one of the aims of the present study was to determine whether adiponectin should be inhibited or activated

**Keywords:** Adiponectin; Resistin; Visfatin; Steatotic liver grafts; Liver transplantation.

Received 22 March 2013; received in revised form 19 June 2013; accepted 8 July 2013; available online 16 July 2013

\* Corresponding author. Address: Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Esther Koplowitz Center, Roselló 149-153, 3rd floor, office 3.8, E-08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275400x4177; fax: +34 933129406. E-mail address: cperalta@clinic.ub.es (C. Peralta).

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

**Abbreviations:** I/R, ischemia-reperfusion; IC, ischemic preconditioning; Ob, obese; Ln, lean; TR, transplantation; UW, University of Wisconsin; AMPK, AMP-activated protein kinase; AICAR, aminimidazole-4-carboxamide ribonucleoside; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase;  $\alpha$ -GST, alpha-glutathione S-transferase; H&E, hematoxylin and eosin; ANOVA, analysis of variance.



to protect steatotic livers undergoing 6 h of cold ischemia, which is commonly used in cadaveric donor liver transplantation [8].

As far as we are concerned, the effects of either visfatin or resistin in hepatic I/R injury have not been determined previously. Resistin has been described as an adipokine that exert injurious effects in liver diseases. Indeed, increased resistin levels in non-alcoholic fatty liver disease patients [9] and patients with cirrhosis [10] were related to the severity of the disease. On the other hand, the role of visfatin in the pathogenesis of liver diseases is less clear. As visfatin shows pro-inflammatory properties in various inflammatory disorders such as sepsis and inflammatory bowel disease [11,12], it was suggested to be one of the mediators connecting obesity with inflammation. Moreover, a potential role of visfatin in the pathogenesis and progression of non-alcoholic fatty liver diseases has been reported [13]. However, opposite results regarding the role of visfatin indicate that this adipocytokine has hepatoprotective effects [14] or even does not seem to be associated with inflammation [15].

Here we examined the generation of adiponectin, visfatin and resistin in steatotic and non-steatotic livers undergoing transplantation. We investigated whether modulating adiponectin, resistin and/or visfatin could protect steatotic and non-steatotic liver grafts against damage associated with liver transplantation. In addition, we compared the effects of pharmacological treatments that modulate these adipocytokines in liver transplantation to those obtained after applying ischemic preconditioning (PC). To date, despite intense research efforts, PC is the only surgical strategy that has been successfully applied in patients with steatotic livers undergoing warm or cold ischemia conditions [1]. The effects of this surgical strategy on adiponectin, visfatin and resistin in liver transplantation remain unknown. Only a full appraisal of the molecular basis underlying PC in both non-steatotic and steatotic livers will facilitate the design of new clinical applications of PC in liver surgery, as well as new pharmacological strategies to simulate its effectiveness.

## Materials and methods

### Experimental animals

This study was performed using homozygous (obese [Ob]) and heterozygous (lean [Ln]) Zucker rats (Iffa Credo, L'Arbresle, France) at 10 to 11 weeks. Steatosis in Zucker rats is not associated with inflammation. Ob rats showed moderate macrovesicular and microvesicular fatty infiltration in hepatocytes (40–60% steatosis), whereas Ln rats showed no evidence of steatosis [16]. Analyses of triglyceride content and fatty droplet accumulation in steatotic livers revealed that, under our conditions, the drugs used did not induce changes in liver steatosis. All procedures were performed under isoflurane inhalation anesthesia [16]. This study conformed to European Union regulations (Directive 86/609 EEC) for animal experiments. Animals were randomly distributed into groups as described below.

### Experimental design

Group 1. Sham. Ln and Ob animals were subjected to transverse laparotomy. Silk ligatures were applied to the right suprarenal vein, diaphragmatic vein, and hepatic artery [16].

Group 2. TR. In subgroup 2.1, steatotic livers from Ob Zucker rats were flushed with University of Wisconsin (UW) solution, isolated, preserved in ice-cold UW solution for 6 h [16] and implanted into Ln Zucker rats according to the Kamada cuff technique without hepatic artery reconstruction [17]. In subgroup 2.2, the same surgical procedure was repeated, but with Ln Zucker rats as donors and recipients. Duration of anhepatic phase was 17–19 min [16].

Group 3. TR + adiponectin. Same as group 2, but donors were treated with recombinant adiponectin (1.5 mg/kg, i.v.; AdipoGen Inc., Korea), 20 min before the surgical procedure [4,7].

Group 4. TR + adiponectin + anti-adiponectin. Same as group 2.1, but donors were treated with recombinant adiponectin (1.5 mg/kg, i.v.), 20 min before the surgical procedure [4,7] and anti-adiponectin antibody (3 mg/kg, i.v.; R&D Systems, USA), 30 min before the surgical procedure [18].

Group 5. TR + visfatin. Same as group 2, but donors were treated with recombinant visfatin (50 µg/kg, i.v.; Enzo Life Sciences, Switzerland), 10 min before the surgical procedure [19].

Group 6. TR + anti-visfatin. Same as group 2.1 but donors were treated with an anti-visfatin neutralizing antibody (500 µg/kg, i.v.; AdipoGen Inc., Korea), 30 min before the surgical procedure [20].

Group 7. TR + adiponectin + anti-resistin. Same as group 2.1, but donors were treated with recombinant adiponectin (1.5 mg/kg, i.v.), 20 min before the surgical procedure [4,7] and anti-resistin antibody (1 mg/kg, i.v.; Merck Millipore, USA), 30 min before the surgical procedure [21].

Group 8. TR + resistin. Same as group 2, but donors were treated with recombinant resistin (100 µg/kg, i.v.; PeproTech Inc, USA), 10 min before the surgical procedure [22].

Group 9. TR + resistin + anti-adiponectin. Same as group 2.1, but donors were treated with recombinant resistin (100 µg/kg, i.v.), 10 min before the surgical procedure [22] and anti-adiponectin antibody (3 mg/kg, i.v.; R&D Systems, USA), 30 min before the surgical procedure [18].

Group 10. PC + TR. Same as group 2.1, but donors were treated with PC (induced by 5 min of ischemia followed by 10 min of reperfusion) before livers were flushed and preserved in UW solution [16].

Group 11. TR + AMPK activator. Same as group 2.1, but donors were treated with the AMP-activated protein kinase (AMPK) activator aminimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR; 100 mg/kg, i.v.; Toronto Research Chemicals, Canada), 5 min before the surgical procedure [16].

Group 12. PC + TR + AMPK inhibitor. Same as group 2.1, but donors were treated with PC and the AMPK inhibitor adenine 9-β-D-arabinofuranoside (100 µg/kg/min, i.v., Sigma-Aldrich, USA), 10 min before the surgical procedure [16].

The doses and pre-treatment times used for the different drugs were selected on the basis of previous studies described above and preliminary studies from our group. Control experiments were performed using the vehicles of the drugs used in this study.

For all determinations (excluding Ki-67), plasma and liver samples were collected 4 h after transplantation. A cold ischemic period of 6 h is long enough to induce liver damage after transplantation in both liver grafts and to allow high survival at 4 h after transplantation [16]. The proportion of proliferating cells, estimated by Ki-67 immunostaining, was evaluated at 3 days after transplantation [23]. Additionally, the survival of receptors was monitored for 14 days [16].

### Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction

Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis was performed using the Assays-on-Demand TaqMan probes (Rn00595250\_m1 for adiponectin; Rn00822043\_m1 for visfatin; Rn00595224\_m1 for resistin; Rn00667869\_m1 for β-actin) (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's protocol.

### Western blotting of PI3K and Akt

Western blotting was performed as described [24], using the following antibodies: phosphoinositide-3-kinase (PI3K) (Cell Signaling Technology, USA), total and phosphorylated Akt (T-Akt and p-Akt, respectively; Santa Cruz Biotechnology, USA) and β-actin (Sigma-Aldrich, USA).

### Biochemical determinations

Transaminases (AST and ALT) and α-GST were measured using standard procedures. Adipokines were measured using enzyme-linked immunosorbent assay kits for adiponectin, resistin (Adipogen Inc., Korea) and visfatin (B-Bridge International, USA), according to the manufacturer's instructions. Caspase 3 activity assay (as an index of apoptosis) and AMPK activity were measured as described elsewhere [25,26].

## Research Article

## Histology and red oil staining

To appraise the severity of hepatic injury, hematoxylin and eosin-stained sections were evaluated using a point-counting method on an ordinal scale as follows: grade 0, minimal or no evidence of injury; grade 1, mild injury consisting of cytoplasmic vacuolation and focal nuclear pyknosis; grade 2, moderate to severe injury with extensive nuclear pyknosis, cytoplasmic hyper eosinophilia, and loss of intercellular borders; and grade 3, severe necrosis with disintegration of hepatic cords, hemorrhage, and neutrophil infiltration [16]. To appraise the hepatic fatty droplets content, Red oil staining was performed using standard procedures.

## TUNEL staining

DNA fragmentation was determined using a TUNEL assay in deparaffinized liver samples according to the manufacturer's instructions (Chemicon, USA) [25].

## Immunocytochemistry for Ki-67, adiponectin and resistin

The proportion of proliferating cells was estimated by Ki-67 immunostaining [23]. Liver samples were immunostained with a monoclonal antibody against Ki-67 (clone SP6, Abcam, UK), or polyclonal antibodies against either adiponectin or resistin (R&D Systems, USA).

## Statistics

Data are expressed as means  $\pm$  standard error and were compared statistically via one way analysis of variance (ANOVA), followed by *post hoc* Student-Newman-Keuls test. Survival was estimated with the Kaplan-Meier method and was compared with a long-rank test.  $p < 0.05$  was considered significant.

## Results

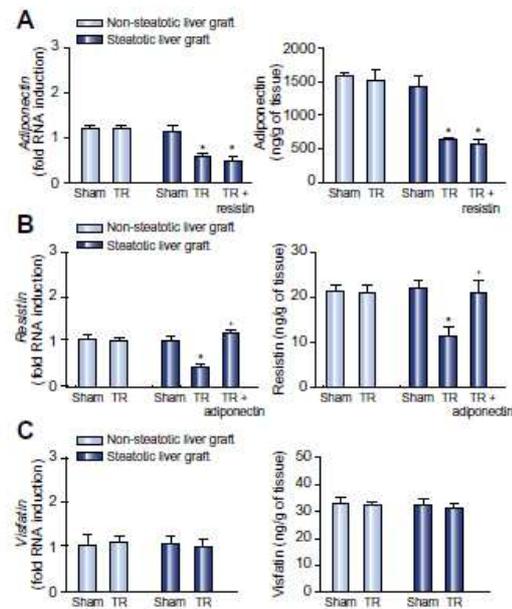
## Adiponectin, visfatin, and resistin in steatotic and non-steatotic liver transplantation

Adiponectin, resistin, and visfatin mRNA expression and protein levels in non-steatotic liver grafts of the TR group were similar to those found in the Sham group (Fig. 1). This is consistent with our findings indicating that non-steatotic grafts were not protected when either adiponectin, resistin or visfatin was administered (ALT levels,  $1640 \pm 168$ ,  $1635 \pm 230$ ,  $1540 \pm 225$ , and  $1590 \pm 205$  for the TR + adiponectin, TR + resistin, TR + visfatin, and TR groups, respectively; AST levels,  $2120 \pm 312$ ,  $2159 \pm 328$ ,  $2089 \pm 355$ , and  $2075 \pm 332$  for the TR + adiponectin, TR + resistin, TR + visfatin, and TR groups, respectively; TR and TR + adiponectin; TR and TR + resistin, and TR and TR + visfatin,  $p = n.s.$ ).

A marked reduction in mRNA expression and protein levels of both adiponectin and resistin was observed in steatotic liver grafts of the TR group with respect to its Sham group (Fig. 1A and B). Resistin treatment (TR + resistin group) did not modify adiponectin levels in steatotic grafts, whereas TR + adiponectin group showed increased hepatic resistin levels in comparison to the TR group.

In the Sham group, hepatic adiponectin protein expression was localized primarily in endothelial cells of portal vessels, sinusoids and hepatocytes (Fig. 2A). Immunoreactivity for resistin was confined to liver sinusoids and hepatocytes (Fig. 2B). Both, adiponectin and resistin staining in non-steatotic liver grafts of the TR group was similar to the sham group. However, adiponectin and resistin staining was markedly lower in steatotic liver grafts of the TR group compared with the Sham group (Fig. 2).

Visfatin mRNA and protein levels in steatotic grafts of the TR group were similar to those in the Sham group (Fig. 1C).



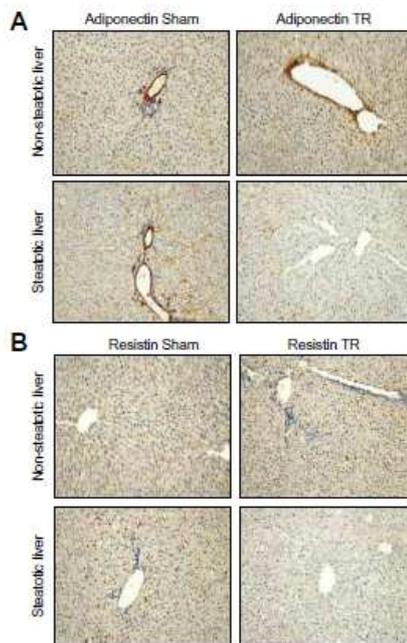
**Fig. 1. Adiponectin, visfatin, and resistin in steatotic and non-steatotic liver transplantation.** Expression of mRNA and protein levels of (A) adiponectin, (B) resistin and (C) visfatin (6 transplants per group in each measurement); \* $p < 0.05$  vs. sham, \* $p < 0.05$  vs. TR.

Accordingly, the pharmacological modulation of visfatin in steatotic liver grafts did not induce changes in hepatic damage (Fig. 3A and B).

$\alpha$ -GST levels in all groups of the present study followed a pattern similar to that described for transaminases (data not shown).

## Resistin involvement in adiponectin-induced effects on hepatic injury in steatotic liver transplantation

Adiponectin administration (TR + adiponectin group) protected steatotic grafts, as the biochemical and histological parameters of hepatic injury were lower than those recorded in the TR group. Interestingly, the benefits of adiponectin were abolished when antibodies anti-adiponectin were administered (TR + adiponectin + anti-adiponectin group) (Fig. 3A and B). Our results indicated that when resistin was inhibited, adiponectin did not protect steatotic liver grafts against damage. Indeed, the TR + adiponectin + anti-resistin group showed no beneficial effects since resulted in hepatic injury parameters similar to those in the TR group (Fig. 3A and B). Remarkably, resistin administration to steatotic livers undergoing transplantation (TR + resistin group) resulted in significant amelioration of liver injury. The benefits of resistin were unmodified when antibodies anti-adiponectin were administered (TR + resistin + anti-adiponectin group), indicating that if adiponectin action is inhibited, resistin is still able to protect steatotic liver grafts.



**Fig. 2.** Immunolocalization of adiponectin and resistin in steatotic and non-steatotic liver transplantation. Expression of both (A) adiponectin and (B) resistin in endothelial cells of portal vessels, sinusoids, and hepatocytes in sham and TR groups (10 $\times$ ). (This figure appears in colour on the web.)

Steatotic grafts of the TR group showed extensive and confluent areas of coagulative necrosis with neutrophil infiltration that were reduced in number and extension in the TR + adiponectin, TR + resistin and TR + resistin + anti-adiponectin groups (Supplementary Fig. 1). TR + visfatin, TR + anti-visfatin, TR + adiponectin + anti-adiponectin, and TR + adiponectin + anti-resistin led to histological lesions in steatotic grafts similar to those of the TR group. Apoptosis analysis, by means of TUNEL and caspase 3 activity, showed no differences comparing all steatotic groups (Supplementary Fig. 2 and Fig. 3C). No apoptosis was also observed in steatotic liver grafts at earlier or later time points (data not shown). This is in line with previous studies indicating that necrosis rather than apoptosis is the predominant form of hepatocyte death post-reperfusion in steatotic liver grafts undergoing 6 h of cold ischemia [25]. With regard to cell proliferation, the number of Ki-67-positive hepatocytes in the TR + adiponectin, TR + resistin and TR + resistin + anti-adiponectin groups was higher than in the TR group. The percentage of Ki-67-positive hepatocytes in TR + visfatin, TR + anti-visfatin, TR + adiponectin + anti-adiponectin, and TR + adiponectin + anti-resistin groups was similar to that of the TR group (Fig. 3C and Supplementary Fig. 3).

Survival experiments evidenced that recipients transplanted with steatotic grafts without any treatment (TR group) showed 30% survival at 14 days, most of the deaths occurring within the first 2 days (Fig. 3B). Treatment with adiponectin (TR + adiponectin group) or resistin (TR + resistin group) reduced lethality in

recipients compared with the TR group ( $p < 0.05$ ) and resulted in a 70% survival rate at 14 days. Survival amelioration was not observed in the TR + adiponectin + anti-resistin group ( $p = n.s.$ ).

#### Modulation of PI3K/Akt pathway by resistin in steatotic liver transplantation

Next, we attempted to explain how resistin may protect steatotic liver grafts. Considering previous data in myocardial infarction suggesting that the action mechanisms of resistin occur by a PI3K/Akt dependent pathway [27], we evaluated whether resistin upregulation induced by adiponectin affected the PI3K/Akt pathway in steatotic grafts. In the TR group, protein levels of PI3K and pAkt (the primary target of PI3K-initiated signaling) were lower than in the Sham group (Fig. 4A). Importantly, TR + adiponectin and TR + resistin groups, showed higher levels of PI3K and pAkt than in the TR group. The inhibition of resistin action (TR + adiponectin + anti-resistin group) abolished the effects of adiponectin on PI3K/Akt pathway, since it resulted in PI3K and pAkt levels similar to those in the TR group (Fig. 4A). Thus, adiponectin treatment increased resistin in steatotic liver grafts and this was associated with PI3K and pAkt levels higher than those observed in the TR group.

#### Effect of AMPK on adiponectin, resistin and PI3K/Akt pathway in steatotic liver transplantation

The beneficial effects of AMPK activators such as AICAR and PC in steatotic liver transplantation were previously reported by our group using the same experimental approaches described here [16,26], however, the responsible mechanisms remain poorly understood. We investigated whether AMPK activation by either AMPK activators or PC induction could affect adiponectin-resistin-PI3K/Akt pathway in steatotic liver grafts. PC induction and AMPK activator AICAR (PC + TR and TR + AMPK activator groups) increased AMPK activity when compared with the TR group. AMPK activity (pmol/mg prot/min) was  $43.97 \pm 1.38$ ,  $112.7 \pm 0.96$ , and  $107.0 \pm 3.6$  for TR, PC + TR and TR + AMPK activator, respectively ( $p < 0.05$ ). AMPK inhibition (PC + TR + AMPK inhibitor group) resulted in AMPK activity levels ( $44.61 \pm 3.78$ ) similar to those of the TR group. Herein we show that PC + TR and TR + AMPK activator groups increased adiponectin and resistin (Fig. 4B) and PI3K and p-Akt levels (Fig. 4A) when compared with the TR group. These findings were associated with a reduction in transaminases and the extent and number of necrotic areas (Supplementary Fig. 4A). Conversely, AMPK inhibition (PC + TR + AMPK inhibitor) abolished the benefits of preconditioning (PC + TR group) on adiponectin, resistin, PI3K/Akt pathway (Fig. 4) and hepatic injury (Supplementary Fig. 4). The damage score values in all groups of the study are shown in Supplementary Fig. 4. Apoptosis analysis showed no differences between groups (Supplementary Fig. 4B). The number of Ki-67-positive hepatocytes in the PC + TR and TR + AMPK activator groups was higher than in the TR group. The percentage of Ki-67-positive hepatocytes in the PC + TR + AMPK inhibitor group was similar to that of the TR group (Supplementary Fig. 4C).

#### Discussion

In contrast with the key role of visfatin in different inflammatory diseases [11–13], we report by the first time that visfatin is not

Research Article

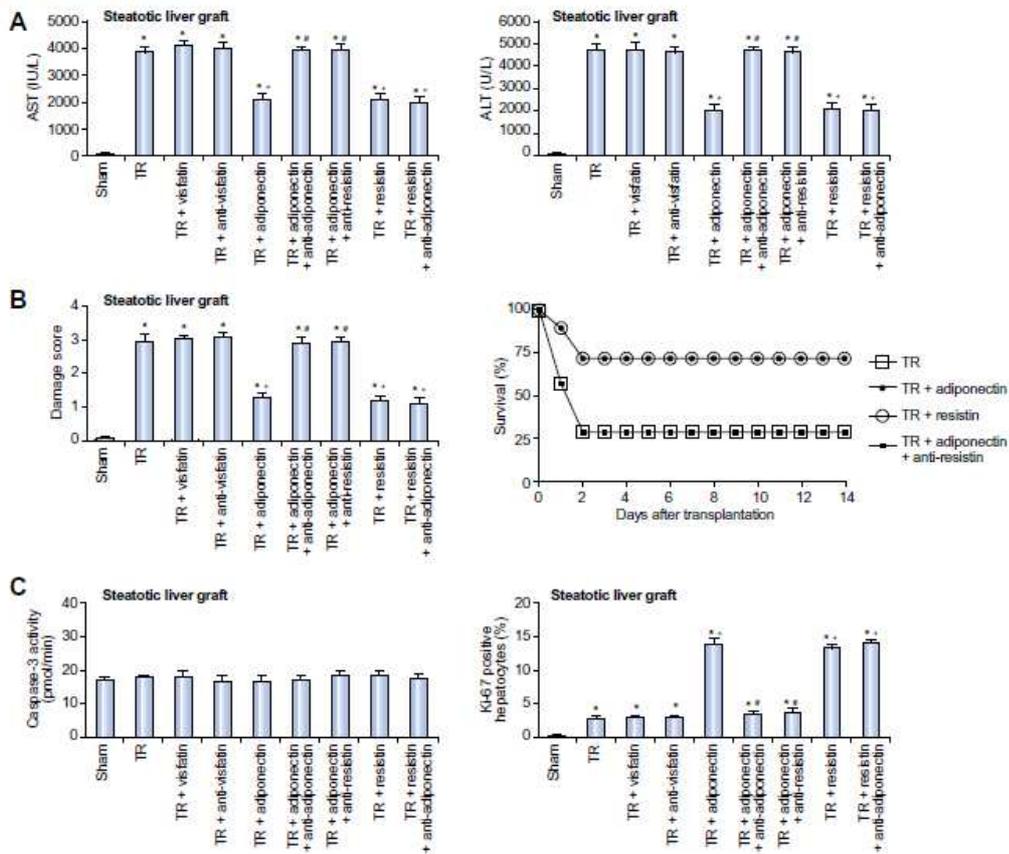


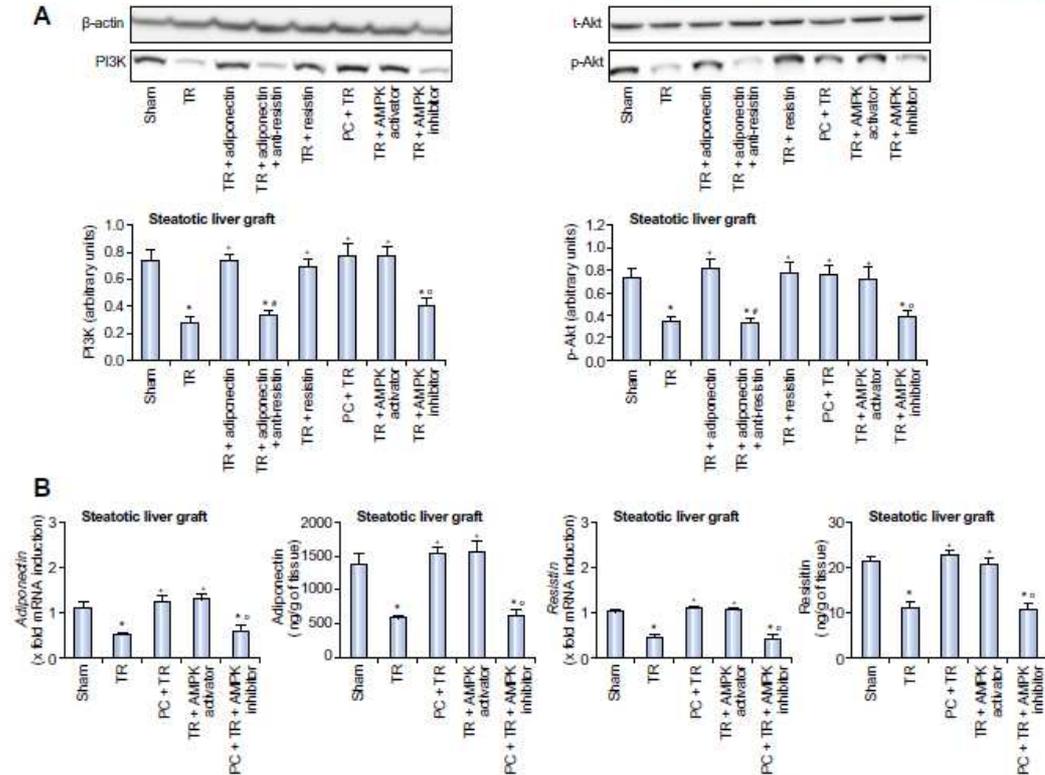
Fig. 3. Resistin involvement in adiponectin-induced effects on hepatic injury, survival, and cell proliferation in steatotic liver transplantation. (A) Transaminase levels, (B) damage score and % of survival and (C) caspase 3 activity levels and percentage of Ki67-positive hepatocytes (6 transplants per group in each measurement and 10 transplants per group for survival studies). \**p* <0.05 vs. sham, \*\**p* <0.05 vs. TR, \*\*\**p* <0.05 vs. TR + adiponectin.

involved in either the vulnerability of steatotic livers to damage associated with transplantation or in the benefits of adiponectin in steatotic liver transplantation. Indeed, in our surgical conditions, visfatin mRNA and protein levels after transplantation were similar to the Sham group. By contrast, we herein show that steatotic livers are more predisposed to downregulate both adiponectin and resistin when subjected to transplantation, presumably due to impaired hepatic production. Indeed, this finding is in line with previous data showing that adipocytokines might be down-regulated under stress conditions, at both protein and mRNA levels [4].

Pharmacological strategies aimed at modulating adiponectin were irrelevant for non-steatotic liver grafts submitted to 6 h of cold ischemia. However, our results indicate that we should activate the adiponectin signalling pathway to protect steatotic liver grafts against damage associated with transplantation. In contrast to other studies that describe resistin as an adipocytokine

responsible of hepatic inflammation associated with different liver diseases [9,10,28,29], here we describe for the first time that resistin pre-treatment could be a useful strategy to reduce the vulnerability of steatotic livers submitted to transplantation. Interestingly, this strategy specifically benefited steatotic liver grafts but was ineffective in non-steatotic livers.

Our results suggest a potential pathway based on the relationship between adiponectin and resistin in steatotic liver transplantation. Experimental data indicate that chronic high-fat diet feeding decreased adiponectin and increased resistin plasma levels, indicating a negative correlation between both adipocytokines [30], however, in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease, no correlation between adiponectin and resistin was described [31,32]. In contrast with these data, our results indicate that adiponectin might be a positive regulator of resistin in steatotic liver grafts undergoing transplantation. Here we report that adiponectin pre-treatment increased resistin in



**Fig. 4. Role of AMPK on adiponectin-resistin-PI3K/Akt pathway in steatotic liver transplantation.** Representative Western blot and densitometric quantification of (A), PI3K and p-Akt and (B) levels of adiponectin and resistin (n = 6 transplants per group in each measurement). \*p < 0.05 vs. sham, \*\*p < 0.05 vs. TR; #p < 0.05 vs. TR + adiponectin, §p < 0.05 vs. PC + TR.

steatotic liver grafts and protected them against damage, when compared with the non-treated group. The beneficial effects induced by adiponectin were abolished when resistin action was inhibited. Finally, the reduced hepatic damage parameters obtained after resistin activation using recombinant resistin reinforced the benefits of this adipocytokine in steatotic liver transplantation.

To better understand why resistin overexpression would protect steatotic liver grafts against damage associated with transplantation, and based on previously published results in the heart [27], we evaluated whether resistin activation induced by adiponectin affected the PI3K/Akt pathway in steatotic liver grafts. Importantly, the PI3K/Akt signaling pathway limits hepatocyte death and plays a crucial role in cell survival [1,24]. Herein we show that treatment with either adiponectin or resistin prevented the downregulation of the PI3K/Akt cell survival signaling pathway observed in steatotic liver grafts after transplantation. Interestingly, blockade of resistin abolished the effects of adiponectin on the PI3K/Akt pathway in steatotic liver grafts, suggesting a new mechanism, namely PI3K/Akt regulation, to explain

why resistin activation induced by adiponectin protects steatotic liver grafts. While previous data indicate that adiponectin activates AMPK in the liver [33,34], herein we report a regulation in the reverse direction since AMPK increased adiponectin in steatotic liver grafts. Indeed, AMPK activation either by AICAR administration or by PC increased the accumulation of adiponectin in steatotic liver grafts. This in turn, increased resistin, activated PI3K/Akt pathway and protected steatotic livers against damage that follows transplantation.

In light of the above mentioned results, pharmacological strategies aimed at modulating adiponectin and resistin would probably be irrelevant in non-steatotic livers under these surgical conditions. However, this seems to be not the case in the presence of steatosis. Steatotic liver grafts downregulated both adiponectin and resistin after transplantation, and the treatment with either adiponectin or resistin protected them. Our results define that adiponectin may increase resistin and this in turn upregulates PI3K/Akt pathway, overall protecting steatotic liver grafts. In terms of clinical applications, drugs able to regulate these adipocytokines, namely adiponectin and resistin, have the potential

## Research Article

to increase organ donor-pool for transplantation since they may improve the outcomes of steatotic liver grafts that otherwise would not be transplanted.

### Financial support

This research was supported by the *Ministerio de Economía y Competitividad* (project grant SAF2012-31238) Madrid, Spain. Jiménez-Castro M.B. is in receipt of a fellowship from the *Societat Catalana de Transplantament*, Barcelona, Spain. Gracia-Sancho J has a Ramón y Cajal contract from the Ministerio de Economía y Competitividad.

### Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

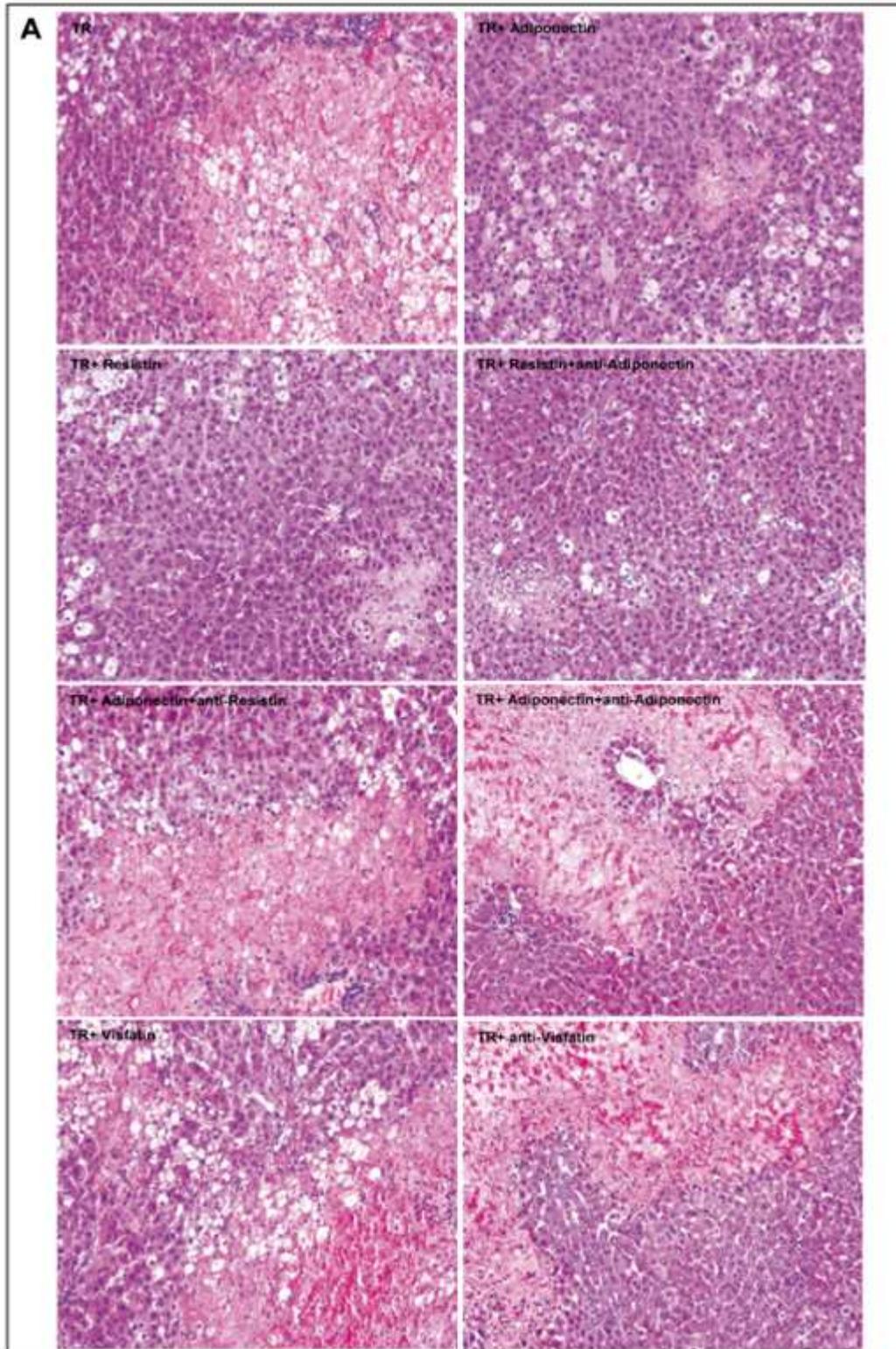
### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.07.015>.

### References

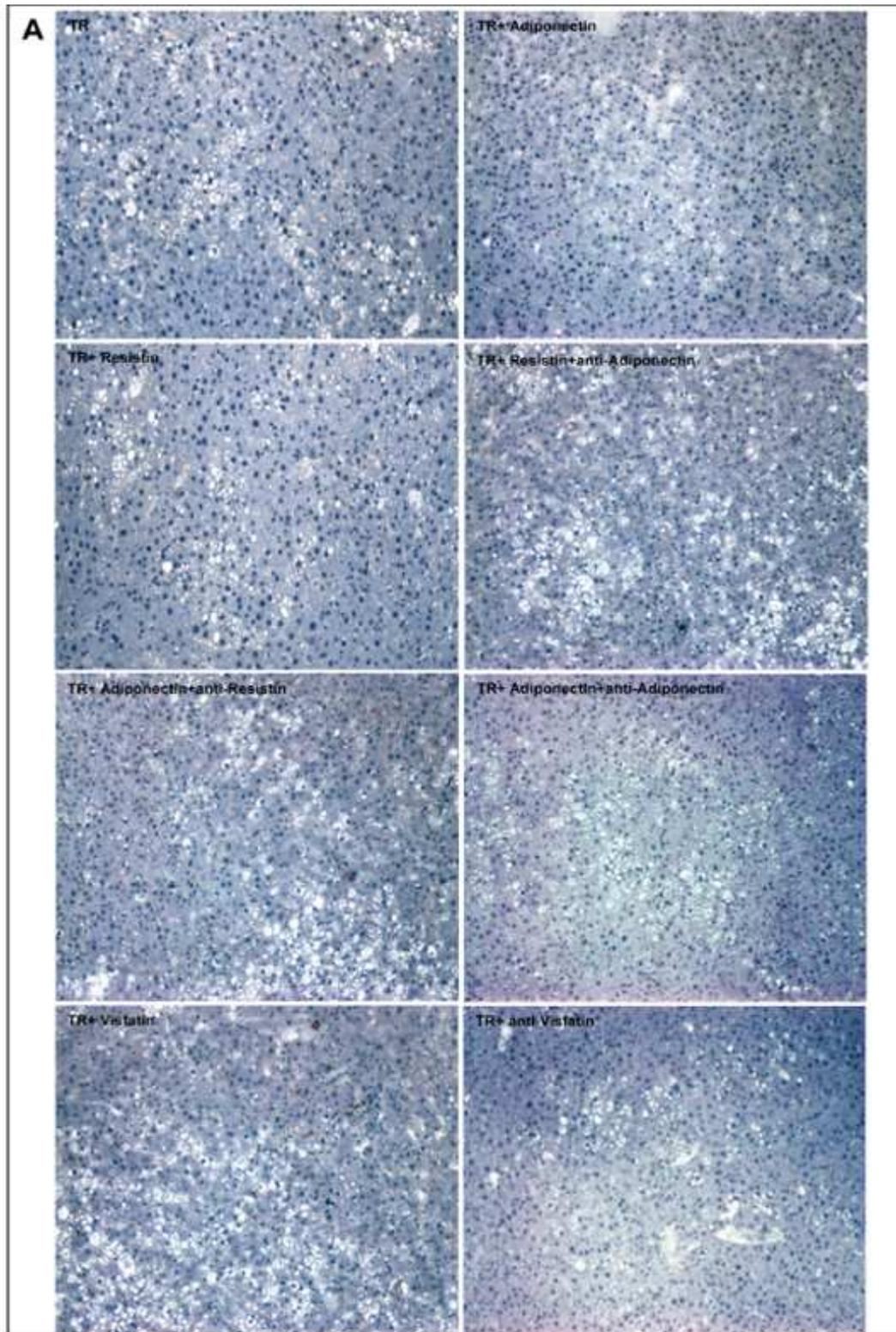
- Casillas-Ramírez A, Moshah IB, Ramalho F, Roselló-Catafau J, Peraita C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci* 2006;79:1881-1894.
- Selzner M, Clavien PA. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin Liver Dis* 2001;21:105-113.
- Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007;132:2169-2180.
- Man K, Zhao Y, Xu A, Lo CM, Lam KS, Ng KT, et al. Fat-derived hormone adiponectin combined with FTY720 significantly improves small-for-size fatty liver graft survival. *Am J Transplant* 2006;6:467-476.
- Wolf AM, Wolf D, Avila MA, Moschen AR, Berasain C, Enrich B, et al. Up-regulation of the anti-inflammatory adipokine adiponectin in acute liver failure in mice. *J Hepatol* 2006;44:537-543.
- Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. Adiponectin, a key adipokine in obesity-related liver diseases. *World J Gastroenterol* 2011;17:2801-2811.
- Massip-Salcedo M, Zaouali M, Padrissa-Altés S, Casillas-Ramírez A, Rodés J, Roselló-Catafau J, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  inhibits the injurious effects of adiponectin in rat steatotic liver undergoing ischemia-reperfusion. *Hepatology* 2008;47:461-472.
- Durand F, Renz JF, Alkofer B, Burra P, Clavien PA, Porte RJ, et al. Report of the Paris consensus meeting on expanded criteria donors in liver transplantation. *Liver Transpl* 2008;14:1694-1707.
- Pagano C, Sordo G, Pilon C, Milocco C, Basan L, Milan G, et al. Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1081-1086.
- Bahr MJ, Ockenga J, Böker KH, Manns MP, Tietge UJ. Elevated resistin levels in cirrhosis are associated with the proinflammatory state and altered hepatic glucose metabolism but not with insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E199-E206.
- Jia SH, Li Y, Parodo J, Kapus A, Fan L, Rotstein OD, et al. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest* 2004;113:1318-1327.
- Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, et al. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol* 2007;178:1748-1758.
- Kukla M, Ciupinska-Kajor M, Kajor M, Wylezol M, Zwirska-Korczyńska K, Hartleb M, et al. Liver visfatin expression in morbidly obese patients with nonalcoholic fatty liver disease undergoing bariatric surgery. *Pol J Pathol* 2010;3:147-153.
- Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:412-421.
- Gonzalez-Gay MA, Vazquez-Rodriguez TR, Garcia-Unzueta MT, Berja A, Miranda-Fillio JA, de Matias JM, et al. Visfatin is not associated with inflammation or metabolic syndrome in patients with severe rheumatoid arthritis undergoing anti-TNF-alpha therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2010;28:56-62.
- Casillas-Ramírez A, Alfany-Fernández I, Massip-Salcedo M, Juan ME, Planas JM, Serafin A, et al. Retinol-binding protein 4 and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in steatotic liver transplantation. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;338:143-153.
- Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 1979;28:47-50.
- Liu J, Guo M, Zhang D, Cheng S, Liu M, Ding J, et al. Adiponectin is critical in determining susceptibility to depressive behaviors and has antidepressant-like activity. *PNAS* 2012;109:12248-12253.
- Park BS, Jin SH, Park JJ, Park JW, Namgoong IS, Kim Y, et al. Visfatin induces sickness response in the brain. *PLoS One* 2011;6:1-8.
- Hong SB, Huang Y, Moreno-Vinasco L, Sammani S, Moltra J, Barnard JW, et al. Essential role of pre-B-cell colony enhancing factor in ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:605-617.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307-312.
- Li Y, Wang Y, Li Q, Chen Y, Sun S. Effect of resistin on vascular endothelium secretion dysfunction in rats. *Endothelium* 2007;14:207-214.
- Shen K, Zheng S, Park O, Wang H, Sun Z, Gao B. Activation of innate immunity (NF- $\kappa$ B/ $\gamma$ ) in rat allogeneic liver transplantation: contribution to liver injury and suppression of hepatocyte proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G1070-G1077.
- Liu CM, Zheng GH, Ming QL, Sun JM, Cheng C. Protective effect of quercetin on lead-induced oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in rat liver via the IRE1/JNK and PI3K/Akt pathway. *Free Radical Res* 2013;47:192-201.
- Alfany-Fernandez I, Casillas-Ramírez A, Bintanel-Morcillo M, Brosnihan KB, Ferrario CM, Serafin A, et al. Therapeutic targets in liver transplantation: angiotensin II in nonsteatotic grafts and angiotensin-(1-7) in steatotic grafts. *Am J Transplant* 2009;9:439-451.
- Carrasco-Chaumel E, Roselló-Catafau J, Barrons R, Franco-Gou R, Xaus C, Casillas A, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase and nitric oxide in rat steatotic liver transplantation. *J Hepatol* 2005;43:997-1006.
- Gao J, Chua CC, Chen Z, Wang H, Xu X, Hamdy RC, et al. Resistin, an adipocytokine, offers protection against acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:601-609.
- Bertolani C, Sancho-Bru P, Failli P, Batailler R, Aleffi S, DeFranco R, et al. Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2006;169:2042-2053.
- Roth CL, Bfers CT, Figlewicz DP, Melhorn SJ, Morton GJ, Hoofnagle A, et al. Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and toll-like receptor activation. *Hepatology* 2012;55:1103-1111.
- Fujikawa T, Hirata T, Wada A, Kawamura N, Yamaguchi Y, Fujimura K, et al. Chronic administration of eucommia leaf stimulates metabolic function of rats across several organs. *Br J Nutr* 2010;104:1868-1877.
- Baranova A, Cowder SJ, Schlauch K, Hariny H, Collantes R, Afendy A, et al. Gene expression of leptin, resistin and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg* 2006;16:1118-1125.
- Jiang LL, Liu L, Hong X, Liu YM, Zhang BL. Patients with nonalcoholic fatty liver disease display increased serum resistin levels and decreased adiponectin levels. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:662-666.
- Lage R, Diéguez C, Vidal-Puig A, López M. AMIK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med* 2008;14:539-549.
- Adachi M, Brenner DA. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Hepatology* 2008;47:677-685.

Figura Suplementaria 1.



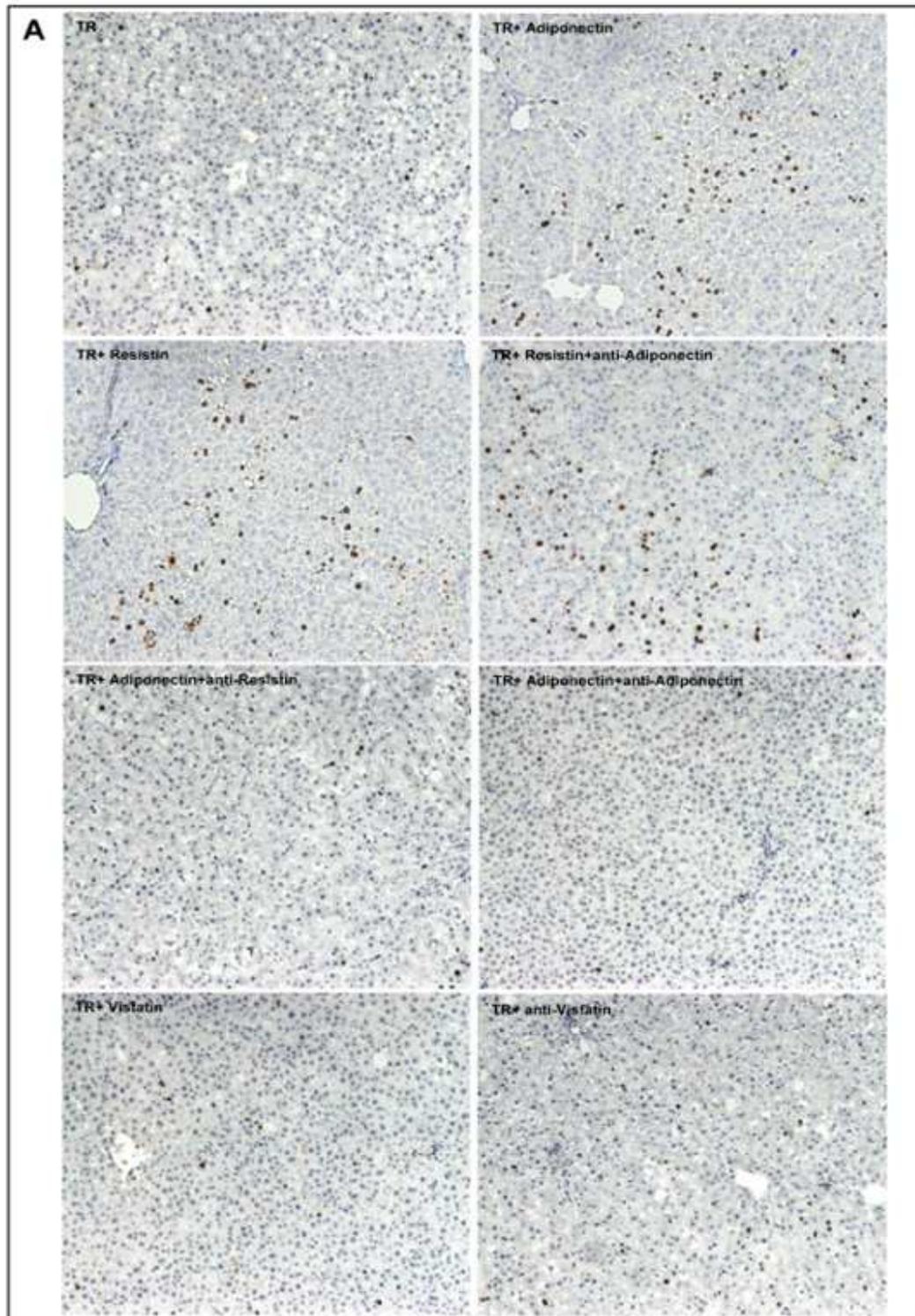
Supplementary Figure 1. Representative photographs of histological lesions in steatotic liver transplantation. Area of coagulative necrosis was analyzed by H&E (10x).

Figura Suplementaria 2.



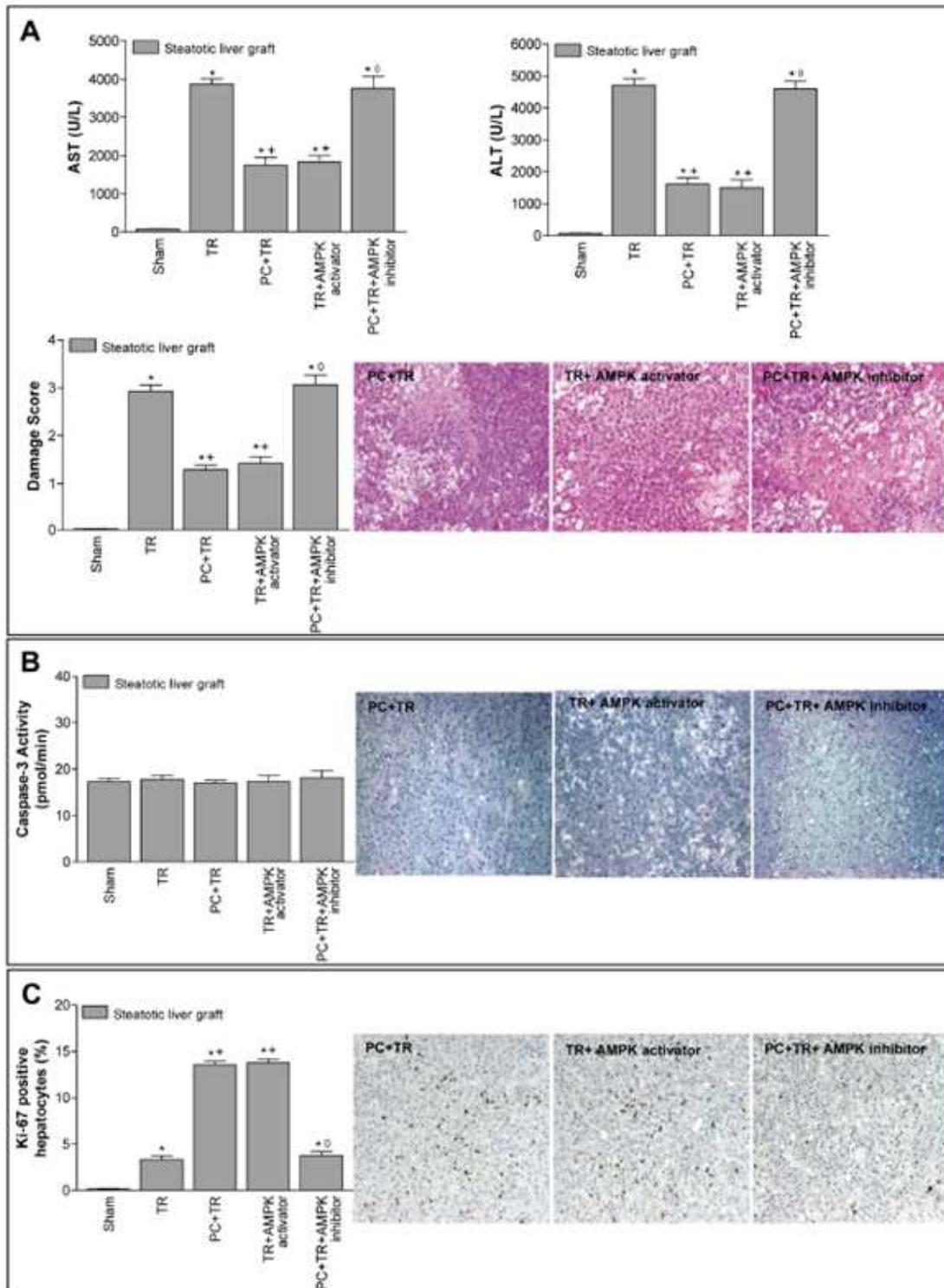
Supplementary Figure 2. Representative photographs of apoptotic hepatic cells in steatotic liver transplantation. Apoptosis was evaluated by TUNEL (10x).

Figura Suplementaria 3.



Supplementary Figure 3. Representative photographs of Ki-67-positive hepatocytes in steatotic liver transplantation. The number of Ki-67-positive hepatocytes was evaluated by Immunohistochemistry (10x).

Figura Suplementaria 4.



Supplementary Figure 4. Role of AMPK on hepatic injury and cell proliferation in steatotic liver transplantation. A) Transaminases levels, damage score and histological lesions, B) caspase 3 activity levels and TUNEL-apoptotic hepatic cells and C) percentage of Ki-67-positive hepatocytes and immunohistochemical staining of Ki-67-positive hepatocytes, (n=6 transplants per group in each measurement), (10x) \*P < 0.05 versus Sham, <sup>†</sup>P < 0.05 versus TR, <sup>#</sup>P < 0.05 versus PC+TR.

## *Discusión*

---

La lesión por I/R hepática, inherente al trasplante hepático, continúa siendo un problema sin resolver en la práctica clínica a pesar de los avances en los tratamientos farmacológicos, en mejoras de las soluciones de preservación y en el establecimiento de estrategias de terapia génica. En trasplante hepático, la I/R es la causa principal tanto del mal funcionamiento como del FPI hepático, siendo este último el responsable de 81% de los retrasplantes durante la primera semana tras la intervención quirúrgica. Y si esto ocurre en hígados sanos aun son mayores los casos de mal función o FPI hepático cuando el injerto es esteatósico, de ahí que la esteatosis sea la causa principal del mayor número de órganos considerados no aptos para el trasplante, acentuando así la problemática de la falta de injertos hepáticos para trasplante [17]. Se sabe que de todos los hígados patológicos que no se consideran aptos para trasplante, más del 50% no se consideran aptos por ser esteatósicos. Esto acentúa la problemática de la falta de órganos para trasplante. Además, se espera una mayor prevalencia de esteatosis en la población en general y por lo tanto en la cirugía hepática [102]. Teniendo en cuenta estas observaciones, es evidente la necesidad de desarrollar estrategias protectoras para minimizar los efectos adversos de la lesión por I/R en los hígados esteatósicos. Esto incidiría positivamente en mejores resultados post-trasplante, en una mayor disponibilidad de injertos hepáticos para trasplante y consecuentemente en una reducción en las listas de espera de pacientes que requieren un trasplante de hígado.

Diferentes estudios realizados en hígados no esteatósicos de donantes a corazón parado y sometidos a isquemia [291-293], y en modelos de hígado perfundido aislado [294] han descrito que estrategias que aumentan el AMPc pueden ser relevantes en el tratamiento de la lesión por I/R hepática. Sin embargo, los resultados aquí presentados indican que el AMPc no juega un papel crucial en la lesión inducida por I/R en los injertos hepáticos no esteatósicos sometidos a trasplante. Este tipo de hígado mostraron niveles de AMPc similares a los del grupo sham), y estrategias farmacológicas que modularon los niveles de AMPc no proporcionaron ninguna protección frente a la lesión hepática.

Además de lo anterior, aunque la inducción del PC protegió a los injertos hepáticos no esteatósicos frente a la lesión por I/R, sus beneficios no estuvieron asociados con cambios en los niveles de AMPc; lo cual indica un rol minoritario del AMPc en esta situación.

La utilidad de estrategias dirigidas a modular AMPc en el trasplante de hígados esteatósicos no se había determinado previamente. En la presente tesis se evidencian los efectos perjudiciales del AMPc en los injertos hepáticos esteatósicos y se sugiere la utilidad clínica de estrategias que

bloquean la acción del AMPc (tales como la inducción del PC o inhibidores de la adenilato ciclasa) en el trasplante de hígados esteatósicos. Sin embargo, el AMPc no es una buena diana terapéutica en el trasplante de injertos hepáticos no esteatósicos.

La presente tesis pone de manifiesto que el AMPc muestra efectos diferenciales sobre la lesión hepática en función de las condiciones quirúrgicas, tales como la inducción o no de paro cardiaco, diferentes tiempos de isquemia y presencia o no de esteatosis hepática [291-294]. Además es bien conocido que existen múltiples vías mediadas por el AMPc [290]; que los 2 receptores intracelulares del AMPc (proteína quinasa A y proteína de intercambio activada por AMPc) pueden mediar efectos opuestos del AMPc sobre la proteína quinasa B [297] y que el resultado de la señalización del AMPc depende de la abundancia y de la distribución dinámica de proteína de intercambio intracelular activada por AMPc y de la proteína quinasa A [290]. Todo esto podría explicar al menos parcialmente los roles divergentes del AMPc en la I/R hepática.

A continuación se explica el por qué una reducción en los niveles de AMPc inducida por un inhibidor de la adenilato ciclasa o el PC, protege a los injertos hepáticos esteatósicos frente a la lesión por I/R asociado al trasplante. Es bien conocido que la degradación del ATP durante la isquemia conduce a una aceleración de la glucólisis. Aunque la glucólisis es esencial para la supervivencia de la célula, también puede ser perjudicial debido a la acumulación de productos glucolíticos tales como el lactato [361]. Nuestros resultados indican que en el hígado, el aumento de los niveles de AMPc debido a la isquemia desencadenó la activación de la glucólisis. Esto causó la acumulación de las hexosas 6-fosfato, que proceden de la vía glucolítica y la consiguiente formación de lactato [361,394]. Se puede obtener tolerancia metabólica y funcional frente a la isquemia mediante intervenciones que eviten la pérdida de metabolitos críticos, tales como el ATP y limiten la glucólisis anaeróbica y la producción de lactato [361]. En la presente tesis se investigaron los efectos de las estrategias que bloquean el AMPc (inhibidores de la adenilato ciclasa e inducción del PC) sobre el metabolismo energético durante el período de isquemia fría. Los resultados obtenidos mostraron que el bloqueo del AMPc a través de un mecanismo independiente de NO, preservó el ATP y los nucleótidos de adenina a lo largo de la isquemia fría. Esta preservación del ATP, parece no estar relacionada con la producción de ATP a través de la glucólisis anaeróbica, ya que se observó una relación inversa entre el ATP y la actividad glucolítica (estimada por la acumulación de las hexosas 6-fosfato y la producción de lactato). En consecuencia, la preservación del ATP durante la isquemia fría inducida por los inhibidores del adenilato ciclasa o la inducción del PC pueden ser el resultado de una menor utilización del ATP.

En el contexto de la I/R hepática, el NO es un importante molécula protectora debido a su acción como vasodilatador, antioxidante y anti-neutrófilos [378,395,396]. Además, el NO es uno de los mediadores de los efectos beneficiosos del PC [125,231,238]. Sin embargo, el NO es perjudicial si se combina con los RLO ya que puede derivar en la formación de ONOO- [125]. Esto puede haber ocurrido en los injertos hepáticos esteatósicos del grupo del trasplante, ya que se observaron los siguientes factores: altos niveles de NO y de RLO y la presencia de ONOO-. Los efectos oxidativos

y citotóxicos del ONOO- están bien documentados [397,398]. El ONOO- reduce las defensas antioxidantes de las células, inactiva enzimas y modifica proteínas [399]. Se han descrito diferentes resultados acerca de los efectos del AMPc sobre el NO y los RLO en cultivos celulares en función del tipo celular y las condiciones experimentales evaluadas [295,297,400,401]. En las condiciones evaluadas en la presente tesis, inhibidores farmacológicos y quirúrgicos del AMPc (inhibidores de la adenilato ciclasa y la inducción del PC) aumentaron los niveles de NO y redujeron los niveles de RLO en los injertos hepáticos esteatósicos. Tales resultados fueron asociados con una reducción en los niveles de las nitrotirosinas. A pesar de los altos niveles del NO observados tras la aplicación del PC o la administración de inhibidores de la adenilato ciclasa, los niveles reducidos de RLO inducidos por ambas estrategias (los cuales fueron similares a los niveles registrados en un sham), fueron insuficientes para combinarse con el NO y formar ONOO-. Es bien sabido que el ONOO- sólo se forma cuando se producen niveles altos de ambos, NO y RLO [397,398] y esto no ocurre en nuestras condiciones. Nuestros resultados indicaron que las estrategias que bloquean la acción del AMPc, mediante la generación del NO, protegen los hígados esteatósicos frente al estrés oxidativo y el daño hepático. Tales beneficios de los inhibidores del AMPc desaparecieron si inhibimos la síntesis de NO. Los efectos del NO sobre el sistema generador de RLO (XDH/XOD) y el sistema antioxidante (GSH) podrían explicar los beneficios del NO sobre estrés oxidativo en injertos de hígado esteatósicos. De hecho, en injertos hepáticos esteatósicos sometidos a trasplante se han observado niveles reducidos de los sistemas antioxidantes y una alta producción de RLO generado por el sistema xantina/XOD. XOD juega un papel crucial en la lesión por I/R hepática, en condiciones en las que ocurre una conversión significativa de XDH a XOD (80%-90%) [402]. Esto sucedió en nuestras condiciones ya que el porcentaje de XOD en los injertos esteatósicos sometidos a trasplante fue de 90%. Trabajos realizados por nuestro grupo de investigación en el mismo modelo de trasplante hepático demostraron que la inhibición XOD con alopurinol previno la producción de ROS y protegió eficazmente a los injertos hepáticos esteatósicos frente al daño inducido por I/R, lo que indica la implicación de la XOD en la lesión hepática asociada al trasplante con injertos esteatósicos. Por lo tanto, cualquier mecanismo capaz de modular la conversión de XDH a XOD o la acumulación de sustrato de la XOD (xantina e hipoxantina) podría proteger los hígados esteatósicos frente al daño inducido por I/R. Es bien sabido que altos niveles de hipoxantina o de xantina están asociados a tasas de supervivencia bajas en injertos hepáticos sometidos a trasplante [403,404]. Los resultados de este estudio indican que estrategias farmacológicas y quirúrgicas que inhiben el AMPc (inhibidores de la adenilato ciclasa y la inducción del PC) generan NO, lo cual a su vez reduce el porcentaje de XOD en injertos esteatósicos, protegiendo así frente al estrés oxidativo. Además, la inhibición del AMPc inducida por ambas estrategias, y a través de una vía independiente del NO, reduce la acumulación de sustratos de la XOD. La preservación del GSH mediada por el NO también podría contribuir a atenuar los efectos perjudiciales de los RLO en el trasplante de hígados esteatósicos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, estrategias que inhiben el AMPc (inhibidores de la adenilato ciclasa y el PC), a través de un mecanismo dependiente del NO, protegen frente al daño celular endotelial y frente a los desórdenes microcirculatorios en el trasplante de injertos hepáticos esteatósicos, ya que reducen los niveles del ácido hialurónico, la permeabilidad microvascular y el

edema. Es bien conocido que la disfunción de la microcirculación es un importante evento en la lesión por I/R. Un indicador temprano de disfunción microvascular es el aumento en la permeabilidad microvascular que permite la extravasación de proteínas al espacio intersticial y trae consigo la formación de edema [405].

Los resultados del primer estudio de la presente tesis indican que en el trasplante hepático, las estrategias basadas en el bloqueo de AMPc podrían ser útiles sólo en presencia de esteatosis. En injertos hepáticos no esteatósicos, las estrategias farmacológicas que bloquean la acción del AMPc (SQ22536) no protegieron frente al daño y además el AMPc no es clave en los mecanismos de protección del PC. Los resultados expuestos en la tesis permiten explicar cómo tales estrategias protegen en presencia de esteatosis. Ralentizaron la degradación del ATP y limitaron la acumulación de lactato, lo que probablemente permitió a las células sobrevivir en condiciones adversas. Además, se demostró que los bloqueadores del AMPc generaron NO, el cual redujo la actividad de la XOD, preservó los sistemas de antioxidantes como el GSH, y protegió los injertos esteatósicos frente al daño de las células endoteliales y las disfunciones microcirculatorias asociadas al trasplante. Con respecto a las posibles aplicaciones clínicas, por una parte, tales estrategias aumentar la viabilidad de los injertos con reducida esteatosis que se someten a trasplante y presentan deficientes resultados post-operatorios. Por otro lado, podrían mejorar las condiciones iniciales de los injertos hepáticos con esteatosis severa, que no se consideran aptos para trasplante por sus condiciones patológicas, lo cual incidiría positivamente en una reducción en las listas de espera. Evidentemente se requieren futuros estudios para confirmar la viabilidad de estas estrategias basadas en el bloqueo del AMPc, especialmente en donantes inestables que hayan experimentado estrés secundario a hipotensión y vasopresores.

Siguiendo con los objetivos de la presente tesis a continuación se investigó si el TUDCA era capaz de proteger a los injertos hepáticos esteatósicos y no esteatósicos sometidos a trasplante después de 6 horas de preservación. Previamente a nuestros estudios, se habían descrito resultados indicando que el TUDCA era capaz de proteger a ambos tipos de injertos sometidos a 2 horas de preservación en solución HTK frente a la lesión por I/R asociada al trasplante mediante una reducción del estrés del RE. Sin embargo no se conocía si dichos efectos podrían ser extrapolables a injertos hepáticos esteatósicos y no esteatósicos sometidos a 6 horas de preservación fría (un tiempo comúnmente usado en la práctica clínica) en solución de UW (la solución estándar usada en trasplante hepático).

Los resultados obtenidos en la presente tesis, sugieren que el TUDCA puede jugar efectos protectores en trasplante hepático singénico y alogénico con injertos esteatósicos. En las condiciones evaluadas en esta tesis, no se observó estrés del RE en ambos tipos de injertos sometidos a 6 horas de isquemia fría. El TUDCA fue solamente efectivo en los injertos esteatósicos, pero sus beneficios no cursaron a través de una regulación en el estrés del RE. Por lo tanto, usar como diana terapéutica el estrés del RE, no sería de utilidad clínica en injertos esteatósicos preservados en solución UW durante 6 horas de isquemia fría.

Seguidamente se evaluaron los mecanismos moleculares implicados en los beneficios del TUDCA en trasplante con injertos esteatósicos. Nuestros resultados indicaron que los beneficios del TUDCA no se pueden explicar por una reducción en el estrés oxidativo. Por otra parte, el TUDCA redujo los niveles de PPAR $\gamma$  en injertos hepáticos esteatósicos y a través de este mecanismo protegió los injertos esteatósicos. De hecho, el pre-tratamiento con agonistas del PPAR $\gamma$  eliminó los efectos beneficiosos del TUDCA sobre la lesión hepática. Tales efectos se observaron tanto en trasplante hepático isogénico como alogénico. Atendiendo a estos resultados, se decidió analizar si la inhibición de PPAR $\gamma$  inducida por TUDCA afectaba la vía del TLR4 en los injertos hepáticos esteatósicos.

La inhibición de la acción del PPAR $\gamma$ , con un antagonista del PPAR $\gamma$ , aumentó la expresión de la vía del TLR4 dependiente de TRIF en injertos esteatósicos y redujo la lesión hepática. Al igual que los inhibidores del PPAR $\gamma$ , la administración de activadores de la vía del TLR4 protegió a los injertos esteatósicos frente a la lesión asociada al trasplante. Por otra parte, la activación de PPAR $\gamma$  eliminó los beneficios de TUDCA sobre la vía del TLR4 y sobre la lesión en injertos esteatósicos. Por lo tanto, estos resultados sugieren un nuevo mecanismo basado en la vía de señalización TUDCA-PPAR $\gamma$ -TLR4 en el trasplante hepático con injertos esteatósicos. Así pues, tanto en trasplante hepático singénico como alogénico con injertos esteatósicos, la administración de TUDCA inhibe PPAR $\gamma$  y esto se traduce en una activación de la vía del TLR4 (específicamente vía del TRIF) y consecuentemente en una protección frente a la lesión hepática.

A parte de los hallazgos mencionados anteriormente, los resultados de la presente tesis evidencian una reducción de la expresión de la proteína TLR4, dependiente de TRIF, en trasplante con injertos esteatósicos, mientras que no se observaron alteraciones en la vía MyD88. Futuras investigaciones centradas en el estudio de diferentes moléculas que juegan un papel clave en la regulación de la señalización de TLR4, como el supresor de señalización de citocina (SOCS)-1, SOCS-3 y la IL-1 asociada al receptor quinasa (IRAK)-M [406,407], deberán ser investigadas para dar respuesta a tales observaciones.

Numerosos estudios apuntan a los efectos perjudiciales del TLR4 en procesos de I/R, principalmente en injertos no esteatósicos [320,322-327]. En esta tesis se evidencian efectos beneficiosos de estrategias que aumenten los niveles de TLR4 en trasplante hepático isogénico y alogénico con injertos esteatósicos. Para entender estos resultados diferenciales hay que considerar que los agonistas del TLR4 y el TUDCA (que aumentó el TLR4) se administraron sólo en los donantes, antes del periodo de isquemia fría. Nuestros resultados estarían en línea con estudios anteriores en isquemia hepática normotérmica, indicando que la inducción de un preconditionamiento químico usando ligandos del TLR4 protege al hígado frente a los efectos adversos de una posterior I/R [407].

Nuestros estudios no explican el por qué la activación de la vía del TLR4 protege a los injertos hepáticos esteatósicos frente a la lesión por I/R asociado al trasplante. Para responder a esta pregunta, se deben considerar resultados previos obtenidos en células aisladas [406]. Estos estudios sugieren que un aumento en la actividad de la vía del TLR4 induce respuestas beneficiosas; como

por ejemplo, la inducción dependiente de IRF de los interferones de tipo 1 en hepatocitos y la interleuquina 10 en macrófagos.

En resumen, el TUDCA protegió a los injertos hepáticos esteatósicos preservados en solución de UW durante 6 horas y sometidos a trasplante, a través de un mecanismo de señalización independiente del estrés del RE. Los resultados obtenidos señalan nuevas propiedades del TUDCA y del TLR4 en el trasplante de hígados esteatósicos y establecen una relación entre TUDCA, PPAR $\gamma$  y TLR4. El TUDCA redujo los niveles de PPAR $\gamma$ , y esto activó la vía del TLR4, específicamente la vía del TRIF, protegiendo así a los injertos esteatósicos. Estos resultados indican nuevas posibilidades de intervenciones terapéuticas basadas en la activación de la señalización del TLR4 para proteger a los injertos hepáticos esteatósicos frente al daño asociado al trasplante. Tales estrategias podrían mejorar los resultados post-operatorios de los pacientes sometidos a resecciones hepáticas o a trasplante y aumentar el número de órganos disponibles para el trasplante. Sin embargo, antes de establecer la utilidad de la vía del TLR4 como una diana terapéutica, existen varios puntos a tener en cuenta. Los efectos del TLR4 difieren en función de las condiciones quirúrgicas. Por lo tanto, si bien se requiere inhibir la acción del TLR4 para proteger el hígado en condiciones de isquemia normotérmica, es necesario activar la vía del TLR4 para proteger a los injertos hepáticos esteatósicos sometidos a trasplante. Además, la respuesta de TLR4 puede variar e implicar a diferentes vías de transducción de señales en función del procedimiento quirúrgico y que actualmente son desconocidas.

Siguiendo con los objetivos de la presente tesis, se investigó el papel de la adipocitoquinas tales como la adiponectina, resistina y visfatina en la lesión por I/R en el trasplante hepático con injertos esteatósicos y no esteatósicos. Es bien conocido que la esteatosis y la inflamación en diferentes patologías hepáticas está asociada con alteraciones en la regulación de la producción de adipocitoquinas, incluyendo la adiponectina, la resistina y la visfatina [408].

A diferencia del papel clave de la visfatina en diferentes enfermedades inflamatorias [347-349], en la presente tesis se evidencia por vez primera que la visfatina no está implicada en la vulnerabilidad de los hígados esteatósicos frente a la lesión por I/R en el trasplante hepático ni en los beneficios de la adiponectina en el trasplante de hígados esteatósicos. De hecho, en nuestras condiciones quirúrgicas, los niveles de proteína y de mRNA de la visfatina después del trasplante fueron similares a los encontrados en el grupo Sham. Por el contrario, los hígados esteatósicos estuvieron más predispuestos a una reducción tanto de la adiponectina, como de la resistina cuando se sometieron a trasplante, presumiblemente debido a un deterioro en la producción hepática de estas adipocitoquinas. De hecho, este resultado está en consonancia con estudios previos en los que se señala que la producción de las adipocitoquinas disminuye en condiciones de estrés, tanto a nivel de la proteína como de mRNA [367].

Estrategias farmacológicas dirigidas a modular la adiponectina, fueron irrelevantes para los injertos hepáticos no esteatósicos sometidos a 6 horas de isquemia fría. Por otra parte, los resultados de la

presente tesis indican que se debe activar la vía de señalización de la adiponectina para proteger los injertos hepáticos esteatósicos frente al daño asociado al trasplante.

A diferencia de otros estudios que describen la resistina como una adipocitoquina responsable de la inflamación hepática asociada a diferentes patologías [345,346,409,410], en esta tesis se describe por primera vez que el pre-tratamiento con resistina podría ser una estrategia útil para reducir la vulnerabilidad de los hígados esteatósicos sometidos a trasplante. Notoriamente, esta estrategia sería de utilidad específicamente en presencia de esteatosis, pero sería irrelevante en injertos no esteatósicos.

Establecemos una posible vía de señalización basada en la relación entre adiponectina y resistina en el trasplante de hígados esteatósicos. Datos experimentales indican que una dieta crónica alta en grasas disminuye los niveles plasmáticos de la adiponectina y aumenta los niveles de resistina, señalando una correlación negativa entre ambas adipocitoquinas [411]. Sin embargo, en pacientes obesos con esteatohepatitis no alcohólica, no se ha descrito ninguna correlación entre la adiponectina y resistina [411,412]. A diferencia de estos datos, los resultados descritos en esta tesis, indican que la adiponectina podría ser un regulador positivo de la resistina en injertos hepáticos esteatósicos sometidos a trasplante. En línea con lo anterior, el pre-tratamiento con adiponectina aumentó la resistina en los injertos hepáticos esteatósicos, lo cual a su vez protegió frente al daño por I/R. Si inhibimos la resistina, desaparecen los beneficios de la adiponectina. Finalmente, la reducción en los parámetros de daño hepático que se obtuvieron tras el tratamiento con resistina confirman los beneficios de esta adipocitoquina en los hígados esteatósicos sometidos a trasplante.

En base a resultados previos obtenidos en corazón [354], se evaluó si la activación de la resistina inducida por la adiponectina podría modificar la vía PI3K/Akt en injertos hepáticos esteatósicos. Es importante destacar que la vía de señalización de PI3K/Akt juega un papel crucial en la supervivencia celular [17,414]. Los resultados experimentales obtenidos indicaron que el tratamiento con adiponectina o resistina activó la vía de supervivencia celular PI3K/Akt en injertos hepáticos esteatósicos. Por otra parte, el bloqueo de la resistina eliminó los efectos de la adiponectina sobre la vía del PI3K/Akt. Esto sugiere un nuevo mecanismo basado en la regulación de PI3K/Akt para explicar por qué la activación de la resistina inducida por la adiponectina protege los injertos de hígado esteatósicos.

Mientras que estudios previos indican que la adiponectina activa AMPK en el hígado [415,416], los resultados aquí presentados señalan una relación inversa, ya que la activación del AMPK (inducida por el PC o administración de AICAR) aumentó la adiponectina en injertos hepáticos esteatósicos. Esto a su vez, aumentó la generación de resistina, activó la vía PI3K/Akt y protegió a los hígados esteatósicos frente a la lesión asociada al trasplante.

A la luz de lo expuesto anteriormente, estrategias farmacológicas dirigidas a modular la adiponectina y resistina serán irrelevantes en hígados no esteatósicos sometidos a trasplante. Sin embargo, esto no podría no ocurrir en presencia de esteatosis. Los injertos hepáticos esteatósicos están más predisuestos a una reducción en los niveles de adiponectina y resistina al someterlos a

trasplante y el tratamiento con adiponectina o resistina los protegió. Los resultados obtenidos señalan que la adiponectina aumenta los niveles de resistina y esto a su vez favorece la activación de la vía PI3K/Akt, protegiendo así a los injertos hepáticos esteatósicos. En términos de una aplicación clínica, fármacos capaces de regular la adiponectina y la resistina, tienen el potencial de aumentar el pool de órganos disponibles para el trasplante, ya que podrían mejorar los resultados postoperatorios de injertos hepáticos esteatósicos de moderada o severa esteatosis que de otro modo no serían trasplantados por sus condiciones patológicas.

Desde el punto de vista de una posible aplicación clínica, los hallazgos descritos en la presente tesis pueden abrir nuevas posibilidades para la intervención terapéutica en el trasplante hepático, específicamente en el caso de los injertos hepáticos esteatósicos. Esto reviste gran importancia ya que es bien conocido que se espera un aumento en la prevalencia de los hígados esteatósicos en la cirugía hepática y que este tipo de hígados supone un riesgo añadido en la cirugía hepática ya que estos hígados toleran peor que los no esteatósicos la lesión por I/R. Además, la esteatosis hepática agrava el problema de la falta de órganos ya que se sabe que la esteatosis es la causa del mayor número de órganos no aptos para trasplante. El AMPc, el TLR4, la adiponectina y la resistina serían dianas de posible acción terapéutica en el trasplante de injertos hepáticos esteatósicos. En la presente tesis se demostró que al inhibir el AMPc se protege a los injertos hepáticos esteatósicos sometidos a trasplante. La segunda diana terapéutica se basa en la activación del TLR4 y de la misma manera también se demostró que tratamientos terapéuticos basados en aumentar los niveles de adiponectina y resistina, protegen a los injertos hepáticos esteatósicos. En la presente tesis se han establecido además nuevas vías de señalización en el trasplante hepático con injerto esteatósico y específicas para este tipo de injertos (**Figura 24**). El tratamiento con un agente que bloquea el AMPc, a través del NO, redujo el estrés oxidativo, el daño celular endotelial y la disfunción microvascular. Además, este mismo tratamiento a través de una vía independiente del NO, ralentiza la degradación de ATP y limita la acumulación de lactato, lo cual se traduce en una mejor viabilidad del injerto y supervivencia del receptor tras el trasplante. La administración de TUDCA, antagonistas del PPAR $\gamma$  o agonistas del TLR4, activaron la vía del TLR4 (dependiente del TRIF), lo cual protegió a los injertos hepáticos esteatósicos. En la presente tesis también se describió un nuevo mecanismo de protección del TUDCA no descrito con anterioridad que es el siguiente: el TUDCA redujo PPAR $\gamma$  y esto a su vez activó la vía del TLR4. Por último, la administración de adiponectina o resistina, mediante la activación de la vía PI3K/Akt, redujo el daño hepático en hígados esteatósicos sometidos a trasplante. En la presente tesis también se describieron nuevos mecanismos de señalización subyacentes a los efectos beneficiosos del PC en injertos esteatósicos sometidos a trasplante hepático. Esta estrategia quirúrgica redujo la lesión hepática por I/R en injertos esteatósicos sometidos a trasplante mediante la inhibición del AMPc. Esto indujo los mismos efectos sobre el NO, estrés oxidativo, daño celular endotelial, disfunción microvascular y metabolismo energético que los inhibidores farmacológicos del AMPc. Además de lo anterior, el PC, mediante la activación de AMPK, es capaz de generar adiponectina, la cual induce la acumulación de resistina para activar finalmente la vía PI3K/Akt.

En conclusión, las terapias descritas en la presente tesis podrían mejorar las condiciones iniciales de los injertos hepáticos con esteatosis leve que se someten a trasplante pero que presentan deficientes resultados post-operatorios y podrían aumentar la disponibilidad de numerosos injertos esteatósicos que en la actualidad no son considerados aptos para trasplante por sus condiciones patológicas, reduciendo así la problemática en las listas de espera en trasplante hepático. Estos hallazgos también pueden contribuir a nuevas aplicaciones del PC en la práctica clínica del trasplante hepático especialmente en el caso de los injertos hepáticos esteatósicos donde ya se han descrito los primeros resultados clínicos promisorios. Por un lado, los mecanismos del PC que se han descrito en la presente tesis refuerzan su papel como estrategia protectora y por el otro, se muestra al PC como una estrategia quirúrgica sencilla que puede ejercer los mismos efectos beneficiosos que las diferentes estrategias farmacológicas propuestas.

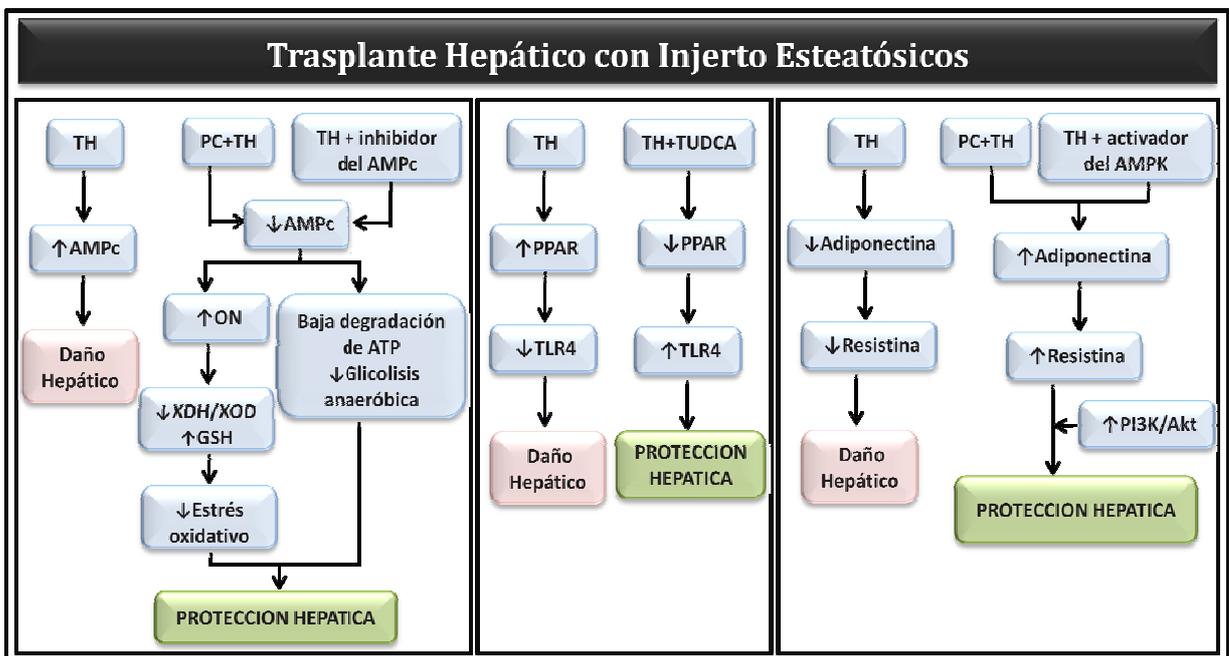


Figura 24. Nuevas vías de señalización en el trasplante hepático con injerto esteatósico



# *Conclusiones*

---

Las conclusiones de la presente tesis son las siguientes:

1. El AMPc desempeña un papel perjudicial en la lesión por I/R hepática asociada al trasplante de injertos hepáticos esteatósicos, mientras que este segundo mensajero juega un papel irrelevante en injertos hepáticos no esteatósicos sometidos a trasplante.
2. Las estrategias farmacológicas encaminadas a inhibir el AMPc (tales como la inducción del PC o el tratamiento con inhibidores de la adenilato ciclasa), protegen a los injertos hepáticos esteatósicos frente a la lesión por I/R asociada al trasplante y son específicas para este tipo de injertos. Esta protección-mediada por el NO-reduce el estrés oxidativo, el daño celular endotelial y las disfunciones microvasculares. Los beneficios de tales estrategias sobre el metabolismo energético en injertos esteatósicos son independientes del NO.
3. El TUDCA es capaz de proteger sólo a los injertos hepáticos esteatósicos mediante un mecanismo independiente del estrés del retículo endoplasmático. Los mecanismos de protección del TUDCA cursan mediante una reducción en la expresión de PPAR $\gamma$ , lo cual a su vez activa la vía del TLR4, específicamente la vía del TRIF para proteger a los injertos esteatósicos frente a la lesión asociada al trasplante.
4. Los injertos hepáticos esteatósicos están más predispuestos a una reducción en los niveles de adiponectina y resistina al someterlos a trasplante que los no esteatósicos. El tratamiento con adiponectina o resistina protege a los injertos esteatósicos frente a la vulnerabilidad que presentan a la lesión inducida por I/R mientras que es ineficaz en injertos no esteatósicos.
5. Las estrategias terapéuticas capaces de activar el AMPK (tales como la inducción del PC o el tratamiento con activadores de la AMPK) aumentan la síntesis de adiponectina, la cual a su vez genera resistina en injertos esteatósicos. La activación de la vía PI3K/Akt inducida por la resistina protege a los injertos esteatósicos sometidos a trasplante.
6. Se han descrito estrategias farmacológicas (inhibidores del AMPc, TUDCA, agonistas del TLR4, adiponectina y resistina) que son específicas para proteger a los injertos hepáticos esteatósicos sometidos a trasplante, y se refuerza el papel del PC como una estrategia

quirúrgica promisoría que puede ejercer los mismos efectos protectores que las estrategias farmacológicas propuestas.

## *Bibliografía*

---

1. Tratado de Histología, 12ª edición. Fawcett D.D., Editor. McGraw-Hill Interamericana Editorial, Madrid, 1997.
2. Diseases of the liver and biliary system, 11<sup>th</sup> edition. Sherlock S. and Dooley J., Editores. Blackwell Publishing Editorial, Oxford, 2002.
3. Hepatology, a textbook of liver disease, 4<sup>th</sup> edition. Zakim D. and Boyer T., Editores. Saunders Editorial, Philadelphia, 2003.
4. Nieto N., Friedman S.L., Cederbaum A.I. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 2002;35(1):62-73.
5. Devlin J., O'Grady J. Indications for referral and assessment in adult liver transplantation: a clinical guideline. British Society of Gastroenterology. *Gut* 1999;45 Suppl 6:VI1-VI22.
6. Adam R., McMaster P., O'Grady J.G., Castaing D., Klempnauer J.L., Jamieson N., Neuhaus P., Lerut J., Salizzoni M., Pollard S., Muhlbacher F., Rogiers X., Garcia Valdecasas J.C., Berenguer J., Jaeck D., Moreno Gonzalez E. European Liver Transplant Association. Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl* 2003;9(12):1231-1243.
7. Haberal M., Dalgic A. New concepts in organ transplantation. *Transplant Proc* 2004;36(5):1219-1224.
8. Schulak J.A. What's new in general surgery: transplantation. *J Am Coll Surg* 2005;200(3):409-417.
9. Fondevila C., Jiménez-Galanes S., García-Valdecasas J.C. [How can the number of liver transplantations be increased?]. *Gastroenterol Hepatol* 2009;32(7):519-530.
10. Neuberger J. Developments in liver transplantation. *Gut* 2004;53(5):759-768.
11. Montalti R., Nardo B., Bertelli P., Beltempo P., Puviani L., Vivarelli M., Cavallari A. Donor pool expansion in liver transplantation. *Transplant Proc* 2004;36(3):520-522.
12. Grande L., Matus D., Manyalic M., Cabrer C., Rodriguez-Montalvo C., Rimola A., Navasa M., Garcia-Valdecasas J.C., Visa J. Effect of donor age on graft outcome after liver transplantation. *Transplant Proc* 1999;31(6):2482-2483.
13. Jiménez Romero C., Moreno González E., Colina Ruíz F., Palma Carazo F., Loinaz Seguro C., Rodríguez González F., González Pinto I., García García I., Rodríguez Romano D., Moreno Sanz C. Use of octogenarian livers safely expands the donor pool. *Transplantation* 1999;68(4):572-575.
14. Keswani R.N., Ahmed A., Keeffe E.B. Older age and liver transplantation: a review. *Liver Transpl* 2004;10(8):957-967.
15. Melendez H.V., Heaton N.D. Understanding "marginal" liver grafts. *Transplantation* 1999;68(4):469-471.
16. Loinaz C., González E.M. Marginal donors in liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2000;47(31):256-263.
17. Casillas-Ramírez A., Mosbah I.B., Ramalho F., Roselló-Catafau J., Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci* 2006;79(20):1881-1194.

18. D'Alessandro A.M., Hoffmann R.M., Knechtle S.J., Eckhoff D.E., Love R.B., Kalayoglu M., Sollinger H.W., Belzer F.O. Successful extrarenal transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1995;59(7):977-982.
19. Casavilla A., Ramirez C., Shapiro R., Nghiem D., Miracle K., Bronsther O., Randhawa P., Broznick B., Fung J.J., Starzl T. Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1995;59(2):197-203.
20. D'alessandro A.M., Hoffmann R.M., Knechtle S.J., Odorico J.S., Becker Y.T., Musat A., Pirsch J.D., Sollinger H.W., Kalayoglu M. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors. *Surgery* 2000;128(4):579-588.
21. Shiroki R., Hoshinaga K., Horiba M., Izumitani M., Tsukiashi Y., Yanaoka M., Naide Y., Kanno T. Favorable prognosis of kidney allografts from unconditioned cadaveric donors whose procurement was initiated after cardiac arrest. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):1388-1389.
22. Cho Y.W., Terasaki P.I., Cecka J.M. High kidney graft survival rates using non-heart-beating trauma donors. *Transplant Proc* 1998;30(7):3795-3796.
23. Hattori R., Ohshima S., Ono Y., Fujita T., Kinukawa T., Matsuura O. Long-term outcome of kidney transplants from non-heart-beating donors: multivariate analysis of factors affecting graft survival. *Transplant Proc* 1999;31(7):2847-2850.
24. Light J.A., Barhyte D.Y., Gage F.A., Sasaki T.M., Aquino A.O. Long-term graft survival after transplantation with kidneys from uncontrolled nonheartbeating donors. *Transplantation* 1999;68(12):1910-1911.
25. Abt P., Crawford M., Desai N., Markmann J., Olthoff K., Shaked A. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors: an increased incidence of biliary complications. *Transplantation* 2003;75(10):1659-1663.
26. Cooper J.T., Chin L.T., Krieger N.R., Fernandez L.A., Foley D.P., Becker Y.T., Odorico J.S., Knechtle S.J., Kalayoglu M., Sollinger H.W., D'Alessandro A.M. Donation after cardiac death: the university of wisconsin experience with renal transplantation. *Am J Transplant* 2004;4(9):1490-1494.
27. Manzarbeitia C.Y., Ortiz J.A., Jeon H., Rothstein K.D., Martinez O., Araya V.R., Munoz S.J., Reich D.J. Long-term outcome of controlled, non-heart-beating donor liver transplantation. *Transplantation* 2004;78(2):211-215.
28. Reddy S., Zilveti M., Brockmann J., McLaren A., Friend P. Liver transplantation from non-heart-beating donors: current status and future prospects. *Liver Transpl* 2004;10(10):1223-1232.
29. Raia S., Nery J.R., Mies S. Liver transplantation from live donors. *Lancet* 1989;2(8661):497.
30. Yamaoka Y., Washida M., Honda K., Tanaka K., Mori K., Shimahara Y., Okamoto S., Ueda M., Hayashi M., Tanaka A., et al. Liver transplantation using a right lobe graft from a living related donor. *Transplantation* 1994;57(7):1127-1130.
31. Broelsch C.E., Whittington P.F., Emond J.C., Heffron T.G., Thistlethwaite J.R., Stevens L., Piper J., Whittington S.H., Lichtor J.L. Liver transplantation in children from living related donors. Surgical techniques and results. *Ann Surg* 1991;214(4):428-439.
32. Marcos A., Fisher R.A., Ham J.M., Shiffman M.L., Sanyal A.J., Luketic V.A., Sterling R.K., Posner M.P. Right lobe living donor liver transplantation. *Transplantation* 1999;68(6):798-803.
33. Otte J.B., de Ville de Goyet J., Reding R., Van Obbergh L., Veyckemans F., Carlier M.A., De Kock M., Clement de Clety S., Clapuyt P., Sokal E., Lerut J., Delbeke I., Dierick V., Janssen M., Rosati R., Libert F. Pediatric liver transplantation: from the full-size liver graft to reduced, split, and living related liver transplantation. *Pediatr Surg Int* 1998;13(5-6):308-318.
34. Tanaka K., Uemoto S., Tokunaga Y., Fujita S., Sano K., Nishizawa T., Sawada H., Shirahase I., Kim H.J., Yamaoka Y., et al. Surgical techniques and innovations in living related liver transplantation. *Ann Surg* 1993;217(1):82-91.
35. Ozawa K., Uemoto S., Tanaka K., Kumada K., Yamaoka Y., Kobayashi N., Inamoto T., Shimahara Y., Mori K., Honda K., et al. An appraisal of pediatric liver transplantation from living relatives. Initial clinical experiences in 20 pediatric liver transplantations from living relatives as donors. *Ann Surg* 1992;216(5):547-553.

36. García-Valdecasas J.C., Fuster J., Fondevila C., Calatayud D. [Adult living-donor liver transplantation]. *Gastroenterol Hepatol* 2009;32(8):577-583.
37. Busuttill R.W., Goss J.A. Split liver transplantation. *Ann Surg* 1999;229(3):313-321.
38. Sauer I.M., Pascher A., Steinmuller T., Settmacher U., Muller A.R., Bechstein W.O., Neuhaus P. Split liver and living donation liver transplantation: the Berlin experience. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):1459-1460.
39. Bismuth H., Houssin D. Reduced-sized orthotopic liver graft in hepatic transplantation in children. *Surgery* 1984;95(3):367-370.
40. Inomata Y., Nakamura T., Uemoto S., Tanaka K., Wakabayashi G., Shimazu M. Domino split-liver transplantation from a living donor: case reports of in situ and ex situ splitting. *Liver Transpl* 2001;7(2):150-153.
41. Azoulay D., Samuel D., Castaing D., Adam R., Adams D., Said G., Bismuth H. Domino liver transplants for metabolic disorders: experience with familial amyloidotic polyneuropathy. *J Am Coll Surg* 1999;189(6):584-593.
42. Schmidt H.H., Nashan B., Propsting M.J., Nakazato M., Flemming P., Kubicka S., Boker K., Pichlmayr R., Manns M.P. Familial Amyloidotic Polyneuropathy: domino liver transplantation. *J Hepatol* 1999;30(2):293-298.
43. Monteiro E., Perdigoto R., Furtado A.L. Liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy. *Hepatogastroenterology* 1998;45(23):1375-1380.
44. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004;39(6):1477-1487.
45. Koneru B., Tzakis A.G., Bowman J., Cassavilla A., Zajko A.B., Starzl T.E. Postoperative surgical complications. *Gastroenterol Clin North Am* 1988;17(1):71-91.
46. Friend P.J., Lim S., Smith M., Jamieson N.V., Rolles K., O'Grady J., Williams R., Calne R.Y. Liver transplantation in the Cambridge/King's College Hospital series—the first 400 patients. *Transplant Proc* 1989;21(1 Pt 2):2397-2398.
47. Clavien P.A., Harvey P.R., Strasberg S.M. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992 May;53(5):957-978.
48. Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol* 1996;25(5):774-780.
49. Selzner M., Clavien P.A. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin Liver Dis* 2001;21(1):105-113.
50. Koneru B., Dikdan G. Hepatic steatosis and liver transplantation current clinical and experimental perspectives. *Transplantation* 2002;73(3):325-330.
51. Trevisani F, Colantoni A, Caraceni P and Van Thiel DH. The use of donor fatty liver for transplantation: a challenge or a quagmire? *J Hepatol* 1996;24(1):114-121.
52. Urena M.A., Moreno Gonzalez E., Romero C.J., Ruiz-Delgado F.C., Moreno Sanz C. An approach to the rational use of steatotic donor livers in liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 1999;46(26):1164-1173.
53. Ploeg R.J., D'Alessandro A.M., Knechtle S.J., Stegall M.D., Pirsch J.D., Hoffmann R.M., Sasaki T., Sollinger H.W., Belzer F.O., Kalayoglu M. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation—a multivariate analysis. *Transplantation* 1993;55(4):807-813.
54. Marsman W.A., Wiesner R.H., Rodriguez L., Batts K.P., Porayko M.K., Hay J.E., Gores G.J., Krom R.A. Use of fatty donor liver is associated with diminished early patient and graft survival. *Transplantation* 1996;62(9):1246-1251.
55. Kerrigan C.L., Stotland M.A. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery* 1993;14(3):165-175.
56. Teoh N.C., Farrell G.C. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18(8):891-902.
57. Selzner N., Rudiger H., Graf R., Clavien P.A. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003;125(3):917-936.

58. Mor E., Klintmalm G.B., Gonwa T.A., Solomon H., Holman M.J., Gibbs J.F., Watemberg I., Goldstein R.M., Husberg B.S. The use of marginal donors for liver transplantation. A retrospective study of 365 liver donors. *Transplantation* 1992;53(2):383-386.
59. Figueras J., Busquets J., Grande L., Jaurrieta E., Perez-Ferreiroa J., Mir J., Margarit C., Lopez P., Vazquez J., Casanova D., Bernardos A., De-Vicente E., Parrilla P., Ramon J.M., Bou R. The deleterious effect of donor high plasma sodium and extended preservation in liver transplantation. A multivariate analysis. *Transplantation* 1996;61(3):410-413.
60. Paulsen A.W., Brajtbord D., Klintmalm G.B., Ramsay M.A., Valek T.R., Swygart T.H. Intraoperative measurements related to subsequent hepatic graft failure. *Transplant Proc.* 1989;21(1 Pt 2):2337-8.
61. Mimeault R., Grant D., Ghent C., Duff J., Wall W. Analysis of donor and recipient variables and early graft function after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1989;21(2):3355.
62. Neidecker J., Faure J.L., Champetier P., Takvorian P., Landraud R., Delafosse B. Does end-tidal CO<sub>2</sub> pressure (PETCO<sub>2</sub>) reflect hepatic metabolism during orthotopic liver transplantation (OLT)? *Transplant Proc* 1989;21(1 Pt 2):2339-2340.
63. Ohkohchi N., Sakurada M., Endoh T., Koyamada M., Katoh H., Koizumi M., Orii T., Satomi S., Taguchi Y., Mori S. Role of free radicals and energy synthesis on primary graft nonfunction in liver transplantation. *Transplant Proc* 1991;23(5):2416-2419.
64. Busuttill R.W., Farmer D.G., Yersiz H., Hiatt J.R., McDiarmid S.V., Goldstein L.I., Saab S., Han S., Durazo F., Weaver M., Cao C., Chen T., Lipshutz G.S., Holt C., Gordon S., Gornbein J., Amersi F., Ghobrial R.M. Analysis of long-term outcomes of 3200 liver transplantations over two decades: a single-center experience. *Ann Surg* 2005;241(6):905-918.
65. Vrochides D., Hassanain M., Barkun J., Tchervenkov J., Paraskevas S., Chaudhury P., Cantarovich M., Deschenes M., Wong P., Ghali P., Chan G., Metrakos P. Association of preoperative parameters with postoperative mortality and long-term survival after liver transplantation. *Can J Surg* 2011;54(2):101-106.
66. Goto M., Takei Y., Kawano S., Tsuji S., Fukui H., Fushimi H., Nishimura Y., Kashiwagi T., Fusamoto H., Kamada T. Tumor necrosis factor and endotoxin in the pathogenesis of liver and pulmonary injuries after orthotopic liver transplantation in the rat. *Hepatology* 1992;16(2):487-493.
67. Yost C.S., Matthay M.A., Gropper M.A. Etiology of acute pulmonary edema during liver transplantation: a series of cases with analysis of the edema fluid. *Chest* 2001;119(1):219-223.
68. Casillas-Ramírez A., Mosbah I.B., Franco-Gou R., Rimola A., Roselló-Catafau J., Peralta C. [Ischemia-reperfusion syndrome associated with liver transplantation: an update]. *Gastroenterol Hepatol* 2006;29(5):306-313.
69. Cutrin J.C., Boveris A., Zingaro B., Corvetti G., Poli G. In situ determination by surface chemiluminescence of temporal relationships between evolving warm ischemia-reperfusion injury in rat liver and phagocyte activation and recruitment. *Hepatology* 2000;31(3):622-632
70. Jaeschke H., Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991;260(3 Pt 1):G355-G362.
71. Jaeschke H., Bautista A.P., Spolarics Z., Spitzer J.J. Superoxide generation by Kupffer cells and priming neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic Res Commun* 1991;15(5):277-284.
72. Jaeschke H. Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem Biol Interact* 1991;79(2):115-136.
73. Kanno M., Ohkohchi N., Terashima T., Seya K., Taguchi Y., Mori S., Inaba H. Lipid peroxidation of parenchymal hepatocytes during cold preservation and after reoxygenation in rats. *Transplant Proc* 1993;25:2716-2721.
74. Horrobin D.F. Is the main problem in free radical damage caused by radiation, oxygen and other toxins the loss of membrane essential fatty acids rather than the accumulation of toxic materials?. *Med Hypotheses* 1991;35:23-26

75. Park C.S., Ahn M.S., Kang J.H., Chung W.G., Kim D.J., Hwang H.K., Lee J.N., Paik S.G., Cha Y.N. Differential and constitutive expression of neuronal, inducible and endothelial nitric oxide synthase mRNAs and proteins in pathologically normal human tissues. *Nitric Oxide* 2000;4:459-471.
76. Shah V., Haddad F.G., Garcia-Cardena G., Frangos J.A., Mennone A., Grozmann R.J., Sessa W.C. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest* 1997;100:2923-2930.
77. Taylor B.S., de Vera M.E., Ganster R.W., Wang Q., Shapiro R.A., Morris S.M., Billiar T.R., Geller D.A. Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1998;273:15148-15156.
78. Geller D.A., Di Silvio M., Nussler A.K., Wang S.C., Shapiro R.A., Simmons R.L., Billiar T.R. Nitric oxide synthase expression is induced in hepatocytes in vivo during hepatic inflammation. *J Surg Res* 1993;55:427-432.
79. Peralta C., Jiménez-Castro M.B., Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol* 2013;59:1094-1106.
80. Yoshidome H., Kato A., Edwards M.J., Lentsch A.B. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology* 1999;30(1):203-208.
81. Yagihashi A., Hirata K., Zou X.M., Tsuruma T., Araya J., Yajima T., Kameshima H., Yanai Y., Nakamura M., Wada Y., Asanuma K., Watanabe N. Downregulation of cytokine-induced neutrophil chemoattractants and reduction of reperfusion injury in liver allograft by interleukin-10. *Transplant Proc* 2000;32(7):2302.
82. Donckier V., Loi P., Closset J., Nagy N., Quertinmont E., Le Moine O., Deviere J., Goldman M., Gelin M., Gianello P. Preconditioning of donors with interleukin-10 reduces hepatic ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in pigs. *Transplantation* 2003;75(6):902-904.
83. Camargo C.A., Madden J.F., Gao W., Selvan R.S., Clavien P.A. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 1997;26(6):1513-1520.
84. Selzner M., Camargo C.A., Clavien P.A. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6. *Hepatology* 1999;30(2):469-475.
85. Que X., Debonera F., Xie J., Furth E.E., Aldeguer X., Gelman A.E., Olthoff K.M. Pattern of ischemia reperfusion injury in a mouse orthotopic liver transplant model. *J Surg Res* 2004;116(2):262-268.
86. Rudiger H.A., Clavien P.A. Tumor necrosis factor alpha, but no Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002;122(1):202-210.
87. Shibuya H., Ohkohchi N., Tsukamoto S., Satomi S. Tumor necrosis factor-induced, superoxide-mediated neutrophil accumulation in cold ischemic/reperfused rat liver. *Hepatology* 1997;26(1):113-120.
88. Shito M., Wakabayashi G., Ueda M., Shimazu M., Shirasugi N., Endo M., Mukai M., Kitajima M. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* 1997;63(1):143-148.
89. Cursio R., Filippa N., Miele C., Van Obberghen E., Gugenheim J. Involvement of protein kinase B and mitogen-activated protein kinases in experimental normothermic liver ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 2006;93(6):752-761.
90. Massip-Salcedo M., Casillas-Ramirez A., Franco-Gou R., Bartrons R., Ben Mosbah I., Serafin A., Roselló-Catafau J., Peralta C. Heat shock proteins and mitogen-activated protein kinases in steatotic livers undergoing ischemia-reperfusion: some answers. *Am J Pathol* 2006;168(5):1474-1485.
91. Massip-Salcedo M., Zaouali M.A., Padrisa-Altés S., Casillas-Ramirez A., Rodés J., Roselló-Catafau J., Peralta C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha inhibits the injurious effects of adiponectin in rat steatotic liver undergoing ischemia-reperfusion. *Hepatology* 2008;47(2):461-472.

92. Yoshinari D., Takeyoshi I., Kobayashi M., Koyama T., Iijima K., Ohwada S., Matsumoto K., Morishita Y. Effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor as an additive to university of wisconsin solution on reperfusion injury in liver transplantation. *Transplantation* 2001;72(1):22-27.
93. Liang T., Xu S., Yu J., Shen K., Li D., Zheng S. Activation pattern of mitogen-activated protein kinases in early phase of different size liver isografts in rats. *Liver Transpl* 2005;11(12):1527-1532.
94. Kobayashi M., Takeyoshi I., Yoshinari D., Matsumoto K., Morishita Y. P38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Surgery* 2002;131(3):344-349.
95. King L.A., Toledo A.H., Rivera-Chavez F.A., Toledo-Pereyra L.H. Role of p38 and JNK in liver ischemia and reperfusion. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009;16(6):763-770.
96. Amersi F., Shen X.D., Anselmo D., Melinek J., Iyer S., Southard D.J., Katori M., Volk H.D., Busuttill R.W., Buelow R., Kupiec-Weglinski J.W. Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway. *Hepatology* 2002;35(4):815-823.
97. Kiemer A.K., Kulhanek-Heinze S., Gerwig T., Gerbes A.L., Vollmar A.M. Stimulation of p38 MAPK by hormonal preconditioning with atrial natriuretic peptide. *World J Gastroenterol* 2002;8(4):707-711.
98. Kobayashi K., Oshima K., Muraoka M., Akao T., Totsuka O., Shimizu H., Sato H., Tanaka K., Konno K., Matsumoto K., Takeyoshi I. Effect of atrial natriuretic peptide on ischemia-reperfusion injury in a porcine total hepatic vascular exclusion model. *World J Gastroenterol* 2007;13(25):3487-3492.
99. Gao Y., Wang Y., Pan M.X., Sun E.W., Shan Y.Q. [Protecting effects of p44/42 MAPK signal transduction pathway on hepatocytes in ischemic preconditioning]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003;11(3):166-169.
100. Man K., Ng K.T., Lee T.K., Lo C.M., Sun C.K., Li X.L., Zhao Y., Ho J.W., Fan S.T. FTY720 attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in normal and cirrhotic livers. *Am J Transplant* 2005;5(1):40-49.
101. Kaizu T., Ikeda A., Nakao A., Tsung A., Toyokawa H., Ueki S., Geller D.A., Murase N. Protection of transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury with carbon monoxide via MEK/ERK1/2 pathway downregulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294(1):G236-G244.
102. Veteläinen R., van Vliet A., Gouma D.J., van Gulik T.M. Steatosis as a risk factor in liver surgery. *Ann Surg* 2007;245(1):20-30.
103. McCormack L., Dutkowski P., El-Badry A.M., Clavien P.A. Liver transplantation using fatty livers: always feasible? *J Hepatol* 2011;54(5):1055-1062.
104. Behrns K.E., Tsiotos G.G., DeSouza N.F., Krishna M.K., Ludwig J., Nagorney D.M. Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg* 1998;2(3):292-298.
105. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg* 1999;229(3):369-375.
106. Ricci C., Longo R., Gioulis E., Bosco M., Pollesello P., Masutti F., Croce L.S., Paoletti S., de Bernard B., Tiribelli C., Dalla Palma L. Noninvasive in vivo quantitative assessment of fat content in human liver. *J Hepatol* 1997;27(1):108-113.
107. Hayashi M., Tokunaga Y., Fujita T., Tanaka K., Yamaoka Y., Ozawa K. The effects of cold preservation on steatotic graft viability in rat liver transplantation. *Transplantation* 1993;56(2):282-287.
108. Seifalian A.M., Chidambaram V., Rolles K., Davidson B.R. In vivo demonstration of impaired microcirculation in steatotic human liver grafts. *Liver Transpl Surg* 1998;4(1):71-77.
109. Teramoto K., Bowers J.L., Kruskal J.B., Clouse M.E. Hepatic microcirculatory changes after reperfusion in fatty and normal liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1993;56(5):1076-1082.
110. Hakamada K., Sasaki M., Takahashi K., Umehara Y., Konn M. Sinusoidal flow block after warm ischemia in rats with diet-induced fatty liver. *J Surg Res* 1997;70(1):12-20.

111. Teramoto K., Bowers J.L., Kruskal J.B., Hara J., Iwai T., Endo M., Clouse M.E. In vivo microscopic observation of fatty liver grafts after reperfusion. *Transplant Proc* 1994;26(4):2391.
112. Wada K., Fujimoto K., Fujikawa Y., Shibayama Y., Mitsui H., Nakata K. Sinusoidal stenosis as the cause of portal hypertension in choline deficient diet induced fatty cirrhosis of the rat liver. *Acta Pathol Jpn* 1974;24(2):207-217.
113. Serafin A., Roselló-Catafau J., Prats N., Xaus C., Gelpí E., Peralta C. Ischemic preconditioning increases the tolerance of Fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am J Pathol* 2002;161(2):587-601.
114. Selzner M., Rüdiger H.A., Sindram D., Madden J., Clavien P.A. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology* 2000;32(6):1280-1288.
115. Koneru B., Fisher A., He Y., Klein K.M., Skurnick J., Wilson D.J., de la Torre A.N., Merchant A., Arora R., Samanta A.K. Ischemic preconditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial of safety and efficacy. *Liver Transpl* 2005;11(2):196-202.
116. Soltys K., Dikdan G., Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology* 2001;34(1):13-18.
117. Nardo B., Caraceni P., Pasini P., Domenicali M., Catena F., Cavallari G., Santoni B., Maiolini E., Grattagliano I., Vendemiale G., Trevisani F., Roda A., Bernardi M., Cavallari A. Increased generation of reactive oxygen species in isolated rat fatty liver during postischemic reoxygenation. *Transplantation* 2001;71(12):1816-1820.
118. Caraceni P., Domenicali M., Vendemiale G., Grattagliano I., Pertosa A., Nardo B., Morselli-Labate A.M., Trevisani F., Palasciano G., Altomare E., Bernardi M. The reduced tolerance of rat fatty liver to ischemia reperfusion is associated with mitochondrial oxidative injury. *J Surg Res* 2005;124(2):160-168.
119. Jassem W., Fuggle S.V., Rela M., Koo D.D., Heaton N.D. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2002;73(4):493-499.
120. Leducq N., Delmas-Beauvieux M.C., Bourdel-Marchasson I., Dufour S., Gallis J.L., Canioni P., Diolez P. Mitochondrial and energetic dysfunctions of the liver during normothermic reperfusion: protective effect of cyclosporine and role of the mitochondrial permeability transition pore. *Transplant Proc* 2000;32(2):479-480.
121. Letteron P., Fromenty B., Terris B., Degott C., Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol* 1996;24(2):200-208.
122. Reddy M.C., Koneru B., Soni S., Patel D. 31P nuclear magnetic resonance study of phospholipids in ischemia/reperfusion injury in a rat fatty liver model. *Transplantation* 1996;61(8):1151-1155.
123. Day C.P., James O.F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114(4):842-845.
124. Curzio M., Esterbauer H., Dianzani M.U. Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. *Int J Tissue React* 1985;7(2):137-142.
125. Carrasco-Chaumel E., Roselló-Catafau J., Bartrons R., Franco-Gou R., Xaus C., Casillas A., Gelpí E., Rodés J., Peralta C. Adenosine monophosphate-activated protein kinase and nitric oxide in rat steatotic liver transplantation. *J Hepatol* 2005;43(6):997-1006.
126. Fukumori T., Ohkohchi N., Tsukamoto S., Satomi S. The mechanism of injury in a steatotic liver graft during cold preservation. *Transplantation* 1999;67(2):195-200.
127. Hui A.M., Kawasaki S., Makuuchi M., Nakayama J., Ikegami T., Miyagawa S. Liver injury following normothermic ischemia in steatotic rat liver. *Hepatology* 1994;20(5):1287-1293.
128. Nakano H., Nagasaki H., Barama A., Boudjema K., Jaeck D., Kumada K., Tatsuno M., Baek Y., Kitamura N., Suzuki T., Yamaguchi M. The effects of N-acetylcysteine and anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody against ischemia-reperfusion injury of the rat steatotic liver produced by a choline-methionine-deficient diet. *Hepatology* 1997;26(3):670-678.
129. Stachlewitz R.F., Gao W., Zhong Z., Connor H.D., Mason R.P., Thurman R.G. Generation of lipid free radicals by adherent leukocytes from transplanted rat liver. *Transpl Int* 1998;11(5):353-360.

130. Yamada S., Iida T., Tabata T., Nomoto M., Kishikawa H., Kohno K., Eto S. Alcoholic fatty liver differentially induces a neutrophil-chemokine and hepatic necrosis after ischemia-reperfusion in rat. *Hepatology* 2000;32(2):278-288.
131. Koneru B., Reddy M.C., de la Torre A.N., Patel D., Ippolito T., Ferrante R.J. Studies of hepatic warm ischemia in the obese Zucker rat. *Transplantation* 1995;59(7):942-946.
132. Sun C.K., Zhang X.Y., Zimmermann A., Davis G., Wheatley A.M. Effect of ischemia-reperfusion injury on the microcirculation of the steatotic liver of the Zucker rat. *Transplantation* 2001;72(10):1625-1631.
133. Amersi F., Farmer D.G., Shaw G.D., Kato H., Coito A.J., Kaldas F., Zhao D., Lassman C.R., Melinek J., Ma J., Volk H.D., Kupiec-Weglinski J.W., Busuttil R.W. P-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig)-mediated blockade of CD62 selectin molecules protects rat steatotic liver grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant* 2002;2(7):600-608.
134. Amersi F., Shen X.D., Moore C., Melinek J., Busuttil R.W., Kupiec-Weglinski J.W., Coito A.J. Fibronectin-alpha 4 beta 1 integrin-mediated blockade protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 2003;162(4):1229-1239.
135. Fondevila C., Shen X.D., Moore C., Busuttil R.W., Coito A.J. Cyclic RGD peptides with high affinity for alpha5beta1 integrin protect genetically fat Zucker rat livers from cold ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 2005;37(4):1679-1681.
136. Zhong Z., Connor H., Mason R.P., Qu W., Stachlewitz R.F., Gao W., Lemasters J.J., Thurman R.G. Destruction of Kupffer cells increases survival and reduces graft injury after transplantation of fatty livers from ethanol-treated rats. *Liver Transpl Surg* 1996;2(5):383-387.
137. Fukumori T., Ohkohchi N., Tsukamoto S., Satomi S. Why is fatty liver unsuitable for transplantation? Deterioration of mitochondrial ATP synthesis and sinusoidal structure during cold preservation of a liver with steatosis. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):412-415.
138. Selzner N., Selzner M., Jochum W., Clavien P.A. Ischemic preconditioning protects the steatotic mouse liver against reperfusion injury: an ATP dependent mechanism. *J Hepatology* 2003;39(1):55-61.
139. Fromenty B., Berson A., Pessayre D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *J Hepatol* 1997;26 (Suppl 1):13-22.
140. Fromenty B., Pessayre D. Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. *J Hepatol* 1997;26:43-53.
141. Miki C., Iriyama K., Mirza D.F., Mayer A.D., Buckels J.A., Suzuki H., McMaster P. Postperfusion energy metabolism of steatotic graft and its relation to early graft viability following liver transplantation. *Dig Dis Sci* 1998;43(1):74-79.
142. Chavin K.D., Yang S., Lin H.Z., Chatham J., Chacko V.P., Hoek J.B., Walajtys-Rode E., Rashid A., Chen C.H., Huang C.C., Wu T.C., Lane M.D., Diehl A.M. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J BiolChem* 1999;274(9):5692-5700.
143. Cortez-Pinto H., Zhi Lin H., Qi Yang S., Odwin Da Costa S., Diehl A.M. Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1999;116(5):1184-1193.
144. Rashid A., Wu T.C., Huang C.C., Chen C.H., Lin H.Z., Yang S.Q., Lee F.Y., Diehl A.M. Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology* 1999;29(4):1131-1138.
145. Caraceni P., Bianchi C., Domenicali M., Maria Pertosa A., Maiolini E., Parenti Castelli G., Nardo B., Trevisani F., Lenaz G., Bernardi M. Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat fatty liver exposed to preservation-reperfusion injury. *J Hepatol* 2004;41(1):82-88.
146. Nardo B., Grattagliano I., Domenicali M., Caraceni P., Catena F., Santoni B., Turi P., Cavallari G., Dall'Agata M., Trevisani F., Bernardi M., Cavallari A. Mitochondrial oxidative injury in rat fatty livers exposed to warm ischemia-reperfusion. *Transplant Proc* 2000;32(1):51.

147. Vendemiale G., Grattagliano I., Caraceni P., Caraccio G., Domenicali M., Dall'Agata M., Trevisani F., Guerrieri F., Bernardi M., Altomare E. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 2001;33(4):808-815.
148. Jaeschke H., Lemasters J.J. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2003;125(4):1246-1257.
149. Hong F., Radaeva S., Pan H.N., Tian Z., Veech R., Gao B. Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver disease. *Hepatology* 2004;40(4):933-941.
150. Crowley H., Lewis W.D., Gordon F., Jenkins R., Khettry U. Steatosis in donor and transplant liver biopsies. *Hum Pathol* 2000;31(10):1209-1213.
151. de Rougemont O., Lehmann K., Clavien P.A. Preconditioning, organ preservation, and postconditioning to prevent ischemia-reperfusion injury to the liver. *Liver Transpl* 2009;15(10):1172-1182.
152. Ben Mosbah I., Roselló-Catafau J., Franco-Gou R., Abdennebi H.B., Saidane D., Ramella-Virieux S., Boillot O., Peralta C. Preservation of steatotic livers in IGL-1 solution. *Liver Transpl* 2006;12(8):1215-1223.
153. Kuriyama N., Isaji S., Hamada T., Kishiwada M., Ohsawa I., Usui M., Sakurai H., Tabata M., Hayashi T., Suzuki K. The cytoprotective effects of addition of activated protein C into preservation solution on small-for-size grafts in rats. *Liver Transpl* 2010;16(1):1-11.
154. Ben Mosbah I., Roselló-Catafau J., Alfany-Fernandez I., Rimola A., Parellada P.P., Mitjavila M.T., Lojek A., Ben Abdennebi H., Boillot O., Rodés J., Peralta C. Addition of carvedilol to University Wisconsin solution improves rat steatotic and nonsteatotic liver preservation. *Liver Transpl* 2010;16(2):163-171.
155. Zaouali M.A., Padriisa-Altés S., Ben Mosbah I., Alfany-Fernandez I., Massip-Salcedo M., Casillas-Ramirez A., Bintanel-Morcillo M., Boillot O., Serafin A., Rimola A., Rodés J., Roselló-Catafau J., Peralta C. Improved rat steatotic and nonsteatotic liver preservation by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I to University of Wisconsin solution. *Liver Transpl* 2010;16(9):1098-1111.
156. Bezinover D., Ramamoorthy S., Uemura T., Kadry Z., McQuillan P.M., Mets B., Falcucci O., Rannels S., Ruiz-Velasco V., Spiess B., Liang J., Mani H., Lou X., Janicki P.K. Use of a third-generation perfluorocarbon for preservation of rat DCD liver grafts. *J Surg Res* 2012;175(1):131-137.
157. Abbas R., Kombu R.S., Dignam D., Gunning W., Stulberg J.J., Brunengraber H., Sanabria J.R. Polyethylene glycol modified-albumin enhances the cold preservation properties of University of Wisconsin solution in rat liver and a hepatocyte cell line. *J Surg Res* 2010;164(1):95-104.
158. Hide D., Guixé-Muntet S., Mancici A., Bosch J., Gracia-Sancho J. A novel recombinant form of the manganese superoxide dismutase protects rat liver grafts procured for transplantation. *J Hepatol* 2013;58:S231-S232.
159. Defamie V., Laurens M., Patrono D., Devel L., Brault A., Saint-Paul M.C., Yiotakis A., Barbry P., Gugenheim J., Crenesse D., Dive V., Huet P.M., Mari B. Matrix metalloproteinase inhibition protects rat livers from prolonged cold ischemia-warm reperfusion injury. *Hepatology* 2008;47(1):177-185.
160. Russo L., Gracia-Sancho J., García-Calderó H., Marrone G., García-Pagán J.C., García-Cardeña G., Bosch J. Addition of simvastatin to cold storage solution prevents endothelial dysfunction in explanted rat livers. *Hepatology* 2012;55(3):921-930.
161. Yue L.H., Zhao Y.L., Chen J., Lu D.R. Effect of fusion protein TAT and heme oxygenase-1 on liver sinusoidal endothelial cells apoptosis during preservation injury. *Chin Med J (Engl)* 2010;123(1):68-73.
162. Anderson C.D., Upadhyaya G., Conzen K.D., Jia J., Brunt E.M., Tiriveedhi V., Xie Y., Ramachandran S., Mohanakumar T., Davidson N.O., Chapman W.C. Endoplasmic reticulum stress is a mediator of posttransplant injury in severely steatotic liver allografts. *Liver Transplant* 2011;17(2):189-200.
163. Alfany-Fernández I., Casillas-Ramírez A., Bintanel-Morcillo M., Brosnihan K., Ferrario C., Serafin A., Rimola A., Rodés J., Roselló-Catafau J., Peralta C. Therapeutic targets in liver transplantation: angiotensin II in nonsteatotic grafts and angiotensin-(1-7) in steatotic grafts. *Am J Transplant* 2009;9(3):439-451.

164. Shi Y., Rehman H., Ramshesh V.K., Schwartz J., Liu Q., Krishnasamy Y., Zhang X., Lemasters J.J., Smith C.D., Zhong Z. Sphingosine kinase-2 inhibition improves mitochondrial function and survival after hepatic ischemia-reperfusion. *J Hepatol* 2012;56(1):137-145.
165. Liu P.G., He S.Q., Zhang Y.H., Wu J. Protective effects of apocynin and allopurinol on ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol* 2008;14(18):2832-2837.
166. Ramalho F.S., Alfany-Fernandez I., Casillas-Ramirez A., Massip-Salcedo M., Serafin A., Rimola A., Arroyo V., Rodés J., Roselló-Catafau J., Peralta C. Are angiotensin II receptor antagonists useful strategies in steatotic and nonsteatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion? *J Pharmacol Exp Ther* 2009;329(1):130-140.
167. Ichiki A., Miyazaki T., Nodera M., Suzuki H., Yanagisawa H. Ascorbate inhibits apoptosis of Kupffer cells during warm ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2008;55:338-344.
168. Llacuna L., Fernández A., Montfort C.V., Matías N., Martínez L., Caballero F., Rimola A., Elena M., Morales A., Fernandez-Checa J.C., Garcia-Ruiz C. Targeting cholesterol at different levels in the mevalonate pathway protects fatty liver against ischemia-reperfusion injury. *J Hepatol* 2011;54(5):1002-1010.
169. Ajamieh H., Farrell G., Wong H.J., Yu J., Chu E., Chen J., Teoh N. Atorvastatin protects obese mice against hepatic ischemia-reperfusion injury by Toll like receptor-4 suppression and endothelial nitric oxide synthase activation. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27(8):1353-1361.
170. Dal Ponte C., Alchera E., Follenzi A., Imarisio C., Prat M., Albano E., Carini R. Pharmacological postconditioning protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Liver Transpl* 2011;17(4):474-482.
171. Casillas-Ramirez A., Amine-Zaouali M., Massip-Salcedo M., Padriisa-Altés S., Bintanel-Morcillo M., Ramalho F., Serafin A., Rimola A., Arroyo V., Rodés J., Roselló-Catafau J., Peralta C. Inhibition of angiotensin II action protects rat steatotic livers against ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 2008;36(4):1256-1266.
172. Aguilar-Melero P., Luque A., Machuca M.M., Pérez de Obanos M.P., Navarrete R., Rodríguez-García I.C., Briceño J., Iñiguez M., Ruiz J., Prieto J., de la Mata M., Gomez-Villamandos R.J., Muntane J., López-Cillero P. Cardiotrophin-1 reduces ischemia/reperfusion injury during liver transplant. *J Surg Res* 2013;181(2):e83-e91.
173. Wei Y., Chen P., de Bruyn M., Zhang W., Bremer E., Helfrich W. Carbon monoxide-releasing molecule-2 (CORM-2) attenuates acute hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *BMC Gastroenterol* 2010;10:42.
174. Casillas-Ramírez A., Zaouali A., Padriisa-Altés S., Ben Mosbah I., Pertosa A., Alfany-Fernández I., Bintanel-Morcillo M., Xaus C., Rimola A., Rodés J., Roselló-Catafau J., Peralta C. Insulin-like growth factor and epidermal growth factor treatment: new approaches to protecting steatotic livers against ischemia-reperfusion injury. *Endocrinology* 2009;150(7):3153-3161.
175. Hochhauser E., Pappo O., Ribakovsky E., Ravid A., Kurtzwald E., Cheporko Y., Lelchuk S., Ben-Ari Z. Recombinant human erythropoietin attenuates hepatic injury induced by ischemia/reperfusion in an isolated mouse liver model. *Apoptosis* 2008;13(1):77-86.
176. Yang X., Qin L., Liu J., Tian L., Qian H. 17 $\beta$ -Estradiol protects the liver against cold ischemia/reperfusion injury through the Akt kinase pathway. *J Surg Res* 2012;178(2):996-1002.
177. Kuroda S., Tashiro H., Igarashi Y., Tanimoto Y., Nambu J., Oshita A., Kobayashi T., Amano H., Tanaka Y., Ohdan H. Rho inhibitor prevents ischemia-reperfusion injury in rat steatotic liver. *J Hepatol* 2012;56(1):146-152.
178. Jiang W., Kong L., Wu X., Pu L., Wang X. Allograft inflammatory factor-1 is upregulated in warm and cold ischemia-reperfusion injury in rat liver and may be inhibited by FK506. *J Surg Res* 2011;165:158-164.
179. Lehne K., Nobiling R. Metabolic preconditioning with fructose prior to organ recovery attenuates ischemia-reperfusion injury in the isolated perfused rat liver. *Scand J Gastroenterol* 2013;48:218-224.
180. Casillas-Ramírez A., Alfany-Fernández I., Massip-Salcedo M., Juan M.E., Planas J.M., Serafin A., Pallàs M., Rimola A., Rodés J., Peralta C. Retinol-binding protein 4 and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  in steatotic liver transplantation. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;338(1):143-153.

181. Xue F., Zhang J.J., Xu L.M., Zhang C., Xia Q. Protective effects of HGF-MSP chimer (metron factor-1) on liver ischemia-reperfusion injury in rat model. *J Dig Dis* 2010;11:299–305.
182. Jiménez-Castro M.B., Elias-Miro M., Mendes-Braz M., Lemoine A., Rimola A., Rodés J., Casillas-Ramirez A., Peralta C. Tauroursodeoxycholic acid affects PPAR $\gamma$  and TLR4 in steatotic liver transplantation. *Am J Transplant* 2012;12: 3257–3271.
183. Zúñiga J., Cancino M., Medina F., Varela P., Vargas R., Tapia G., Videla L.A., Fernandez V. N-3 PUFA supplementation triggers PPAR- $\alpha$  activation and PPAR- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* 2011;6(12):e28502.
184. Ocun L.M., Zeng S., Cavnar M.J., Sorenson E.C., Bamboat Z.M., Greer J.B., Kim T.S., Popow R., DeMatteo R.P. Nilotinib protects the murine liver from ischemia/reperfusion injury. *J Hepatol* 2012;57(4):766–773.
185. Elias-Miró M., Massip-Salcedo M., Raila J., Schweigert F., Mendes-Braz M., Ramalho F., Jiménez-Castro M.B., Casillas-Ramirez A., Bermudo R., Rimola A., Rodes J., Peralta C. Retinol binding protein 4 and retinol in steatotic and nonsteatotic rat livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia/reperfusion. *Liver Transpl* 2012;18(10):1198–1208.
186. Schmeding M., Rademacher S., Boas-Knoop S., Roecken C., Lendeckel U., Neuhaus P., Neumann U.P. RHuEPO reduces ischemia-reperfusion injury and improves survival after transplantation of fatty livers in rats. *Transplantation* 2010;89(2):161–168.
187. Zhang Y., Ji H., Shen X., Cai J., Gao F., Koenig K.M., Batikian C.M., Busuttill R.W., Kupiec-Weglinski J.W. Targeting TIM-1 on CD4 T cells depresses macrophage activation and overcomes ischemia-reperfusion injury in mouse orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant* 2013;13(1):56–66.
188. Busuttill R.W., Lipshutz G.S., Kupiec-Weglinski J.W., Ponthieux S., Gjertson D.W., Cheadle C., Watkins T., Ehrlich E., Katz E., Squiers E.C., Rabb H., Hemmerich S. RPSGL-Ig for improvement of early liver allograft function: a double-blind, placebo-controlled, single-center phase II study. *Am J Transplant* 2011;11(4):786–797.
189. Beck-Schimmer B., Breitenstein S., Bonvini J.M., Lesurtel M., Ganter M., Weber A., Puhan M.A., Clavien P.A. Protection of pharmacological postconditioning in liver surgery: results of a prospective randomized controlled trial. *Ann Surg* 2012;256(5):837–844.
190. Gracia-Sancho J., García-Calderó H., Hide D., Marrone G., Guixé-Muntet S., Peralta C., García-Pagán J.C., Abraldes J.G., Bosch J. Simvastatin maintains function and viability of steatotic rat livers procured for transplantation. *J Hepatol* 2013;58(6):1140–1146.
191. Liu Y.X., Jin L.M., Zhou L., Xie H.Y., Jiang G.P., Chen H., Zheng S.S. Sirolimus attenuates reduced-size liver ischemia-reperfusion injury but impairs liver regeneration in rats. *Dig Dis Sci* 2010;55(8):2255–2262.
192. Jiménez-Castro M.B., Casillas-Ramirez A., Massip-Salcedo M., Elias-Miro M., Serafín A., Rimola A., Rodés J., Peralta C. Cyclic adenosine 30,50-monophosphate in rat steatotic liver transplantation. *Liver transpl* 2011;17(9):1099–1110.
193. Ben Mosbah I., Alfany-Fernández I., Martel C., Zaouali M., Bintanel-Morcillo M., Rimola A., Rodés J., Brenner C., Roselló-Catafau J., Peralta C. Endoplasmic reticulum stress inhibition protects steatotic and non-steatotic livers in partial hepatectomy under ischemiareperfusion. *Cell Death Dis* 2010;1:e52.
194. López-Neblina F., Toledo-Pereyra L.H. Anti-ischemic effect of selectin blocker through modulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10. *J Surg Res* 2008;138:275–283.
195. Hassan-Khabbar S., Cottart C.H., Wendum D., Vibert F., Clot J.P., Savouret J.F., Conti M., Nivet-Antoine V. Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: a possible strategy in liver surgery. *Liver Transpl* 2008;14(4):451–459.
196. Cheng F., Li Y., Feng L., Li S. Effects of tetrandrine on ischemia/reperfusion injury in mouse liver. *Transplant Proc* 2008;40:2163–2166.
197. Xu S.Q., Li Y.H., Hu S.H., Chen K., Dong L.Y. Effects of Wy-14,643 on hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2008;14:6936–6942.

198. Teoh N.C., Williams J., Hartley J., Yu J., McCuskey R.S., Farrell G.C. Short-term therapy with peroxisome proliferation-activator receptor- $\alpha$  agonist Wy-14,643 protects murine fatty liver against ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2010;51:996–1006.
199. Ichim T.E., Li M., Qian H., Popov I.A., Rycerz K., Zheng X., White D., Zhong R., Min W.P. RNA interference: a potent tool for gene-specific therapeutics. *Am J Transplant* 2004;4(8):1227-1236.
200. Llacuna L., Mari M., Garcia-Ruiz C., Fernandez-Checa J.C., Morales A. Critical role of acidic sphingomyelinase in murine hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2006;44(3):561-572.
201. Sass G., Shembade N.D., Haimerl F., Lamoureux N., Hashemolhosseini S., Tannapfel A., Tiegs G. TNF pretreatment interferes with mitochondrial apoptosis in the mouse liver by A20-mediated down-regulation of Bax. *J Immunol* 2007;179(10):7042-7049.
202. Li X., Zhang J.F., Lu M.Q., Yang Y., Xu C., Li H., Wang G.S., Cai C.J., Chen G.H. Alleviation of ischemia-reperfusion injury in rat liver transplantation by induction of small interference RNA targeting Fas. *Langenbecks Arch Surg* 2007;392(3):345-351.
203. Contreras J.L., Vilatoba M., Eckstein C., Bilbao G., Anthony Thompson J., Eckhoff D.E. Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver in mice. *Surgery* 2004;136(2):390-400.
204. Pellish R.S., Nasir A., Ramratnam B., Moss S.F. Review article: RNA interference--potential therapeutic applications for the gastroenterologist. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27(9):715-723.
205. Saito Y., Shimada M., Utsunomiya T., Ikemoto T., Yamada S., Morine Y., Imura S., Mori H., Sugimoto K., Iwahashi S., Asanoma M. The protective effect of adipose-derived stem cells against liver injury by trophic molecules. *J Surg Res* 2013;180(1):162–168.
206. Sun C.K., Chang C.L., Lin Y.C., Kao Y.H., Chang L.T., Yen C.H., Shao P.L., Chen C.H., Leu S., Yip H.K. Systemic administration of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Crit Care Med* 2012;40(4):1279–1290.
207. Selzner N., Liu H., Boehnert M.U., Adeyi O.A., Shalev I., Bartczak A.M., Xue-Zhong M., Manuel J., Rotstein O.D., McGilvray I.D., Grant D.R., Phillips M.J., Levy G.A., Selzner M. FGL2/fibroleukin mediates hepatic reperfusion injury by induction of sinusoidal endothelial cell and hepatocyte apoptosis in mice. *J Hepatol* 2012;56(1):153–159.
208. Watanabe G., Uchinami H., Yoshioka M., Abe Y., Kikuchi I., Iwasaki W., Kume M., Yamamoto Y. Transfection of naked nuclear factor- $\kappa$ B decoy oligodeoxynucleotides into liver by rapid portal vein infusion in rats: its effect on ischemia-reperfusion injury of liver. *Hum Gene Ther* 2012;23(4):428–436.
209. Schneider M., Van Geyte K., Fraisl P., Kiss J., Aragonés J., Mazzone M., Mairbaur H., De Bock K., Jeoung N.H., Mollenhauer M., Georgiadou M., Bishop T., Roncal C., Sutherland A., Jordan B., Gallez B., Weitz J., Harris R.A., Maxwell P., BAes M., Ratcliffe P., Carmeliet P. Loss or silencing of the PHD1 prolyl hydroxylase protects livers of mice against ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2010;138(3):1143–1154.
210. Hui W., Jinxiang Z., Heshui W., Zhuoya L., Qichang Z. Bone marrow and nonbone marrow TLR4 regulates hepatic ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;389:328–332.
211. Ellett J.D., Evans Z.P., Atkinson C., Schmidt M.G., Schnellmann R.G., Chavin K.D. Toll-like receptor 4 is a key mediator of murine steatotic liver warm ischemia/reperfusion injury. *Liver Transpl* 2009;15:1101–1109.
212. Fernández L., Heredia N., Peralta C., Xaus C., Roselló-Catafau J., Rimola A., Marco A., Serafin A., Deulofeu R., Gelpí E., Grande L. Role of ischemic preconditioning and the portosystemic shunt in the prevention of liver and lung damage after rat liver transplantation. *Transplantation* 2003;76(2):282-289.
213. Rüdiger H.A., Kang K.J., Sindram D., Riehle H.M., Clavien P.A. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002;235(3):400-407.
214. Peralta C., Prats N., Xaus C., Gelpí E., Roselló-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999;30(6):1481-1489.

215. Clavien P.A., Yadav S., Sindram D., Bentley R.C. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 2000;232(2):155-162.
216. Clavien P.A., Selzner M., Rüdiger H.A., Graf R., Kadry Z., Rousson V., Jochum W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003;238(6):843-852.
217. Hong F., Yang S. Ischemic preconditioning decreased leukotriene C4 formation by depressing leukotriene C4 synthase expression and activity during hepatic I/R injury in rats. *J Surg Res* 2012;178:1015-1021.
218. Jang J.H., Kang K.J., Kang Y., Lee I.S., Graf R., Clavien P.A. Ischemic preconditioning and intermittent clamping confer protection against ischemic injury in the cirrhotic mouse liver. *Liver Transpl* 2008;14:980-988.
219. Shimoda M., Iwasaki Y., Sawada T., Kubota K. Protective effect of ischemic preconditioning against liver injury after major hepatectomy using the intermittent Pringle maneuver in swine. *Pathobiology* 2008;74:42-49.
220. Esposti D.D., Domart M.C., Sebah M., Harper F., Pierron G., Brenner C., Lemoine A. Autophagy is induced by ischemic preconditioning in human livers formerly treated by chemotherapy to limit necrosis. *Autophagy* 2010;6(1):172-174.
221. Heizmann O., Loehe F., Volk A., Schauer R.J. Ischemic preconditioning improves postoperative outcome after liver resections: a randomized controlled study. *Eur J Med Res* 2008;13:79-86.
222. Schiesser M., Wittert A., Nieuwenhuijs V.B., Morphett A., Padbury R.T., Barritt G.J. Intermittent ischemia but not ischemic preconditioning is effective in restoring bile flow after ischemia reperfusion injury in the livers of aged rats. *J Surg Res* 2009;152:61-68.
223. Wang F., Birch S.E., He R., Tawadros P., Szasz K., Kapus A., Rotstein O.D. Remote ischemic preconditioning by hindlimb occlusion prevents liver ischemic/reperfusion injury: the role of High Mobility Group-Box 1. *Ann Surg* 2010;251(2):292-299.
224. Fondevila C., Hessheimer A.J., Maathuis M.H., Muñoz J., Taurá P., Calatayud D., Leuvenink H., Rimola A., Ploeg R.J., García-Valdecasas J.C. Superior preservation of DCD livers with continuous normothermic perfusion. *Ann Surg* 2011;254(6):1000-1007.
225. García-Valdecasas J.C., Fondevila C. In-vivo normothermic recirculation: an update. *Curr Opin Organ Transplant* 2010;15:173-176.
226. Schlegel A., Rougemont O., Graf R., Clavien P.A., Dutkowski P. Protective mechanisms of end-ischemic cold machine perfusion in DCD liver grafts. *J Hepatol* 2013;58:278-286.
227. Vairetti M., Ferrigno A., Carlucci F., Tabucchi A., Rizzo V., Boncompagni E., Neri D., Gringeri E., Freitas I., Cillo U. Subnormothermic machine perfusion protects steatotic livers against preservation injury: a potential for donor pool increase? *Liver Transpl* 2009;15:20-29.
228. Hessheimer A.J., Fondevila C., Taurá P., Muñoz J., Sánchez O., Fuster J., Rimola A., García-Valdecasas J.C. Decompression of the portal bed and twice-baseline portal inflow are necessary for the functional recovery of a "small-for-size" graft. *Ann Surg* 2011;253(6):1201-1210.
229. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74(5):1124-1136.
230. Heurteaux C., Lauritzen I., Widmann C., Lazdunski M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(10):4666-4670.
231. Peralta C., Hotter G., Closa D., Prats N., Xaus C., Gelpi E., Rosello-Catafau J. 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(1):126-132.
232. Peralta C., Closa D., Hotter G., Gelpi E., Prats N., Roselló-Catafau J. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229(1):264-270.

233. Hoshida S., Yamashita N., Otsu K., Hori M. Repeated physiologic stresses provide persistent cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Am Coll Cardiol* 2002;40(4):826-831.
234. Peralta C., Hotter G., Closa D., Gelpí E., Bulbena O., Roselló-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997;25(4):934-937.
235. Pasupathy S., Homer-Vanniasinkam S. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;29(2):106-115.
236. Massip-Salcedo M., Roselló-Catafau J., Prieto J., Avila M.A., Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int* 2007;27(1):6-16.
237. Peralta C., Closa D., Xaus C., Gelpí E., Roselló-Catafau J., Hotter G. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 1998;28(3):768-773.
238. Yin D.P., Sankary H.N., Chong A.S., Ma L.L., Shen J., Foster P., Williams J.W. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1998;66(2):152-157.
239. Arai M., Thurman R.G., Lemasters J.J. Contribution of adenosine A(2) receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against Storage/Reperfusion injury in rat livers. *Hepatology* 2000;32(2):297-302.
240. Pabla R., Buda A.J., Flynn D.M., Blessé S.A., Shin A.M., Curtis M.J., Lefler D.J. Nitric oxide attenuates neutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1996;78(1):65-72.
241. Naito Y., Yoshikawa T., Matsuyama K., Yagi N., Arai M., Nakamura Y., Kaneko T., Yoshida N., Kondo M. Neutrophils, lipid peroxidation, and nitric oxide in gastric reperfusion injury in rats. *Free Radic Biol Med* 1998;24(3):494-502.
242. Koepfel T.A., Thies J.C., Schemmer P., Trauner M., Gebhard M.M., Otto G., Post S. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol* 1997;27(1):163-169.
243. Gong J.P., Tu B., Wang W., Peng Y., Li S.B., Yan L.N. Protective effect of nitric oxide induced by ischemic preconditioning on reperfusion injury of rat liver graft. *World J Gastroenterol* 2004;10(1):73-76.
244. Peralta C., Rull R., Rimola A., Deulofeu R., Roselló-Catafau J., Gelpí E., Rodés J. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001;71(4):529-536.
245. Wang Y., Lawson J.A., Jaeschke H. Differential effect of 2-aminoethyl-isothiourea, an inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, on microvascular blood flow and organ injury in models of hepatic ischemia-reperfusion and endotoxemia. *Shock* 1998;10(1):20-25.
246. Yagnik G.P., Takahashi Y., Tsoulfas G., Reid K., Murase N., Geller D.A. Blockade of the L-arginine/NO synthase pathway worsens hepatic apoptosis and liver transplant preservation injury. *Hepatology* 2002;36(3):573-581.
247. Rivera-Chavez F.A., Toledo-Pereyra L.H., Dean R.E., Crouch L., Ward P.A. Exogenous and endogenous nitric oxide but not iNOS inhibition improves function and survival of ischemically injured livers. *J Invest Surg* 2001;14(5):267-273.
248. Ohmori H., Dhar D.K., Nakashima Y., Hashimoto M., Masumura S., Nagasue N. Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor, on reperfusion injury of rat liver. *Transplantation* 1998;66(5):579-585.
249. Längle F., Steininger R., Waldmann E., Grünberger T., Benditte H., Mittlböck M., Soliman T., Schindl M., Windberger U., Mühlbacher F., Roth E. Improvement of cardiac output and liver blood flow and reduction of pulmonary vascular resistance by intravenous infusion of L-arginine during the early reperfusion period in pig liver transplantation. *Transplantation* 1997;63(9):1225-1233.
250. Jones S.M., Thurman R.G. L-arginine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow model of liver perfusion. *Hepatology* 1996;24(1):163-168.

251. Geller D.A., Chia S.H., Takahashi Y., Yagnik G.P., Tsoufas G., Murase N. Protective role of the L-arginine-nitric oxide synthase pathway on preservation injury after rat liver transplantation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2001;25(3):142-147.
252. Fernández L., Carrasco-Chaumel E., Serafin A., Xaus C., Grande L., Rimola A., Roselló-Catafau J., Peralta C. Is ischemic preconditioning a useful strategy in steatotic liver transplantation? *Am J Transplant* 2004;4(6):888-899.
253. Funaki H., Shimizu K., Harada S., Tsuyama H., Fushida S., Tani T., Miwa K. Essential role for nuclear factor kappaB in ischemic preconditioning for ischemia-reperfusion injury of the mouse liver. *Transplantation* 2002;74(4):551-556.
254. Ricciardi R., Shah S.A., Wheeler S.M., Quarfordt S.H., Callery M.P., Meyers W.C., Chari R.S. Regulation of NFkappaB in hepatic ischemic preconditioning. *J Am Coll Surg* 2002;195(3):319-326.
255. Teoh N., Dela Pena A., Farrell G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology* 2002;36(1):94-102.
256. Peralta C., Bulbena O., Xaus C., Prats N., Cutrin J.C., Poli G., Gelpi E., Roselló-Catafau J. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation* 2002;73(8):1203-1211.
257. Sindram D., Rüdiger H.A., Upadhy A.G., Strasberg S.M., Clavien P.A. Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism. *J Hepatol* 2002;36(1):78-84.
258. Teoh N., Leclercq I., Pena A.D., Farrell G. Low-dose TNF-alpha protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: implications for preconditioning. *Hepatology* 2003;37(1):118-128.
259. Serafin A., Fernández-Zabalegui L., Prats N., Wu Z.Y., Roselló-Catafau J., Peralta C. Ischemic preconditioning: tolerance to hepatic ischemia-reperfusion injury. *Histol Histopathol* 2004;19(1):281-289.
260. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284(1):G15-G26.
261. Iwasaki Y., Tagaya N., Hattori Y., Yamaguchi K., Kubota K. Protective effect of ischemic preconditioning against intermittent warm-ischemia-induced liver injury. *J Surg Res* 2002;107(1):82-92.
262. Ricciardi R., Schaffer B.K., Kim R.D., Shah S.A., Donohue S.E., Wheeler S.M., Quarfordt S.H., Callery M.P., Meyers W.C., Chari R.S. Protective effects of ischemic preconditioning on the cold-preserved liver are tyrosine kinase dependent. *Transplantation* 2001;72(3):406-412.
263. Sawaya D.E., Brown M., Minardi A., Bilton B., Burney D., Granger D.N., McDonald J.C., Zibari G.B. The role of ischemic preconditioning in the recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 1999;85(1):163-170.
264. Zapletal C., Maksan S.M., Lehmann T., Guenther L., Fallsehr C., Mehrabi A., Weiss G., Golling M., Gebhard M.M., Herfarth C., Klar E. Ischemic preconditioning improves liver microcirculation after ischemia/reperfusion. *Transplant Proc* 1999;31(8):3260-3262.
265. Shinoda M., Shimazu M., Wakabayashi G., Tanabe M., Hoshino K., Kitajima M. Tumor necrosis factor suppression and microcirculatory disturbance amelioration in ischemia/reperfusion injury of rat liver after ischemic preconditioning. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(11):1211-1219.
266. Koti R.S., Yang W., Glantzounis G., Quaglia A., Davidson B.R., Seifalian A.M. Effect of ischaemic preconditioning on hepatic oxygenation, microcirculation and function in a rat model of moderate hepatic steatosis. *Clin Sci (Lond)* 2005;108(1):55-63.
267. Howell J.G., Zibari G.B., Brown M.F., Burney D.L., Sawaya D.E., Olinde J.G., Granger D.N., McDonald J.C. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. *Transplantation* 2000;69(2):300-303.

268. Arai M., Thurman R.G., Lemasters J.J. Ischemic preconditioning of rat livers against cold storage-reperfusion injury: role of nonparenchymal cells and the phenomenon of heterologous preconditioning. *Liver Transpl* 2001;7(4):292-299.
269. Cutrin J.C., Perrelli M.G., Cavalieri B., Peralta C., Rosell Catafau J., Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med* 2002;33(9):1200-1208.
270. Fernández L., Heredia N., Grande L., Gómez G., Rimola A., Marco A., Gelpí E., Roselló-Catafau J., Peralta C. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology* 2002;36(3):562-572.
271. Yuan G.J., Ma J.C., Gong Z.J., Sun X.M., Zheng S.H., Li X. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11(12):1825-1828.
272. Peralta C., Perales J.C., Bartrons R., Mitchell C., Gilgenkrantz H., Xaus C., Prats N., Fernández L., Gelpí E., Panés J., Roselló-Catafau J. The combination of ischemic preconditioning and liver Bcl-2 overexpression is a suitable strategy to prevent liver and lung damage after hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 2002;160(6):2111-2122.
273. Serafin A., Roselló-Catafau J., Prats N., Gelpí E., Rodés J., Peralta C. Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion. *Hepatology* 2004;39(3):688-698.
274. Peralta C., Fernández L., Panés J., Prats N., Sans M., Piqué J.M., Gelpí E., Roselló-Catafau J. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 2001;33(1):100-113.
275. Yadav S.S., Sindram D., Perry D.K., Clavien P.A. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999;30(5):1223-1231.
276. Zhang S.J., Chen S. The role of ischemic preconditioning in rat liver graft. *Transplant Proc* 2004;36(7):1970-1972.
277. Cavalieri B., Perrelli M.G., Aragno M., Mastrocola R., Corvetti G., Durazzo M., Poli G., Cutrin J.C. Ischemic preconditioning attenuates the oxidant-dependent mechanisms of reperfusion cell damage and death in rat liver. *Liver Transpl* 2002;8(11):990-999.
278. Tacchini L., Cairo G., De Ponti C., Massip M., Roselló-Catafau J., Peralta C. Up regulation of IL-6 by ischemic preconditioning in normal and fatty rat livers: association with reduction of oxidative stress. *Free Radic Res* 2006;40(11):1206-1217.
279. Niemann C.U., Hirose R., Liu T., Behrends M., Brown J.L., Kominsky D.F., Roberts J.P., Serkova N. Ischemic preconditioning improves energy state and transplantation survival in obese Zucker rat livers. *Anesth Analg* 2005;101(6):1577-1583.
280. Choukèr A., Schachtner T., Schauer R., Dugas M., Löhe F., Martignoni A., Pollwein B., Niklas M., Rau H.G., Jauch K.W., Peter K., Thiel M. Effects of Pringle manoeuvre and ischaemic preconditioning on haemodynamic stability in patients undergoing elective hepatectomy: a randomized trial. *Br J Anaesth* 2004;93(2):204-211.
281. Li S.Q., Liang L.J., Huang J.F., Li Z. Ischemic preconditioning protects liver from hepatectomy under hepatic inflow occlusion for hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004;10(17):2580-2584.
282. Nuzzo G., Giuliante F., Vellone M., De Cosmo G., Ardito F., Murazio M., D'Acapito F., Giovannini I. Pedicle clamping with ischemic preconditioning in liver resection. *Liver Transpl* 2004;10(2 Suppl 1):S53-S57.
283. Franchello A., Gilbo N., David E., Ricchiuti A., Romagnoli R., Cerutti E., Salizzoni M. Ischemic preconditioning (IP) of the liver as a safe and protective technique against ischemia/reperfusion injury (IRI). *Am J Transplant* 2009;9(7):1629-1639.
284. Azoulay D., Del Gaudio M., Andreani P., Ichai P., Sebag M., Adam R., Scatton O., Min B.Y., Delvard V., Lemoine A., Bismuth H., Castaing D. Effects of 10 minutes of ischemic preconditioning of the cadaveric liver on the graft's preservation and function: the ying and the yang. *Ann Surg* 2005;242(1):133-139.

285. Jassem W., Fuggle S.V., Cerundolo L., Heaton N.D., Rela M. Ischemic preconditioning of cadaver donor livers protects allografts following transplantation. *Transplantation* 2006;81(2):169-174.
286. Cescon M., Grazi G.L., Grassi A., Ravaioli M., Vetrone G., Ercolani G., Varotti G., D'Errico A., Ballardini G., Pinna A.D. Effect of ischemic preconditioning in whole liver transplantation from deceased donors. A pilot study. *Liver Transpl* 2006;12(4):628-635.
287. Amador A., Grande L., Martí J., Deulofeu R., Miquel R., Solá A., Rodriguez-Laiz G., Ferrer J., Fondevila C., Charco R., Fuster J., Hotter G., García-Valdecasas J.C. Ischemic pre-conditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial. *Am J Transplant* 2007;7(9):2180-2189.
288. Koneru B, Shareef A, Dikdan G, Desai K, Klein KM, Peng B, Wachsberg RH, de la Torre AN, Debroy M, Fisher A, Wilson DJ, Samanta AK. The ischemic preconditioning paradox in deceased donor liver transplantation-evidence from a prospective randomized single blind clinical trial. *Am J Transplant* 2007;7(12):2788-2796.
289. Desai KK, Dikdan GS, Shareef A, Koneru B. Ischemic preconditioning of the liver: a few perspectives from the bench to bedside translation. *Liver Transpl* 2008;14(11):1569-1577.
290. Mei F.C., Qiao J., Tsygankova O.M., Meinkoth J.L., Quilliam L.A., Cheng X. differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of Exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *J Biol Chem* 2002;277:11497-11504.
291. Minor T., Akbar S., Yamamoto Y. Adenosine A2 receptor stimulation protects the predamaged liver from cold preservation through activation of cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A pathway. *Liver Transpl* 2000;6:196-200.
292. Akbar S., Minor T. Significance and molecular targets of protein kinase A during cAMP-mediated protection of cold stored liver grafts. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1708-1714.
293. Tomita I., Sawa M., Munakata T., Tanaka K., Kasai S. The beneficial effect of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on warm ischemic injury of the rat liver induced by cardiac arrest. *Transplantation* 1996;62:167-173.
294. Van Ness K., Podkameni D., Schwartz M., Boros P., Miller C. Dibutyryl cAMP reduces nonparenchymal cell damage during cold preservation of rat livers. *J Surg Res* 1995;58:728-731.
295. Takei K., Tokuyama K., Kato M., Morikawa A. Role of cyclic adenosine monophosphate in reducing superoxide anion generation in guinea pig alveolar macrophages. *Pharmacology* 1998;57:1-7.
296. Chaves M.M., Costa D.C., Souza D.A., Lima e Silva F.C., Machado J.A. Correlation between ROS production and InsP3 released by granulocytes from type 1 diabetic patients in a cAMP-dependent manner. *Curr Aging Sci* 2008;1:51-55.
297. Nogueira-Machado J.A., Lima e Silva F.C., Cunha E.P., Calsolari M.R., Costa D.C., Perilo C.S., Horta B.C., Ferreira I.C., Chaves M.M. Modulation of the production of reactive oxygen species (ROS) by cAMP elevating agents in granulocytes from diabetic patients: an Akt/PKB-dependent phenomenon. *Diabetes Metab* 2006;32(4):331-335.
298. Ishikawa H., Jin M.B., Ogata T., Taniguchi M., Suzuki T., Shimamura T., Magata S., Horiuchi H., Ogata K., Masuko H., Fujita M., Furukawa H., Todo S. Role of cyclic nucleotides in ischemia and reperfusion injury of canine livers. *Transplantation* 2002;73(7):1041-1048.
299. Minor T., Akbar S. Enhancement of endogenous cyclic AMP signal: a new approach to allow for cold preservation of rat livers from non-heart-beating donors? *Transplantation* 1998;66:990-994.
300. Setchell K.D., Rodrigues C.M., Podda M., Crosignani A. Metabolism of orally administered tauroursodeoxycholic acid in patients with primary biliary cirrhosis. *Gut* 1996; 38: 439-446.
301. Invernizzi P., Setchell K.D., Crosignani A., Battezzati P.M., Larghi A., O'Connell N.C., Podda M. Differences in the metabolism and disposition of ursodeoxycholic acid and of its taurine-conjugated species in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999; 29(2): 320-327.

302. Rost D., Rudolph G., Kloeters-Plachky P., Stiehl A. Effect of high dose ursodeoxycholic acid on its biliary enrichment in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2004; 40: 693–698.
303. Kaplan M.M., Gershwin M.E. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 1261–1273.
304. Baiocchi L., Tisone G., Russo M.A., Longhi C., Palmieri G., Volpe A., Almerighi C., Telesca C., Carbone M., Toti L., De Leonardis F., Angelico M. TUDCA prevents cholestasis and canalicular damage induced by ischemia-reperfusion injury in the rat, modulating PKC $\alpha$ -ezrin pathway. *Transpl Int* 2008; 21:792–800.
305. Ozcan U., Yilmaz E., Ozcan L., Furuhashi M., Vaillancourt E., Smith R.O., Gorgun C.Z., Hotamisligil G.S. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006;313(5790):1137–1140.
306. Xie Q., Khaoustov V.I., Chung C.C., Sohn J., Krishnan B., Lewis D.E., Yoffe B. Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. *Hepatology* 2002; 36: 592–601.
307. Okaya T., Lentsch A.B. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  regulates postischemic liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286(4):G606-G612.
308. Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 2004;351(11):1106-18.
309. Kuboki S., Shin T., Huber N., Eismann T., Galloway E., Schuster R., Blanchard J., Zingarelli B., Lentsch A.B. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology* 2008;47(1):215-224.
310. Kanehiro H., Nakajima Y. Importance of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *J Hepatol* 2007;47(6):784-792.
311. Shin T., Kuboki S., Huber N., Eismann T., Galloway E., Schuster R., Blanchard J., Pritts T.A., Lentsch A.B. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  during hepatic ischemia is age-dependent. *J Surg Res* 2008;147(2):200-205.
312. Teixeira A.R., Molan N.T., Bellodi-Privato M., Coelho A.M., Leite K.R., Seguro A.C., Bacchella T., Machado M.C. Rosiglitazone-enriched diet did not protect liver ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Acta Cir Bras* 2008;23(4):378-383.
313. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-397.
314. Takeda K., Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1-14.
315. Akira S., Sato S. Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis* 2003;35:555-562.
316. O'Neill L.A., Bowie A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007;7:353-364.
317. Toshchakov V., Jones B.W., Perera P.Y., Thomas K., Cody M.J., Zhang S., Williams B.R., Major J., Hamilton T.A., Fenton M.J., Vogel S.N. TLR4, but not TLR2, mediates IFN- $\beta$ -induced STAT1 $\alpha$ / $\beta$ -dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* 2002;3:392-398.
318. Gong Q., Zhang H., Li J.H., Duan L.H., Zhong S., Kong X.L., Zheng F., Tan Z., Xiong P., Chen G., Fang M., Gong F.L. High-mobility group box 1 exacerbates concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J Mol Med (Berl)* 2010;88:1289-1298.
319. Kang J.W., Koh E.J., Lee S.M. Melatonin protects liver against ischemia and reperfusion injury through inhibition of toll-like receptor signaling pathway. *J Pineal Res* 2011;50:403-411.
320. Zhai Y., Shen X.D., O'Connell R., Gao F., Lassman C., Busuttill R.W., Cheng G., Kupiec-Weglinski J.W. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol* 2004;173:7115-7119.

321. Kitazawa T., Tsujimoto T., Kawaratani H., Fukui H. Salvage effect of E5564, toll-like receptor 4 antagonist on d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced acute liver failure in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:1009-1012.
322. Tsung A., Hoffman R.A., Izuishi K., Critchlow N.D., Nakao A., Chan M.H., Lotze M.T., Geller D.A., Billiar T.R. Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells. *J Immunol* 2005;175(11):7661-7668.
323. Shen X.D., Ke B., Zhai Y., Gao F., Busuttill R.W., Cheng G., Kupiec-Weglinski J.W. Toll-like receptor and heme oxygenase-1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant* 2005;5(8):1793-800.
324. Zhai Y., Qiao B., Shen X.D., Gao F., Busuttill R.W., Cheng G., Platt J.L., Volk H.D., Kupiec-Weglinski J.W. Evidence for the pivotal role of endogenous toll-like receptor 4 ligands in liver ischemia and reperfusion injury. *Transplantation* 2008;85(7):1016-1022.
325. Jiang N., Zhang X., Zheng X., Chen D., Zhang Y., Siu L.K., Xin H.B., Li R., Zhao H., Riordan N., Ichim T.E., Quan D., Jevnikar A.M., Chen G., Min W. Targeted gene silencing of TLR4 using liposomal nanoparticles for preventing liver ischemia reperfusion injury. *Am J Transplant* 2011;11(9):1835-1844.
326. Ellett J.D., Atkinson C., Evans Z.P., Amani Z., Balish E., Schmidt M.G., Schnellmann R.G., Chavin K.D. Toll-like receptor 4 knockout mice are protected from endothelial overactivation in the absence of Kupffer cells after total hepatic ischemia/reperfusion. *Liver Transpl* 2011;17(9):1089-1098.
327. Mandal P., Roychowdhury S., Park P.H., Pratt B.T., Roger T., Nagy L.E. Adiponectin and heme oxygenase-1 suppress TLR4/MyD88-independent signaling in rat Kupffer cells and in mice after chronic ethanol exposure. *J Immunol* 2010;185:4928-4937.
328. Shen X.D., Ke B., Zhai Y., Gao F., Tsuchihashi S., Lassman C.R., Busuttill R.W., Kupiec-Weglinski J.W. Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in the donor organ reduces ischemia and reperfusion injury in a murine liver transplantation model. *Liver Transpl* 2007;13(10):1435-1443.
329. Shen X.D., Ke B., Uchida Y., Ji H., Gao F., Zhai Y., Busuttill R.W., Kupiec-Weglinski J.W. Native macrophages genetically modified to express heme oxygenase 1 protect rat liver transplants from ischemia/reperfusion injury. *Liver Transpl* 2011;17(2):201-210.
330. Marra F., Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology* 2009;50(3):957-969.
331. Wang Y., Zhou M., Lam K.S., Xu A. Protective roles of adiponectin in obesity-related fatty liver diseases: mechanisms and therapeutic implications. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53:201-212.
332. Whitehead J.P., Richards A.A., Hickman I.J., Macdonald G.A., Prins J.B. Adiponectin—a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 2006;8:264-280.
333. Wang Y., Lam K.S., Chan L., Chan K.W., Lam J.B., Lam M.C., Hoo R.C., Mak W.W., Cooper G.J., Xu A. Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. *J Biol Chem* 2006;281:16391-16400.
334. Yamauchi T., Nio Y., Maki T., Kobayashi M., Takazawa T., Iwabu M., Okada-Iwabu M., Kawamoto S., Kubota T., Ito Y., Kamon J., Tsuchida A., Kumagai K., Kozono H., Hada Y., Ogata H., Tokuyama K., Tsunoda M., Ide T., Kadowaki T. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 2007;13(3):332-339.
335. Schaffler A., Scholmerich J., Buchler C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue-emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2:273-280.
336. Polyzos S.A., Kountouras J., Zavos C., Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab* 2010;12:365-383.
337. Czaja M.J. Liver injury in the setting of steatosis: crosstalk between adipokine and cytokine. *Hepatology* 2004;40:19-22.

338. Park P.H., Thakur V., Pritchard M.T., McMullen M.R., Nagy L.E. Regulation of Kupffer cell activity during chronic ethanol exposure: role of adiponectin. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21(suppl 3):S30-S33.
339. Xu A., Wang Y., Keshaw H., Xu L.Y., Lam K.S., Cooper G.J. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003;112:91-100.
340. Man K., Zhao Y., Xu A., Lo C.M., Lam K.S., Ng K.T., Ho J.W., Sun C.K., Lee T.K., Li X.L., Fan S.T. Fat-derived hormone adiponectin combined with FTY720 significantly improves small-for-size fatty liver graft survival. *Am J Transplant* 2006;6(3):467-476.
341. Revollo J., Korner A., Mills K. Nampt/PBEF/visfatin regulates insulin secretion in  $\beta$  cell as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metabolism* 2007;6:363-375.
342. Fukuhara A., Matsuda M., Nishizawa M. Visfatin: a protein secret by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005;307:426-430.
343. Kusminsky C.M., McTernan P., Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and type II diabetes. *Clinical Science* 2005;109:243-256.
344. Steppan C.M., Lazar M. The current biology of resistin. *The Journal of Internal Medicine* 2004;255:439-447.
345. Pagano C., Soardo G., Pilon C., Milocco C., Basan L., Milan G., Donnini D., Faggian D., Mussap M., Plebani M., Avellini C., Federspill G., Sechi L.A., Vettor R. Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(3):1081-1086.
346. Bahr M.J., Ockenga J., Böker K.H., Manns M.P., Tietge U.J. Elevated resistin levels in cirrhosis are associated with the proinflammatory state and altered hepatic glucose metabolism but not with insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E199-E206.
347. Jia S.H., Li Y., Parodo J., Kapus A., Fan L., Rotstein O.D., Marshall J.C. Pre-B cell colonyenhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest* 2004;113(9):1318-1327.
348. Moschen A.R., Kaser A., Enrich B., Mosheimer B., Theurl M., Niederegger H., Tilg H. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating proprieties. *J Immunol* 2007;178(3):1748-1758.
349. Kukla M., Ciupinska-Kajor M., Kajor M., Wylezol M., Zwirska-Korcza K., Hartleb M., Berdowska A., Mazur W. Liver visfatin expression in morbidly obese patients with nonalcoholic fatty liver disease undergoing bariatric surgery. *Pol J Pathol* 2010;61(3):147-153.
350. Jarrar M.H., Baranova A., Collantes R., Ranard B., Stepanova M., Bennett C., Fang Y., Elariny H., Goodman Z., Chandhoke V., Younossi Z.M. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27(5):412-421.
351. Gonzalez-Gay M.A., Vazquez-Rodriguez T.R., Garcia-Unzueta M.T., Berja A., Miranda-Filloo J.A., de Matias J.M. Visfatin is not associated with inflammation or metabolic syndrome in patients with severe rheumatoid arthritis undergoing anti-TNF-alpha therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2010;28:56-62.
352. Yaseen F., Jaleel A., Aftab J., Zuberi A., Alam E. Circulating levels of resistin, IL-6 and lipid profile in elderly patients with ischemic heart disease with and without diabetes. *Biomark Med* 2012;6(1):97-102.
353. Lim S.Y., Davidson S.M., Paramanathan A.J., Smith C.C., Yellon D.M. Hausenloy D.J. The novel adipocytokine visfatin exerts direct cardioprotective effects. *J Cell Mol Med* 2008;12(4):1395-1403.
354. Gao J., Chang Chua C., Chen Z., Wang H., Xu X., Hamdy R., McMullen J.R., Shioi T., Izumo S., Chua B.H. Resistin, an adipocytokine, offers protection against acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43(5):601-609.
355. Alexandre de Artiñano A., Miguel Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br J Nutr* 2009;102(9):1246-1253.
356. Bray G.A. The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc* 1977;36(2):148-153.

357. Zhang A., Wang Y., Xie H., Zheng S. Calcitriol inhibits hepatocyte apoptosis in rat allograft by regulating apoptosis-associated genes. *International Immunopharmacology* 2007;7:1122–1128.
358. Kamada N., Calne R.Y. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 1979;28(1):47-50.
359. Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, Zhao D, Zaky J, Melinek J, Lassman CR, Kolls JK, Alam J, Ritter T, Volk HD, Farmer DG, Ghobrial RM, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 1999;104(11):1631-1639
360. Sun Z, Klein AS, Radaeva S, Hong F, El-Assal O, Pan HN, Jaruga B, Batkai S, Hoshino S, Tian Z, Kunos G, Diehl AM, Gao B. In vitro interleukin-6 treatment prevents mortality associated with fatty liver transplants in rats. *Gastroenterology* 2003;125(1):202-215.
361. Peralta C., Bartrons R., Riera L., Manzano A., Xaus C., Gelpi E., Rosello-Catafau J. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279: G163-G171.
362. Tolliver B.K., Ho L.B., Fox L.M., Berger S.P. Necessary role for ventral tegmental area adenylate cyclase and protein kinase A in induction of behavioral sensitization to intraventricular tegmental area amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:38-47.
363. Avendano CE, Billman GE. Effect of interventions that increase cyclic AMP levels on susceptibility to ventricular fibrillation in unanesthetized dogs. *Eur J Pharmacol* 1994;255:99-109.
364. Franco-Gou R., Peralta C., Massip-Salcedo M., Xaus C., Serafin A., Rosello-Catafau J. Protection of reduced-size liver for transplantation. *Am J Transplant* 2004;4:1408-1420.
365. Miao H.L., Qiu Z.D., Hao F.L., Bi Y.H., Li M.Y., Chen M., Chen N.P., Zhou F. Significance of MD-2 and MD-2B expression in rat liver during acute cholangitis. *World J Hepatol* 2010;2(6):233–238.
366. Yang C.H., Zhang M.S., Li J., Zhang X.P., Wang H., Hao Y.B. Monophosphoryl lipid A-induced delayed preconditioning in rat small intestine is mediated by calcitonin gene-related peptide. *Dig Dis Sci* 2011;56:1333–1341.
367. Zaouali M.A., Reiter R.J., Padriisa-Altes S., Boncompagni E., Garcia J.J., Ben Abnennebi H., Freitas I., Garcia-Gil F.A., Rosello-Catafau J. Melatonin protects steatotic and nonsteatotic liver grafts against cold ischemia and reperfusion injury. *J Pineal Res* 2011;50(2):213-221.
368. Liu J., Guo M., Zhang D., Cheng S., Liu M., Ding J., Scherer P.E., Liu F., Lu X.Y. Adiponectin is critical in determining susceptibility to depressive behaviors and has antidepressant like activity. *PNAS* 2012;109(30):12248–12253.
369. Park B.S., Jin S.H., Park J.J., Park J.W., Namgoong I.S., Kim Y.I., Lee B.J., Kim J.G. Visfatin induces sickness response in the brain. *PLoS One* 2011;6:1–68.
370. Hong S.B., Huang Y., Moreno-Vinasco L., Sammani S., Moitra J., Barnard J.W., MA S.F., Mirzapourzova T., Evenoski C., Reeves R.R., Chiang E.T., Lang G.D., Husain A.N., Dudek S.M., Jacobson J.R., Ye S.Q., Lussier Y.A., Garcia J.G. Essential role of pre-B-cell colony enhancing factor in ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:605–617.
371. Stepan C.M., Bailey S.T., Bhat S., Brown E.J., Banerjee R.R., Wright C.M., Patel H.R., Ahima R.S., Lazar M.A. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307–312.
372. Li Y., Wang Y., Li Q., Chen Y., Sun S. Effect of resistin on vascular endothelium secretion dysfunction in rats. *Endothelium* 2007;14:207–214.
373. Baykal A., Kaynaroglu V., Demirpençe E., Kiliç K., Sayek I., Sanaç Y. Experimental study of the effect of adrenaline tolerance on intestinal ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 1998;85(7):947-950.

374. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95(2):351-358.
375. Colletti L.M., Burtch G.D., Remick D.G., Kunkel S.L., Strieter R.M., Guice K.S., Oldham K.T., Campbell D.A. The production of tumor necrosis factor alpha and the development of a pulmonary capillary injury following hepatic ischemia/reperfusion. *Transplantation* 1990;49(2):268-272.
376. Schmekel B., Karlsson S.E., Linden M., Sundstrom C., Tegner H., Venge P. Myeloperoxidase in human lung lavage. I. A marker of local neutrophil activity. *Inflammation* 1990;14(4):447-450.
377. Virág L., Szabó E., Bakondi E., Bai P., Gergely P., Hunyadi J., Szabó C. Nitric oxide-peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Exp Dermatol* 2002;11(3):189-202.
378. Greenacre S.A., Evans P., Halliwell B., Brain S.D. Formation and loss of nitrated proteins in peroxynitrite-treated rat skin in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262(3):781-786.
379. Hortelano S., Genaro A., Boscá L. Phorbol esters induce nitric oxide synthase activity in rat hepatocytes. Antagonism with the induction elicited by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1992;267(35):24937-24940.
380. Brigelius R., Muckel C., Akerboom T.P., Sies H. Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* 1983;32:2529-2534.
381. Corte E.D., Stirpe F. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem J* 1972;126(3):739-745.
382. Sun Y., Oberley L.W., Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-503.
383. Sugino K., Yamada K., Kawasaki T. Analysis of adenine nucleotides by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1986;361:427-430.
384. Scales W.E., Campbell D.A., Green M.E., Remick D.G. Hepatic ischemia/reperfusion injury: importance of oxidant/tumor necrosis factor interactions. *Am J Physiol* 1994;267:G1122-1127.
385. Selzner N., Selzner M., Odermatt B., Tian Y., Van Rooijen N., Clavien P.A. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-alpha/IL-6 in mice. *Gastroenterology* 2003;124(3):692-700.
386. Bhattacharya N., Dufour J.M., Vo M.N., Okita J., Okita R., Kim K.H. Differential effects of phthalates on the testis and the liver. *Biol Reprod* 2005;72(3):745-754.
387. Vázquez-Gil M.J., Mesonero M.J., Flores O., Criado M., Hidalgo F., Arévalo M.A., Sanchez-Rodriguez A., Tunon M.J., Lopez-Novoa J.M., Esteller A. Sequential changes in redox status and nitric oxide synthases expression in the liver after bile duct ligation. *Life Sci* 2004;75(6):717-732.
388. Uchinami H., Yamamoto Y., Kume M., Yonezawa K., Ishikawa Y., Taura K., Nakajima A., Hata K., Yamaoka Y. Effect of heat shock preconditioning on NF-kappaB/I-kappaB pathway during I/R injury of the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282(6):G962-G971.
389. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-408.
390. Cottart C.H., Do L., Blanc M.C., Vaubourdoles M., Descamps G., Durand D., Galen F.X., Clot J.P. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999;29(3):809-813.
391. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119(3):493-501.
392. Viera L., Ye Y.Z., Estévez A.G., Beckman J.S. Immunohistochemical methods to detect nitrotyrosine. *Methods Enzymol* 1999;301:373-381.

393. Zingarelli B., Szabó C., Salzman A.L. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. *Gut* 1999;45(2):199-209.
394. Hers H.G., Hue L. Gluconogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu Rev Biochem* 1983;52:617-653.
395. Kobayashi H., Nonami T., Kurokawa T., Takeuchi Y., Harada A., Nakao A., Takagi H. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995;59(6):772-779.
396. Williams M.W., Taft C.S., Ramnauth S., Zhao Z.Q., Vinten-Johansen J. Endogenous nitric oxide (NO) protects against ischaemia-reperfusion injury in the rabbit. *Cardiovasc Res* 1995;30(1):79-86.
397. Stamler J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994;78:931-936.
398. Grisham M.B., Jourdain D., Wink D.A. Nitric oxide. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999;276:G315-G321.
399. MacMillan-crow L.A., Crow J.P., Thompson J.A. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 1998;37:1613-1622.
400. Zhang X.P., Hintze T.H. cAMP signal transduction induces eNOS activation by promoting PKB phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H2376-H2384.
401. Nogueira-Machado J.A., Lima E Silva F.C., Lima E Silva R., Medina L.O., Costa D.C., Chaves M.M. Effect in vitro of cyclic nucleotides-elevating agents on nitric oxide production by human granulocytes from type 2-diabetic patients. *Diabetes Metab* 2002;28(1):45-50.
402. Jaeschke H. Xanthine oxidase-induced oxidant stress during hepatic ischemia-reperfusion: are we coming full circle after 20 years? *Hepatology* 2002;36(3):761-763.
403. Nagayama M, Katsuramaki T, Kimura H, Isobe M, Meguro M, Matsuno T, Nui A, Hirata K. Prediction of graft viability from non-heart-beating donor pigs using hepatic microdialysate hypoxanthine levels. *J Surg Res* 2002;107(2):210-218.
404. Net M., Valero R., Almenara R., Rull R., Gonzalez F.J., Taurá P., Lopez-Boado M.A., Deulofeu R., Elena M., Capdevila L., Cabrer C., Visa J., García-Valdecasas J.C. Hepatic xanthine levels as viability predictor of livers procured from non-heart-beating donor pigs. *Transplantation* 2001;71(9):1232-1237.
405. Noel A.A., Hobson R.W. 2nd, Durán W.N. Platelet-activating factor and nitric oxide mediate microvascular permeability in ischemia-reperfusion injury. *Microvasc Res* 1996;52(3):210-220.
406. Kobayashi K., Hernandez L.D., Galán J.E., Janeway C.A. Jr, Medzhitov R., Flavell R.A. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002;110(2):191-202.
407. Sano T., Izuishi K., Hossain M.A., Inoue T., Kakinoki K., Hagiike M., Okano K., Masaki T., Suzuki Y. Hepatic preconditioning using lipopolysaccharide: association with specific negative regulators of the Toll-like receptor 4 signaling pathway. *Transplantation* 2011;91(10):1082-1089.
408. Shoelson S.E., Herrero L., Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007;132(6):2169-80.
409. Bertolani C., Sancho-Bru P., Failli P., Bataller R., Aleffi S., DeFranco R., Mazinghi B., Romagnani P., Milani S., Ginés P., Colmenero J., Parola M., Gelmini S., Tarquini R., Laffi G., Pinzani M., Marra F. Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 2006;169(6):2042-2053.
410. Roth C.L., Elfers C.T., Figlewicz D.P., Melhorn S.J., Morton G.J., Hoofnagle A., Yeh M.M., Nelson J.E., Kowdley K.V. Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and Toll-like receptor activation. *Hepatology* 2012;55(4):1103-1111.
411. Fujikawa T., Hirata T., Wada A., Kawamura N., Yamaguchi Y., Fujimura K., Ueda T., Yurugi Y., Soya H., Nishibe S. Chronic administration of Eucommia leaf stimulates metabolic function of rats across several organs. *Br J Nutr* 2010;104(12):1868-1877.

412. Baranova A., Gowder S.J., Schlauch K., Elariny H., Collantes R., Afendy A., Ong J.P., Goodman Z., Chandhoke V., Younossi Z.M. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg* 2006;16(9):1118-1125.
413. Jiang L.L., Li L., Hong X.F., Li Y.M., Zhang B.L. Patients with nonalcoholic fatty liver disease display increased serum resistin levels and decreased adiponectin levels. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21(6):662-666.
414. Liu C.M., Zheng G.H., Ming Q.L., Sun J.M., Cheng C. Protective effect of quercetin on lead-induced oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in rat liver via the IRE1/JNK and PI3K/Akt pathway. *Free Radic Res* 2013 Mar;47(3):192-201.
415. Lage R., Diéguez C., Vidal-Puig A., López M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med* 2008;14(12):539-549.
416. Adachi M., Brenner D.A. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Hepatology* 2008;47(2):677-685.

Los artículos originados directamente a partir de la presente Tesis son los siguientes:

- **Jiménez-Castro MB**, Casillas-Ramírez A, Massip-Salcedo M, Elías-Miro M, Serafín, A, Rimola A, Rodés J, Peralta C. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in rat steatotic liver transplantation. *Liver Transplantation* 2011;17(9):1099-1110.
- **Jiménez-Castro MB**, Elias-Miro M, Mendes-Braz M, Lemoine A, Rimola A, Rodes J, Casillas-Ramírez A, Peralta C. Tauroursodeoxycholic acid affects PPAR $\gamma$  y TLR4 in steatotic liver transplantation. *American Journal of Transplantation* 2012;12(12):3257-3271.
- Casillas-Ramírez A, **Jiménez-Castro MB**, Massip-Salcedo M, Rimola A, Rodés J, Peralta C. AICAR y Trimetazidine in University of Wisconsin solution are effective to increase Supervivencia in recipients transplanted with steatotic livers. *Immuno-Gastroenterology* 2012;1(1):58-68.
- **Jiménez-Castro MB**, Casillas-Ramírez A, Mendes-Braz M, Massip-Salcedo M, Gracia-Sancho J, Elias-Miro M, Rodes J, Peralta C. Adiponectin y resistin protect steatotic livers undergoing transplantation. *Journal of Hepatology* 2013;59(6):1208-1214.
- Peralta C, **Jiménez-Castro MB**, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia y reperfusión injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *Journal of Hepatology* 2013;59(5):1094-1106.
- **Jiménez-Castro MB**, Elias-Miro M, Peralta C. Experimental models in liver surgery. In: *Hepatic Surgery Book*. InTech. 2013;121-166. ISBN: 978-953-51-0965-5.
- **Jiménez-Castro MB**, Elias-Miro M, Peralta C. Expanding the donor pool in liver transplantation: Influence of ischemia-reperfusión. In: *Organ Donation y Organ Donors: Issues, Changes y Perspectives Book*. NOVA Science Publishers. 2013;41-82. ISBN: 978-1-62618-853-2.

- Casillas-Ramirez A, **Jiménez-Castro MB**, Massip-Salcedo M, Elias-Miro M, Peralta C. Mecanismos de protección de estrategias terapéuticas basados en la inhibición de PPAR $\gamma$  en el trasplante de hígados esteatósicos. *Evidencia Medica e Investigacion en Salud* 2013;6(2):47-54.
- **Jiménez-Castro MB**, Elias-Miro M, Peralta C. Neurological complications in liver transplantation. In: *Liver Failure: Etiologies, Neurological Complications y Emerging Therapies Book*. NOVA Science Publishers. 2013:15-44. ISBN: 978-1-62808-507-5.

A continuación se adjunta también la lista de artículos relacionados estrechamente con el tema de esta Tesis:

- Elias-Miro M, Massip-Salcedo M, **Jiménez-Castro MB**, Peralta C. Does adiponectin benefit in steatotic liver transplantation. *Liver Transplantation* 2011;17(9):993-1004.
- Elias-Miro M, **Jiménez-Castro MB**, Peralta C. Ischemia-Reperfusion injury associated with liver transplantation in 2011: Past y Future. In: *Liver Transplantation – Basic Issues Book*. InTech. 2012:21-56. ISBN: 978-953-51-0016-4.
- Mendes-Braz M, Elias-Miro M, **Jiménez-Castro MB**, Casillas-Ramírez A, Ramalho FS, Peralta C. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models. *Journal of Biomedicine y Biotechnology* 2012;2012:298657.
- Elias-Miro M, **Jiménez-Castro MB**, Mendes-Braz M, Casillas-Ramírez A, Peralta C. The current knowledge of the role of PPAR in hepatic ischemia-reperfusion injury. *PPAR Research* 2012;2012:802384.
- Elias-Miro M, Massip-Salcedo M, Raila J, Schwigert F, Mendes-Braz M, Ramalho FS, **Jiménez-Castro MB**, Casillas-Ramírez A, Bermudo R, Rimola A, Rodes J, Peralta C. Retinol binding protein 4 y retinol in steatotic y nonsteatotic rat livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia/reperfusion. *Liver Transplantation* 2012;18(10):1198-1208.
- Elias-Miro M, **Jiménez-Castro MB**, Peralta C. Adenosine triphosphate in experimental liver surgery. In: *Adenosine Triphosphate: chemical Properties, Biosynthesis y Functions in Cells Book*. NOVA Science Publishers. 2013;123-142. ISBN: 978-1-62417-891-7.
- Elias-Miro M, **Jiménez-Castro MB**, Rodés J, Peralta C. Current knowledge on oxidative stress in hepatic ischemia-reperfusion. *Free Radical Research* 2013;47(8):555-568.

- 
- Elias-Miro M, Mendes-Braz M, Cerejjo R, Villarroya F, **Jiménez-Castro MB**, Gracia-Sancho J, Guixé-Muntet S, Massip-Salcedo M, Domingo JC, Bermudo R, Rodés J, Peralta C. Resistin y visfatin in steatotic y non-steatotic livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. *Journal of Hepatology* 2014;60(1):87-95.
  - Mendes-Braz M, Elias-Miro M, Kleuser B, Fayyaz S, **Jiménez-Castro MB**, Massip-Salcedo M, Gracia-Sancho J, Ramalho F, Rodés J, Peralta C. The effects of glucose y lipids in steatotic y non-steatotic livers in condition of partial hepatectomy under under ischemia-reperfusion. *Liver International* 2014;



*Artículos originados directamente a partir de la presente Tesis*



## ORIGINAL ARTICLE

## Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate in Rat Steatotic Liver Transplantation

Monica B. Jimenez-Castro,<sup>1\*</sup> Arani Casillas-Ramirez,<sup>1\*</sup> Marta Massip-Salcedo,<sup>1,2</sup>

Maria Elias-Miro,<sup>1</sup> Anna Serafin,<sup>3</sup> Antoni Rimola,<sup>1,2,4</sup> Juan Rodes,<sup>1,2,4</sup> and Carmen Peralta<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Esther Koplowitz Center, August Pi i Sunyer Institute for Biomedical Research, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Center for Biomedical Research in Hepatic and Digestive Diseases, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Platform of Laboratory Animal Applied Research, Barcelona Scientific Park, Barcelona, Spain; and <sup>4</sup>Liver Unit, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Numerous steatotic livers are discarded as unsuitable for transplantation (TR) because of their poor tolerance of ischemia/reperfusion (I/R). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-elevating agents protect against I/R injury both in nonsteatotic livers that have been removed from non-heart-beating donors and subjected to warm ischemia or cold ischemia (CI) and in perfused, isolated livers. Ischemic preconditioning (PC), which is based on brief periods of I/R, protects steatotic liver grafts, but the mechanism that is responsible is poorly understood. This study examines the role of cAMP in the vulnerability shown by steatotic livers to TR-associated I/R injury and the benefits of PC in this situation. Steatotic livers with or without PC were transplanted into Zucker rats. The hepatic levels of cAMP were measured and altered pharmacologically. Our results indicate that the cAMP levels in the nonsteatotic liver grafts were similar to those found in a sham group. However, high cAMP levels were observed in steatotic liver grafts. The blockage of cAMP generation by adenylyl cyclase inhibitor pre-treatment or PC had the following results: reduced hepatic injury and increased survival of steatotic graft recipients; greater preservation of adenosine triphosphate (ATP) and reduced lactate accumulation throughout CI. This blockade of cAMP by a nitric oxide-dependent mechanism protected steatotic liver grafts against oxidative stress and microvascular disorders after reperfusion. In conclusion, cAMP blocking-based strategies could protect patients against the inherent risk of steatotic liver failure after TR. *Liver Transpl* 17:1099-1110, 2011. © 2011 AASLD.

Received March 3, 2011; accepted June 5, 2011.

The increasing demand for organs for transplantation (TR) has led to the acceptance of steatotic livers despite their poor tolerance of ischemia/reperfusion (I/R) injury.<sup>1,2</sup> The use of these marginal organs is associated with an increased risk of graft dysfunction or

failure after TR.<sup>2</sup> In addition, many steatotic livers are discarded, and this exacerbates the critical shortage of donor livers.<sup>1</sup> Therefore, minimization of the adverse effects of I/R on steatotic liver TR is urgently needed.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Abbreviations: ADP, adenosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; cAMP, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate; CI, cold ischemia; cNOS, constitutive nitric oxide synthase; DBcAMP, dibutyl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate; GSH, glutathione; iNOS, inducible nitric oxide synthase; I/R, ischemia/reperfusion; Ln, lean; L-NAME, N(G)-nitro-L-arginine methyl ester; MDA, malondialdehyde; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NO, nitric oxide; Ob, obese; ONOO<sup>-</sup>, peroxynitrite; PC, ischemic preconditioning; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; SQ22536, 9-(tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine; TR, transplantation; XDH, xanthine dehydrogenase; XOD, xanthine oxidase.

This research was supported by the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs (project grant PI060021), the Spanish Ministry of Science and Innovation (project grant BFU2009-07410 and Torres Quevedo research contract PTQ-08-03-07880 to Anna Serafin), and ACC10 (project grant VALTEC08-2-0033). Arani Casillas-Ramirez received a fellowship from the Agency for the Administration of University and Research Grants.

\*These authors contributed equally to this work.

Address reprint requests to Carmen Peralta, M.D., Esther Koplowitz Center, August Pi i Sunyer Institute for Biomedical Research, Roselló 149-153, 3rd floor, Office 3.8, Barcelona, Spain E-08036. Telephone: +34 93 227 5400, extension 4177; FAX: +34 93 227 9240; E-mail: cperalta@clinic.ub.es

DOI 10.1002/lt.22359

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

LIVER TRANSPLANTATION.DOI 10.1002/lt. Published on behalf of the American Association for the Study of Liver Diseases



## Tauroursodeoxycholic Acid Affects PPAR $\gamma$ and TLR4 in Steatotic Liver Transplantation

M. B. Jiménez-Castro<sup>a</sup>, M. Elias-Miro<sup>a</sup>,  
M. Mendes-Braz<sup>a,b</sup>, A. Lemoine<sup>c</sup>, A. Rimola<sup>d,e</sup>,  
J. Rodés<sup>a,e</sup>, A. Casillas-Ramirez<sup>a,f</sup>  
and C. Peralta<sup>a,d,\*†</sup>

<sup>a</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBPAs), Barcelona, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

<sup>c</sup>APHP, Biochimie et Oncogénétique Moléculaire, Inserm U1004/Université Paris 11, Institut du Foie, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

<sup>d</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain

<sup>e</sup>Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

\*Corresponding author: Carmen Peralta,

cperalta@clinic.ub.es

†Both authors contributed equally to this work.

Numerous steatotic livers are discarded for transplantation because of their poor tolerance to ischemia-reperfusion (I/R). We examined whether tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), a known inhibitor of endoplasmic reticulum (ER) stress, protects steatotic and nonsteatotic liver grafts preserved during 6 h in University of Wisconsin (UW) solution and transplanted. The protective mechanisms of TUDCA were also examined. Neither unfolded protein response (UPR) induction nor ER stress was evidenced in steatotic and nonsteatotic liver grafts after 6 h in UW preservation solution. TUDCA only protected steatotic livers grafts and did so through a mechanism independent of ER stress. It reduced proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and damage. When PPAR $\gamma$  was activated, TUDCA did not reduce damage. TUDCA, which inhibited PPAR $\gamma$ , and the PPAR $\gamma$  antagonist treatment up-regulated toll-like receptor 4 (TLR4), specifically the TIR domain-containing adaptor inducing IFN $\beta$  (TRIF) pathway. TLR4 agonist treatment reduced damage in steatotic liver grafts. When TLR4 action was inhibited, PPAR $\gamma$  antagonists did not protect steatotic liver grafts. In conclusion, TUDCA reduced PPAR $\gamma$  and this in turn up-regulated the TLR4 pathway, thus protecting steatotic liver grafts. TLR4 activating-based strategies could reduce the inherent risk of steatotic liver failure after transplantation.

**Key words:** ER stress, PPAR- $\gamma$ , steatotic liver grafts, TLR4, transplantation, TUDCA

**Abbreviations:** ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ATF4, activating transcription factor 4; ATF6, activating transcription factor 6; CHOP, C/EBP homologous protein; eIF2 $\alpha$ , eukaryotic translation initiation factor 2 subunit  $\alpha$ ; ER, endoplasmic reticulum; GRP78, 78-kDa glucose-regulated/binding immunoglobulin protein; GW9662, 2-chloro-5-nitro-N-phenylbenzamide; HTK, histidine tryptophan ketoglutarate; IRE1, inositol-requiring enzyme 1; I/R, ischemia-reperfusion; Ln, lean; MDA, malondialdehyde; MPL-A, monophosphoryl lipid A; MyD88, myeloid differentiation factor 88; Ob, obese; PPAR- $\gamma$ , peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ ; Rosiglitazone, (RS)-5-[4-(2-[methyl(pyridine-2-yl)amino]ethoxy)benzyl]thiazolidine-2,4-dione; ROS, reactive oxygen species; TLR4, toll-like receptor 4; TR, transplantation; TRAF2, tumor necrosis factor-associated factor 2; TRIF, TIR domain-containing-adaptor inducing IFN- $\beta$ ; TUDCA, tauroursodeoxycholic acid; UPR, unfolded protein response; UW, University of Wisconsin; XBP-1, X-box-binding protein 1.

Received 31 May 2012, revised 13 July 2012 and accepted for publication 30 July 2012

### Introduction

Ischemia-reperfusion (I/R) injury is a major cause of early graft dysfunction after liver transplantation. Steatosis is currently estimated to be present in up to 50% of deceased donor livers and is recognized as the key donor variable predicting posttransplant outcomes (1–3). The use of steatotic livers for transplantation is associated with increased risk of graft dysfunction or failure after surgery. In addition, many steatotic livers are discarded for transplantation, exacerbating the critical shortage of donor livers (1,4,5).

Endoplasmic reticulum (ER) stress is emerging as an important component of inflammatory responses in the liver associated with I/R processes (6,7). In response to ER stress, a signal transduction cascade termed “the unfolded protein response (UPR)” is induced (8,9). The UPR has three branches: inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), PKR-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor (ATF6). These proteins are normally held in inactive states in ER membranes by binding to intra-ER chaperones, particularly the 78-kDa glucose-regulated/binding immunoglobulin protein (GRP78). When injury is excessive, these ER stress



## Adiponectin and resistin protect steatotic livers undergoing transplantation

Mónica B. Jiménez-Castro<sup>1,†</sup>, Araní Casillas-Ramírez<sup>1,2,†</sup>, Mariana Mendes-Braz<sup>1</sup>, Marta Massip-Salcedo<sup>1,3</sup>, Jordi Gracia-Sancho<sup>4</sup>, María Elias-Miró<sup>1</sup>, Juan Rodés<sup>1,5</sup>, Carmen Peralta<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Campus de la Salud, Universidad La Salle Victoria, Cd. Victoria, Mexico; <sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Liver Unit, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Transplantation

**Background & Aims:** Numerous steatotic livers are discarded for transplantation because of their poor tolerance to ischemia-reperfusion. Controversial roles for adiponectin and related adipocytokines visfatin and resistin have been described in different liver pathologies, nevertheless it is unknown their possible implication in ischemia-reperfusion injury associated with liver transplantation. Our study aimed at characterizing the role of the adiponectin-derived molecular pathway in transplantation with steatotic and non-steatotic liver grafts.

**Methods:** Steatotic and non-steatotic liver transplantation was carried out and the hepatic levels of adiponectin, visfatin and resistin were measured and modulated either pharmacologically or surgically.

**Results:** Steatotic liver grafts exhibited downregulation of both adiponectin and resistin when subjected to transplantation. Adiponectin pre-treatment only protected steatotic grafts and did it so through a visfatin-independent and resistin-dependent mechanism. Adiponectin-derived resistin accumulation activated the PI3K/Akt pathway, unravelling AMPK as an upstream mediator of adiponectin's actions in steatotic grafts. Strategies aimed at increasing adiponectin including either AMPK activators or the induction of ischemic preconditioning (which activates AMPK) increased resistin accumulation, prevented the downregulation of PI3K/Akt pathway and protected steatotic liver grafts. Conversely, PI3K/Akt pathway upregulation and hepatic protection induced by adiponectin were abolished when resistin action was inhibited.

**Conclusions:** Our findings reveal a new protective pathway in steatotic liver transplantation, namely AMPK-adiponectin-resistin-PI3K/Akt, which may help develop new strategies aimed at increasing either adiponectin or resistin in the steatotic liver undergoing transplant to ultimately increase organ donor pool and reduce waiting list.

© 2013 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

Owing to the discrepancy between organ donation and the demand for liver transplantation, expanding the liver donor pool is of vital importance. The potential use of steatotic livers, which are among the most common types of organs from extended-criteria donors, has become a major focus of investigation for transplantation. Unfortunately, more than 50% of livers that are considered as not suitable for transplantation due to their pathological conditions are discarded because of the presence of fatty infiltration. Steatotic livers are more susceptible to ischemia/reperfusion (I/R) injury, and when they are transplanted, they lead to poorer outcomes in comparison with non-steatotic livers. Indeed, the use of steatotic livers for transplantation is associated with an increased risk of primary non-function or dysfunction after surgery [1,2].

It has been suggested that the pathogenesis of fatty liver diseases is associated with deregulated production and release of novel adipocytokines, including adiponectin, visfatin and resistin [3]. Since the discovery of adiponectin, diverse experimental and clinical studies have demonstrated that adiponectin mediates anti-inflammatory effects [4–6]. To the best of our knowledge, only 2 studies have reported a role for adiponectin in steatotic livers subjected to I/R. Massip-Salcedo *et al.* [7] showed injurious effects of adiponectin on steatotic livers subjected to 60 min of warm ischemia. However, Man *et al.* [4] demonstrated the anti-inflammatory effects of adiponectin in small fatty grafts subjected to 40 min of cold ischemia. The aforementioned data suggest that the role of adiponectin depends on the surgical conditions. Therefore, one of the aims of the present study was to determine whether adiponectin should be inhibited or activated

**Keywords:** Adiponectin; Resistin; Visfatin; Steatotic liver grafts; Liver transplantation.

Received 22 March 2013; received in revised form 19 June 2013; accepted 8 July 2013; available online 16 July 2013

\* Corresponding author. Address: Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Esther Koplowitz Center, Roselló 149-153, 3rd floor, office 3.8, E-08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275400x4177; fax: +34 933129406. E-mail address: cperalta@clinic.ub.es (C. Peralta).

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

**Abbreviations:** I/R, ischemia-reperfusion; IC, ischemic preconditioning; Ob, obese; Ln, lean; TR, transplantation; UW, University of Wisconsin; AMPK, AMP-activated protein kinase; AICAR, aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase;  $\alpha$ -GST, alpha-glutathione S-transferase; H&E, hematoxylin and eosin; ANOVA, analysis of variance.





## Hepatic ischemia and reperfusion injury: Effects on the liver sinusoidal milieu

Carmen Peralta<sup>1</sup>, Mónica B. Jiménez-Castro<sup>1</sup>, Jordi Gracia-Sancho<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain

Review

### Summary

Ischemia-reperfusion injury is an important cause of liver damage occurring during surgical procedures including hepatic resection and liver transplantation, and represents the main underlying cause of graft dysfunction post-transplantation. Cellular and biochemical processes occurring during hepatic ischemia-reperfusion are diverse and complex, and include the deregulation of the healthy phenotype of all liver cellular components. Nevertheless, a significant part of these processes are still unknown or unclear. The present review aims at summarizing the current knowledge in liver ischemia-reperfusion, but specifically focusing on liver cell phenotype and paracrine interaction deregulations. Moreover, the most updated therapeutic strategies including pharmacological, genetic and surgical interventions, as well as some of the scientific controversies in the field will be described. Finally, the importance of considering the subclinical situation of liver grafts when translating basic knowledge to the bedside is discussed.

© 2013 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### Deregulation of hepatic cell phenotype due to ischemia-reperfusion injury

Ischemia-reperfusion (I/R) injury is an important cause of liver damage during surgical procedures such as hepatic resection

**Keywords:** Transplantation; KLF2; Endothelium; Hepatocyte; LSEC.

Received 30 April 2013; received in revised form 17 June 2013; accepted 18 June 2013

\* Corresponding author. Address: Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), C/Roselló 153, 4th floor, room 4.5, 08036 Barcelona, Spain. Tel: +34 932275400x4306; fax: +34 932279856.

E-mail address: jgracia@clinic.ub.es (J. Gracia-Sancho).

**Abbreviations:** I/R, ischemia-reperfusion; LSEC, liver sinusoidal endothelial cells; KC, Kupffer cells; HSC, hepatic stellate cells; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; ROS, reactive oxygen species; NO, nitric oxide; ET, endothelin; TXA<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub>; KLF2, Kruppel-like factor 2; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; TNF, tumour necrosis factor; IL, interleukin; INF- $\gamma$ , interferon-gamma; ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1; MIP-2, macrophage inflammatory protein-2; ENA-78, epithelial neutrophil activating protein-78; CINC, cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GdCl<sub>3</sub>, gadolinium chloride; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa B; HO-1, heme oxygenase-1; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor.

and liver transplantation. I/R injury is a biphasic phenomenon whereby cellular damage due to hypoxia and lack of biomechanical stimulus is accentuated upon restoration of oxygen delivery and shear stress. The signaling events contributing to local hepatocellular damage are diverse and complex, and involve the interaction between hepatocytes, liver sinusoidal endothelial cells (LSEC), Kupffer cells (KC), hepatic stellate cells (HSC), as well as infiltrating neutrophils, macrophages, and platelets [1–4]. It is important to note that I/R injury represents the main reason of liver graft dysfunction post-transplantation, independently of liver basal characteristics, being even more relevant when using organs from extended-criteria donors.

Hepatocytes are very much negatively affected by I/R, especially when ischemia is normothermic. Most early changes in the anoxic hepatocytes occur in the mitochondria. The lack of O<sub>2</sub>, as a terminal electron carrier for the mitochondrial respiratory chain, immediately interrupts the electron flow causing the respiratory chain to become reduced. Since mitochondria are no longer accepting electrons from substrates, a reduction in pyridine nucleotides occurs, resulting in an increase in the intracellular NADH/NAD<sup>+</sup> ratio. The abruptness of oxidative phosphorylation rapidly leads to cellular ATP depletion, acceleration of glycolysis, increased formation of lactate, and alterations on H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> homeostasis, altogether inducing serious deleterious effects on the hepatocyte. Ischemia also leads to a considerable increase in cAMP, which is an important factor in glucose metabolism. cAMP, through the action of cAMP-dependent protein kinase, leads to the phosphorylation/deregulation of key enzymes involved in the control of carbohydrate metabolism [5,6]. Reperfusion injury mainly derives from toxic reactive oxygen species (ROS) generated upon reintroduction of O<sub>2</sub> to ischemic tissues. ROS are produced from both intracellular and extracellular sources, being the mitochondria their major source in liver cells [7] (Fig. 1).

Liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) form the vascular wall of the hepatic sinusoid, lack an organized basal membrane, and the cytoplasm of these flattened cells is penetrated by open fenestrations that form clusters called sieve plates, making the hepatic microvascular endothelium discontinuous [8]. LSEC play important protective roles controlling vascular homeostasis, inflammation, vascular tone, and toxicants clearance. Thus, maintenance of a healthy LSEC phenotype is indispensable to minimize any type of liver injury.





# AICAR and Trimetazidine in University of Wisconsin Solution are Effective to Increase Survival in Recipients Transplanted with Steatotic Livers

Araní Casillas-Ramírez<sup>1\*</sup>, María Elias-Miró<sup>1\*</sup>, Mónica B. Jiménez-Castro<sup>1</sup>, Marta Massip-Salcedo<sup>2</sup>, Antoni Rimola<sup>2,3</sup>, Juan Rodés<sup>1,2</sup>, Carmen Peralta<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona (IDIBAPS), Spain; <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

## Abstract

**Background & Aims:** The development of protective strategies for steatotic liver grafts is vital in order to increase the number of organs available for transplantation. We evaluated the usefulness of trimetazidine (TMZ) and aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) (separately or in combination) as new additives to University of Wisconsin (UW) solution in steatotic liver transplantation. We also investigated the underlying mechanisms responsible for this protection.

**Methods:** Steatotic livers preserved in UW solution with TMZ and AICAR (separately or in combination) were transplanted into Zucker rats. Adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) and nitric oxide (NO) were inhibited pharmacologically (n=10 transplantations, n=20 rats for each intervention).

**Results:** The addition of TMZ and AICAR (separately or in combination) to UW solution increased AMPK and nitrates and nitrites, up-regulated ERK 1/2, reduced oxidative stress, transaminases and damage score and improved survival in recipients. The following values were obtained: ERK 1/2 expression (111.9±4.06 and 219.9±17.90, p=0.000), malondialdehyde levels (1.65±0.03 and 0.23±0.01, p=0.000) and survival in recipients (30% and 60%, p=0.01) for steatotic livers preserved in UW and UW+TMZ+AICAR, respectively. The benefits of TMZ and AICAR were abolished when AMPK or NO were inhibited.

**Conclusion:** TMZ and AICAR may be useful new additives to UW solution in steatotic liver transplantation whereas a combination of the two was unnecessary. TMZ activated AMPK and this in turn increased NO, reduced oxidative stress and up-regulated ERK 1/2, thus protecting steatotic liver grafts and improving post-transplant outcomes.

Immunogastroenterology 2012; 1:58-68

## Key words

liver transplantation; steatotic liver; ischemia-reperfusion; preservation solutions

## Introduction

Up to 30% of all livers retrieved for organ transplantation exhibit steatotic transformations.<sup>1,2</sup> The increasing demand for organs for transplantation has led to the acceptance of steatotic livers, which have poor tolerance to ischemia-reperfusion (I/R) injury.<sup>3,4</sup> The use of these marginal organs for transplantation is associated with an increased risk of graft dysfunction or failure after surgery.<sup>4</sup> In addition, many steatotic livers are discarded for transplantation, exacerbating the critical shortage of donor livers.<sup>5</sup> As a result, there is an urgent need to minimize the adverse effects of I/R in steatotic liver transplantation.

Trimetazidine (TMZ), introduced as an anti-ischemic drug in the heart,<sup>5,6</sup> has been used by our group as a new additive in UW solution to protect steatotic livers exposed to prolonged cold ischemia (24 h) in an *ex-vivo* model of hepatic ischemia.<sup>7,8</sup>

Nitric oxide (NO) plays an important protective role in a variety of organs undergoing I/R injury.<sup>9-11</sup> Previous results have indicated that reduction of oxidative stress and overexpression of mitogen-activated protein kinase ERK 1/2 may be involved in the benefits of NO. The beneficial effects of NO on oxidative stress in livers undergoing warm ischemia have previously been reported.<sup>12,13</sup> In addition, in hearts subjected to I/R injury, the protection conferred by several strategies has been associated with ERK 1/2 activation in a NO-dependent manner.<sup>14,15</sup> Given these observations and the previous results indicating the involvement of NO in the benefits of TMZ in experimental models of I/R,<sup>8,16</sup> the possibility that the benefits of TMZ in steatotic liver transplantation could be mediated by NO should not be discarded.

A relationship between adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) and NO was previously described.<sup>17-19</sup>

\*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Carmen Peralta, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona (IDIBAPS), Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain. E-mail: cperalta@clinic.ub.es

Submitted: 20/02/2012; Revised: 14/03/2011; Accepted: 04/05/2012

DOI: 10.7178/ig.1.1.11



---

## Experimental Models in Liver Surgery

---

M.B. Jiménez-Castro, M. Elias-Miró,  
A. Casillas-Ramírez and C. Peralta

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/51829>

---

### 1. Introduction

Ischemia-Reperfusion (I/R) injury is an important cause of liver damage occurring during surgical procedures including hepatic resections and liver transplantation (LT) [1-3]. The shortage of organs has led centers to expand their criteria for the acceptance of marginal grafts that exhibit poor tolerance to I/R [4]. Some of these include the use of organs from older donors and grafts such as small-for-size or steatotic livers. However, I/R injury is the underlying cause of graft dysfunction in marginal organs [4]. Indeed, the use of steatotic livers for transplantation is associated with an increased risk of primary nonfunction or dysfunction after surgery [5]. In addition, the occurrence of postoperative liver failure after hepatic resection in a steatotic liver exposed to normothermic ischemia has been reported [6]. A large number of factors and mediators play a part in liver I/R injury. The relationships between the signalling pathways involved are highly complex and it is not yet possible to describe, with absolute certainty, the events that occur between the beginning of reperfusion and the final outcome of either poor function or a non-functional liver graft. We will show that the mechanisms responsible for hepatic I/R injury depends on the experimental model used, who are valuable tool for understanding the physiopathology of hepatic I/R injury and discovering novel therapeutic targets and drugs. Several strategies to protect the liver from I/R injury have been developed in animal models and, some of these, might find their way into clinical practice. The species used for experimental investigation of hepatic I/R injury range from mice to pigs. The book chapter will discuss the numerous experimental models used to study the complexity of hepatic I/R injury, data reported in choice of the animal model, when selecting an animal species, the age, the sex, the degree of steatosis...etc. Thus, the different strengths and limitations of the different experimental models will be discussed. Also the standardized experimental conditions, such as anesthetic and analgesic procedures will be described. We also attempt to highlight the fact that the types of ischemia (cold and warm ischemia) play an important role in experimental liver surgery. The most



In: Organ Donation and Organ Donors  
Editor: Reza F. Saidi

ISBN: 978-1-62618-853-2  
© 2013 Nova Science Publishers, Inc.

## Chapter 4

---

# Expanding the Donor Pool in Liver Transplantation: Influence of Ischemia-Reperfusion

---

*M. B. Jiménez-Castro<sup>1</sup>, M. Elias-Miró<sup>1</sup> and C. Peralta<sup>\*1, 2</sup>*

<sup>1</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas,  
Barcelona, Spain

## Abstract

Improvements in surgical techniques, immunosuppression, and patient management have led to the optimization of liver transplantation outcomes. However, the waiting list for liver transplantation is increasing at a greater pace. The large imbalance between the growing pool of potential liver transplant recipients and the scarcity of donor organs has fueled efforts to maximize existing donors and identify new sources.

To expand the potential donor pool, clinical, and organ procurement agencies are continually modifying the criteria of an acceptable liver donor and are looking to marginal or expanded donors to meet the waiting list demands. This book chapter will be focused on the current state of liver transplantation using grafts from extended criteria donors (elderly donors, steatotic donors, donors with malignancies, donors with viral hepatitis) and from donation after cardiac death (non-heart beating donors), as well as the use of partial grafts (split grafts and living-donor liver transplantation) and other suboptimal donors (donors with hypernatraemia, infections, hypotension and inotropic support). Overall, broadened criteria for acceptable donor livers appear to lessen graft survival rates somewhat compared with rates for ideal donor organs.

Donors are generally considered marginal if there is a risk of initial poor function or primary non-function. The present book chapter will discuss the factors defining marginality of a graft, the pathophysiology of the marginal donor, and the issues faced by transplant units in making the decision to use such a graft; along with strategies for minimizing the ischemia-reperfusion injury experienced by the organs. We will show the

---

\* cperalta@clinic.ub.es.



## Mecanismos de protección de estrategias terapéuticas basados en la inhibición de PPAR $\gamma$ en el trasplante de hígados esteatósicos

Arani Casillas-Ramirez,<sup>\*†</sup> Mónica Jiménez-Castro B,<sup>\*‡</sup> Marta Massip-Salcedo,<sup>\*§</sup> María Elías-Miró,<sup>\*‡</sup> Carmen Feralta<sup>\*‡§</sup>

### RESUMEN

**Introducción:** La esteatosis es la causa del mayor número de órganos no aptos para trasplante hepático, ya que los hígados esteatósicos toleran peor que los normales la lesión por isquemia-reperfusión. Se ha reportado previamente el papel clave que desempeña el receptor de peroxisoma proliferador-activado gamma en la vulnerabilidad de los injertos esteatósicos frente a la isquemia-reperfusión en el trasplante hepático y los beneficios de los antagonistas del peroxisoma proliferador-activado gamma en esas condiciones; sin embargo, se conoce poco acerca de sus mecanismos protectores subyacentes. **Objetivos:** Investigar si los antagonistas del peroxisoma proliferador-activado gamma protegen a los injertos esteatósicos a través de regular el estrés del retículo endoplásmico y el estrés oxidativo. **Material y métodos:** Se realizó un trasplante hepático con injertos esteatósicos utilizando ratas de la cepa Zucker. El peroxisoma proliferador-activado gamma fue alterado farmacológicamente. **Resultados:** La expresión de marcadores del retículo endoplásmico en injertos esteatósicos mostró niveles basales de expresión, y consecuentemente, la administración del antagonista del peroxisoma proliferador-activado gamma tampoco indujo cambios en la expresión. Por otro lado, el tratamiento con el antagonista del peroxisoma proliferador-activado gamma resultó en una reducción de la peroxidación lipídica y nitrotirosinas, indicando una disminución en la formación de peroxinitritos. **Conclusiones:** La inhibición farmacológica del peroxisoma proliferador-activado gamma protege a los injertos esteatósicos a través de reducir el estrés oxidativo.

**Palabras clave:** Trasplante hepático, hígado esteatósico, isquemia-reperfusión, PPAR $\gamma$ , estrés del retículo endoplásmico, estrés oxidativo.

### ABSTRACT

**Background:** Numerous steatotic livers are discarded as unsuitable for transplantation because of their poor tolerance of ischemia-reperfusion. The key role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the vulnerability of this type of liver to ischemia-reperfusion injury associated with transplantation and the benefits of peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonists under these conditions have been previously reported. However, the mechanisms responsible for such effect are poorly understood. **Objective:** This study examines whether the benefits of peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonists in steatotic liver transplantation could be explained by the regulation of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. **Material and methods:** Steatotic livers were transplanted in Zucker rats. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma was altered pharmacologically and endoplasmic reticulum stress and oxidative stress markers were measured. **Results:** Protein expression of endoplasmic reticulum stress markers in steatotic livers subjected to

Recibido: 6 febrero 2013. Aceptado: 3 mayo 2013.

\* Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España.

† Campus de la Salud «Dr. Rodolfo Torre Cantú», Universidad La Salle Victoria, Cd. Victoria, México.

‡ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, España.

§ Este artículo también puede ser consultado en versión completa en <http://www.medigraphic.com/emis>



In: Liver Failure  
Editors: Carmen Peralta and Luis Fontana

ISBN: 978-1-62808-507-5  
© 2013 Nova Science Publishers, Inc.

## Chapter 2

---

# Neurological Complications in Liver Transplantation

---

*Mónica B. Jiménez-Castro<sup>1</sup>, Maria Elias-Miró<sup>1</sup>  
and Carmen Peralta<sup>1,\*</sup>*

<sup>1</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain

### Abstract

Over the past two decades, remarkable advances have been made in the field of liver transplantation and improvements in surgical techniques and perioperative care have reduced the mortality and morbidity associated with liver transplantation. However the neurological complications associated with liver transplantation are one of the main unresolved problems in clinical practice.

We will present the relationship between the functional status of the liver and that of the brain. This book chapter will be focus on hepatic encephalopathy, the major neurologic complications manifestation, followed by seizures and immunosuppression toxicity. The differential neurological complications caused by the different toxins or immunosuppressors as well as the neurotoxic mechanisms will be also described in the present book chapter. We will also discuss why the reported incidence of neurological complications is variable for different transplant centers.

We will show that neurologic complications of liver transplantation are more common than other solid organ transplant with a significantly lower incidence in living donor liver transplantation versus patients who receive a liver graft from cadaveric donor. We will also show that the occurrence of neurological complications in pediatric transplantation is significantly lower than in adult transplantation.

The knowledge of neurological complications of liver transplantation is important for transplantation teams to reduce their prevalence and improve their management. At this time their management is empirical, being currently based more on clinical practical experience than on evidence derived from scientific literature or animal models. Thus, more studies should be in development for prevention and treatment of neurological complications.

---

\* Tel.: +34932275400 Ext 4177; E-mail: cperalta@clinic.ub.es.



*Artículos relacionados estrechamente con el tema de la Tesis*



## REVIEW

## Does Adiponectin Benefit Steatotic Liver Transplantation?

Maria Elias-Miro,<sup>1</sup> Marta Massip-Salcedo,<sup>1,2</sup> Monica Jimenez-Castro,<sup>1</sup> and Carmen Peralta<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Esther Koplowitz Center, August Pi i Sunyer Institute for Biomedical Research, Barcelona, Spain; and

<sup>2</sup>Center for Biomedical Research in Hepatic and Digestive Diseases, Barcelona, Spain

Strategies for improving the viability of steatotic donor livers could increase the number of organs suitable for transplantation. There is evidence that adiponectin, the most abundant adipose-specific adipokine, acts as an anti-obesity and anti-inflammatory hormone. Here we review the signaling pathways of adiponectin and the possible therapies based on adiponectin regulation that have been examined or applied clinically. Recent studies on the role of adiponectin in steatotic livers subjected to ischemia/reperfusion are discussed. The data suggest that further investigations are required to determine whether adiponectin is a potential therapeutic target in liver transplantation. *Liver Transpl* 17:993-1004, 2011. © 2011 AASLD.

Received March 21, 2011; accepted June 5, 2011.

The potential use of steatotic livers, which are among the most common types of organs from marginal donors, has become a major focus of investigation for transplantation. However, steatotic livers are more susceptible to ischemia/reperfusion (I/R) injury, and when they are transplanted, they lead to poorer outcomes in comparison with nonsteatotic livers. Indeed, the use of steatotic livers for transplantation is associated with an increased risk of primary nonfunction or dysfunction after surgery.<sup>1-5</sup> Despite advances aimed at reducing hepatic I/R injury (which have been summarized in earlier reviews<sup>1,2</sup>), the results have been inconclusive. Here we review the signaling pathway of adiponectin in steatosis and inflammation, which are key factors in steatotic liver transplantation.<sup>1-5</sup> Recent findings concerning the role of adiponectin in hepatic

I/R are also discussed. Our review of pharmacological strategies for regulating adiponectin in patients with liver disease may help researchers to find effective pharmacological strategies for the treatment of hepatic I/R. The potential clinical application of adiponectin in the setting of steatotic liver transplantation is also discussed.

### CHARACTERISTICS OF ADIPONECTIN IN HEPATIC I/R

We first outline the main characteristics of adiponectin and adiponectin sources and discuss whether adiponectin could be a predictive factor in clinical liver surgery. A unique feature of the adiponectin structure

Abbreviations: ACC, acetyl coenzyme A carboxylase; AdipoQ, adiponectin; C1Q and collagen domain containing; AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase; Ang, angiotensin; APPL1, adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1; ATP, adenosine triphosphate; ER, endoplasmic reticulum; ET, endothelin; FAS, fatty acid synthase; FFA, free fatty acid; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; GSH, glutathione; HMW, high molecular weight; HO-1, heme oxygenase 1; IFN, interferon; IL, interleukin; I/R, ischemia/reperfusion; JNK, Jun N-terminal kinase; mRNA, messenger RNA; MyD88, myeloid differentiation factor 88; NO, nitric oxide; PC, ischemic preconditioning; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RBP4, retinol-binding protein 4; ROS, reactive oxygen species; siRNA, silent small interfering RNA; SOD, superoxide dismutase; SREBP1, sterol regulatory element-binding protein 1; TLR4, toll-like receptor 4; TNF, tumor necrosis factor; TRAF6, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; TRIF, toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$ ; UCP2, mitochondrial uncoupling protein 2; UPR, unfolded protein response; XDH, xanthine dehydrogenase; XOD, xanthine oxidase.

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (project grant BFU2009-07410) and ACCIÓ (project grant VALTEC08-2-0033).

Address reprint requests to Carmen Peralta, Ph.D., Esther Koplowitz Center, August Pi i Sunyer Institute for Biomedical Research, Roselló 149-153, 3rd Floor, Office 3.8, Barcelona, Spain 08036. Telephone: +34 93 227 5400, extension 4177; FAX: +34 93 312 9406; E-mail: cperalta@clinic.ub.es

DOI 10.1002/lt.22358

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

LIVER TRANSPLANTATION. DOI 10.1002/lt. Published on behalf of the American Association for the Study of Liver Diseases



# Ischemia-Reperfusion Injury Associated with Liver Transplantation in 2011: Past and Future

M. Elias-Miró<sup>1</sup>, M.B. Jiménez-Castro<sup>1</sup> and C. Peralta<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institut d'Investigacions Biomèdiques Agust Pi i Sunyer, Centro Esther Koplowitz;*

<sup>2</sup>*Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas Spain*

## 1. Introduction

Liver transplantation has evolved as the therapy of choice for patients with end-stage liver disease. However, the waiting list for liver transplantation is growing at a fast pace, whereas the number of available organs is not growing at a proportional rate. The potential use of steatotic livers for transplant, one of the most common types of organs from marginal donors, has become a major focus of investigations. However the clinical problem is still unresolved since steatotic livers are more susceptible to ischemia-reperfusion (I/R) injury and, when used, have poorer outcome than non-steatotic livers. Indeed, the use of steatotic livers for transplantation is associated with increased risk of primary non-function or dysfunction after surgery. Therefore, minimizing the adverse effects of I/R injury could improve outcomes in steatotic liver surgery, increase the number both of suitable transplantation grafts and of patients who successfully recover from liver transplantation.

The present review focuses on the complexity of hepatic I/R injury, summarizing conflicting results obtained from the literature about the mechanisms responsible for it. We also review the therapeutic strategies designed in past years to reduce I/R injury, attempting to explain why most of them have not been applied clinically. Finally, we will consider new potential protective strategies that have shown promising results for I/R injury with the potential to increase the number of liver suitable for liver transplantation.

## 2. Hepatic ischemia-reperfusion injury associated with liver transplantation. An unresolved problem in clinical practice

Liver transplantation (LT) dates back to 1963, when Thomas Starzl carried out the first transplant on a child suffering from biliary atresia. LT has evolved as the therapy of choice for patients with end-stage liver disease. However, I/R injury, inherent in every LT, is the main cause of both initial poor function and primary non-function of liver allograft. The latter is responsible for 81% of re-transplantations during the first week after surgery (Clavien et al., 1992; Jaeschke, 1996). I/R injury is a phenomenon whereby cellular damage in a hypoxic organ is accentuated following the restoration of oxygen delivery (Jaeschke, 1998; Teoh et al., 2003; Jaeschke, 2003). In the liver, this form of injury was recognized as a



Hindawi Publishing Corporation  
Journal of Biomedicine and Biotechnology  
Volume 2012, Article ID 298657, 20 pages  
doi:10.1155/2012/298657

## Review Article

# The Current State of Knowledge of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury Based on Its Study in Experimental Models

M. Mendes-Braz,<sup>1</sup> M. Elias-Miró,<sup>2</sup> M. B. Jiménez-Castro,<sup>2</sup> A. Casillas-Ramírez,<sup>2</sup>  
F. S. Ramalho,<sup>1</sup> and C. Peralta<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>2</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, 08036 Barcelona, Spain

Correspondence should be addressed to C. Peralta, cperalta@clinic.ub.es

Received 1 December 2011; Accepted 23 February 2012

Academic Editor: Oreste Gualillo

Copyright © 2012 M. Mendes-Braz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The present review focuses on the numerous experimental models used to study the complexity of hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury. Although experimental models of hepatic I/R injury represent a compromise between the clinical reality and experimental simplification, the clinical transfer of experimental results is problematic because of anatomical and physiological differences and the inevitable simplification of experimental work. In this review, the strengths and limitations of the various models of hepatic I/R are discussed. Several strategies to protect the liver from I/R injury have been developed in animal models and, some of these, might find their way into clinical practice. We also attempt to highlight the fact that the mechanisms responsible for hepatic I/R injury depend on the experimental model used, and therefore the therapeutic strategies also differ according to the model used. Thus, the choice of model must therefore be adapted to the clinical question being answered.

## 1. Introduction

Ischemia-reperfusion (I/R) injury is a phenomenon in which cellular damage in a hypoxic organ is accentuated following the restoration of oxygen delivery [1–3]. In the liver, this form of injury was recognized as a clinically important pathological disorder by Toledo-Pereyra et al. in 1975 during studies of experimental liver transplantation (LT). However, it was not until the mid-1980s that the term reperfusion injury was generally used in the literature on LT [2]. I/R injury is an important cause of liver damage occurring during surgical procedures including hepatic resections and LT [4–6]. The shortage of organs has led centers to expand their criteria for the acceptance of marginal grafts that exhibit poor tolerance to I/R [7]. Some of these include the use of organs from older donors and grafts such as small-for-size or steatotic livers. However, I/R injury is the underlying cause of graft dysfunction in marginal organs [7]. Indeed, the use of steatotic livers for transplantation is associated with an

increased risk of primary nonfunction or dysfunction after surgery [8]. In addition, the occurrence of postoperative liver failure after hepatic resection in a steatotic liver exposed to normothermic ischemia has been reported [9]. Therefore, minimizing the adverse effects of I/R injury could improve outcomes in steatotic liver surgery, increasing the number of patients who successfully recover from major liver surgery.

Animal models of cold and warm hepatic I/R are valuable tools for understanding the pathophysiology of hepatic I/R injury and discovering novel therapeutic targets and drugs. Some of the mechanisms and cell types involved in hepatic I/R injury are described below.

The lack of oxygen in hepatocytes during ischemia causes ATP depletion and alterations in  $H^+$ ,  $Na^+$ , and  $Ca^{2+}$  homeostasis that activate hydrolytic enzymes and impair cell volume regulation leading to the swelling of sinusoidal endothelial cells (SECs) and Kupffer cells (KCs) [10]. This fact, together with the imbalance between nitric oxide (NO) and endothelin production, contributes to the narrowing of the



Hindawi Publishing Corporation  
PPAR Research  
Volume 2012, Article ID 802384, 14 pages  
doi:10.1155/2012/802384

## Review Article

# The Current Knowledge of the Role of PPAR in Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury

M. Elias-Miró,<sup>1</sup> M. B. Jiménez-Castro,<sup>1</sup> M. Mendes-Braz,<sup>2</sup>  
A. Casillas-Ramírez,<sup>1</sup> and C. Peralta<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Esther Koplowitz Center, Roselló 149–153, 3rd Floor, Office 3.8, 08036 Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Patología e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, 14049-900 Sao Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, 08036 Barcelona, Spain

Correspondence should be addressed to C. Peralta, cperalta@clinic.ub.es

Received 22 December 2011; Accepted 16 March 2012

Academic Editor: Stefan Alexson

Copyright © 2012 M. Elias-Miró et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Strategies to improve the viability of steatotic livers could reduce the risk of dysfunction after surgery and increase the number of organs suitable for transplantation. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are major regulators of lipid metabolism and inflammation. In this paper, we review the PPAR signaling pathways and present some of their lesser-known functions in liver regeneration. Potential therapies based on PPAR regulation will be discussed. The data suggest that further investigations are required to elucidate whether PPAR could be a potential therapeutic target in liver surgery and to determine the most effective therapies that selectively regulate PPAR with minor side effects.

## 1. Introduction

Liver transplantation has evolved as the therapy of choice for patients with end-stage liver disease. However, the waiting list for liver transplantation is growing at a rapid pace, whereas the number of available organs is not increasing proportionately. The potential use of steatotic livers, one of the most common types of organs in marginal donors, for transplantation has become a major focus of investigation. However, steatotic livers are more susceptible to ischemia-reperfusion (I/R) injury, and the transplantation of steatotic livers results in a poorer outcome than that of nonsteatotic livers. Indeed, the use of steatotic livers for transplantation is associated with an increased risk of primary nonfunction or dysfunction after surgery [1, 2]. In hepatic resections, the operative mortality associated with steatosis exceeds 14%, compared with 2% for healthy livers, and the risks of dysfunction after surgery are similarly higher [2, 3]. Despite advances aimed at reducing the incidence of hepatic I/R injury (summarized in earlier reviews) [1, 2], the results to date are inconclusive. In this paper, we review the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) and PPAR $\gamma$

signaling pathways in steatosis, inflammation and regeneration, three key factors in steatotic liver surgery [1–5]. Our review of the different strategies pursued to regulate PPAR in liver diseases may motivate researchers to develop effective treatments for steatotic livers in patients undergoing I/R. The potential clinical application of strategies that regulate PPAR in the setting of steatotic liver surgery is also discussed.

## 2. Characteristics of PPAR

PPARs belong to the hormone nuclear receptor superfamily and consist of three isoforms: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , and PPAR $\beta/\delta$ . Of these, our group and others have demonstrated that PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  are important regulators of postischemic liver injury [1, 2, 6, 7] that exert their effects on steatosis and inflammation, which is inherent in steatotic liver surgery [8–12].

Previous results indicate that the presence of fatty infiltration by itself in the liver (without any surgical intervention) does not induce changes in PPAR $\alpha$  or PPAR $\gamma$  levels, as no differences were observed in the levels of these transcription factors between steatotic and nonsteatotic livers of



## Retinol Binding Protein 4 and Retinol in Steatotic and Nonsteatotic Rat Livers in the Setting of Partial Hepatectomy Under Ischemia/Reperfusion

Maria Elias-Miró,<sup>1\*</sup> Marta Massip-Salcedo,<sup>1,2\*</sup> Jens Raila,<sup>3</sup> Florian Schweigert,<sup>3</sup> Mariana Mendes-Braz,<sup>4</sup> Fernando Ramalho,<sup>4</sup> Mónica B. Jiménez-Castro,<sup>1</sup> Arani Casillas-Ramírez,<sup>1</sup> Raquel Bermudo,<sup>5</sup> Antoni Rimola,<sup>2,6</sup> Juan Rodes,<sup>1,2</sup> and Carmen Peralta<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>August Pi i Sunyer Institute for Biomedical Research, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Network Center for Biomedical Research in Hepatic and Digestive Diseases, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Institute of Nutritional Science, University of Potsdam, Nuthetal, Germany; <sup>4</sup>Department of Pathology and Forensic Medicine, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; and <sup>5</sup>Tumour Bank; and <sup>6</sup>Liver Unit, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Steatotic livers show increased hepatic damage and impaired regeneration after partial hepatectomy (PH) under ischemia/reperfusion (I/R), which is commonly applied in clinical practice to reduce bleeding. The known function of retinol-binding protein 4 (RBP4) is to transport retinol in the circulation. We examined whether modulating RBP4 and/or retinol could protect steatotic and nonsteatotic livers in the setting of PH under I/R. Steatotic and nonsteatotic livers from Zucker rats were subjected to PH (70%) with 60 minutes of ischemia. RBP4 and retinol levels were measured and altered pharmacologically, and their effects on hepatic damage and regeneration were studied after reperfusion. Decreased RBP4 levels were observed in both liver types, whereas retinol levels were reduced only in steatotic livers. RBP4 administration exacerbated the negative consequences of liver surgery with respect to damage and liver regeneration in both liver types. RBP4 affected the mobilization of retinol from steatotic livers, and this revealed actions of RBP4 independent of simple retinol transport. The injurious effects of RBP4 were not due to changes in retinol levels. Treatment with retinol was effective only for steatotic livers. Indeed, retinol increased hepatic injury and impaired liver regeneration in nonsteatotic livers. In steatotic livers, retinol reduced damage and improved regeneration after surgery. These benefits of retinol were associated with a reduced accumulation of hepatocellular fat. Thus, strategies based on modulating RBP4 could be ineffective and possibly even harmful in both liver types in the setting of PH under I/R. In terms of clinical applications, a retinol pretreatment might open new avenues for liver surgery that specifically benefit the steatotic liver. *Liver Transpl* 18:1198-1208, 2012. © 2012 AASLD.

Received February 27, 2012; accepted June 3, 2012.

In clinical situations, partial hepatectomy (PH) under ischemia/reperfusion (I/R) is usually performed to control bleeding during parenchymal dissection.<sup>1</sup>

Hepatic steatosis, a major risk factor for liver surgery, is associated with an increased complication index and increased postoperative mortality after major liver

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BrdU, bromodeoxyuridine; HGF, hepatocyte growth factor; I/R, ischemia/reperfusion; Ln, lean; mRNA, messenger RNA; Ob, obese; PH, partial hepatectomy; RBP4, retinol-binding protein 4; TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ; TTR, transthyretin; I/R<sub>RT</sub>, ischemia/reperfusion at different reperfusion times.

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (project grant BFU2009-07410) and the Agency for the Innovation and Internationalization of Catalan Enterprise (project grant VALTECO8-2-0033). Mariana Mendes-Braz received a fellowship from the Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Brazilian Ministry of Education). Mónica B. Jiménez-Castro received a fellowship from the Spanish Society for Liver Transplantation Foundation.

\*These authors contributed equally to this work.

Address reprint requests to Carmen Peralta, M.D., Ph.D., August Pi i Sunyer Institute for Biomedical Research, Roselló 149-153, 3rd Floor, Office 3.8, Barcelona, Spain 08036. Telephone: +34932275400, extension 4177; FAX: +34933129406; E-mail: cperalta@clinic.uib.es

DOI 10.1002/lt.23489

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).

LIVER TRANSPLANTATION, DOI 10.1002/lt. Published on behalf of the American Association for the Study of Liver Diseases



In: Adenosine Triphosphate  
Editors: Ebert Kuester and Gisa Traugott

ISBN: 978-1-62417-890-0  
© 2013 Nova Science Publishers, Inc.

No part of this digital document may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted commercially in any form or by any means. The publisher has taken reasonable care in the preparation of this digital document, but makes no expressed or implied warranty of any kind and assumes no responsibility for any errors or omissions. No liability is assumed for incidental or consequential damages in connection with or arising out of information contained herein. This digital document is sold with the clear understanding that the publisher is not engaged in rendering legal, medical or any other professional services.

#### Chapter 4

## ADENOSINE TRIPHOSPHATE IN EXPERIMENTAL LIVER SURGERY

*M. Elias-Miró<sup>1</sup>, M. B. Jiménez-Castro<sup>1</sup> and C. Peralta<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas,  
Barcelona, Spain

### ABSTRACT

The shortage of organs has led centers to the acceptance of marginal grafts such as fatty livers, small-for-size liver or aged donors. However, the clinical problem is unresolved since this type of liver tolerates poorly hepatic ischemia-reperfusion (I/R) and show regenerative failure after liver surgery. The use of marginal liver for transplant is associated with increased risk of primarily non-function or dysfunction after surgery, being the deficiencies in energy metabolism one of the main mechanisms responsible for the vulnerability of this liver type to I/R injury and regenerative failure. Indeed, experimental studies and clinical observations clearly indicate that marginal livers show more adenosine triphosphate (ATP) depletion during ischemia and synthesize less ATP than normal livers during the early phase of reperfusion. This book chapter will be focused on the role of ATP in hepatic I/R injury and the mechanisms responsible of ATP depletion in both marginal and normal livers. We will show that the deleterious effects of ischemia on ATP depletion and the lactate production limit survival of hepatocytes, being this effect more exacerbated in marginal livers. Also, we will explain how different conditions, including the presence of fatty infiltration or starvation, affect ATP recovery during reperfusion, a prerequisite for liver graft viability after surgery. In hepatic I/R injury cell death can occur via necrosis or apoptosis. We will review the key role of ATP as a putative apoptosis/necrosis switch: when ATP depletion is severe, necrosis ensues before the activation of the energy-requiring apoptotic pathway. The present book chapter will discuss how ATP depletion and its posterior restoration depends on the type of ischemia (cold or warm ischemia), the type of liver, duration and the extent of hepatic ischemia, starvation, and the presence of liver regeneration. We will show that the mechanism responsible for ATP recovery during reperfusion depends of the experimental model used. Therefore, is very important to choose to standardize experimental conditions according to the clinical question being



Free Radical Research, August 2013; 47(4): 241-246  
 © 2013 Informa UK, Ltd.  
 ISSN: 1071-7502 print/ISSN: 1079-2439 online  
 DOI: 10.1080/10717502.2013.811720

**informa**  
healthcare

REVIEW ARTICLE

**Current knowledge on oxidative stress in hepatic ischemia/reperfusion**

M. Elias-Martí<sup>1</sup>, M. B. Jiménez-Castro<sup>2</sup>, J. Rubio<sup>1,2</sup> & C. Peña<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Biomédica, August Pi i Suñer, Barcelona (IDIBAPS), Spain, and <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain

**Abstract**

Ischemia/reperfusion (IR) injury associated with hepatic resections and liver transplantation remains a serious complication in clinical practice, despite several attempts to solve the problem. The redox balance, which is pivotal for the preservation and integrity of tissues, is disrupted during IR, leading to an accumulation of reactive oxygen species (ROS). Formation of ROS and oxidant stress are the disease mechanisms most commonly involved in hepatic IR injury. The present review examines published results regarding possible sources of ROS and their effects in the context of IR injury. We also review the effect of oxidant stress on marginal livers, which are more vulnerable to IR-induced oxidative stress. Strategies to improve the viability of marginal livers could result in the use of transplantation after surgery and increase the number of organs suitable for transplantation. The review also examines the therapeutic approaches developed in recent years to reduce the oxidative stress induced by hepatic IR, and we seek to explain why some of them have not been applied clinically. New antioxidant strategies that have yielded promising results for hepatic IR injury are discussed.

**Keywords:** liver, ischemia, reperfusion, oxidants, oxidative stress

**Introduction**

Reactive oxygen species (ROS) are largely generated from mitochondrial energy metabolism via oxidative phosphorylation in the respiratory chain. Despite the existence of antioxidant systems, the redox balance is well maintained. However, hepatic ischemia/reperfusion (IR) is unavoidable process when performing hepatic resections and liver transplantation, increasing the production of ROS from various sources, and resulting in the disruption of this delicate balance. To increase ROS, hepatic antioxidants and enzymes that catalyze antioxidant enzymes in order to restore the redox balance. When the injury is pronounced, the antioxidant compensatory responses become insufficient to correct the imbalanced redox state, giving rise to oxidant stress and leading to inflammatory response and hepatic damage. Formation of ROS and oxidant stress are the disease mechanisms most commonly involved in hepatic IR injury. The present review examines published results regarding possible mechanisms responsible for ROS and their effects in the context of hepatic IR injury. Given that in the event of IR-induced donor organ damage, oxidant stress depends on the donor conditions (steatotic, small-for-size, and aged livers) we also review the effect of oxidative stress on marginal livers, which have been shown to suffer increased oxidative injury from exposure to IR, as compared with histologically normal livers. Our review

of physiological and surgical strategies for regulating oxidative stress may help researchers to find effective strategies in the treatment of hepatic IR.

**Effects of oxidative stress in hepatic ischemia/reperfusion**

*Reperfusion phases in hepatic ischemia/reperfusion*

Hepatic IR injury occurs when there is a transient blockage of blood supply to the liver and subsequent reestablishment of the blood supply. The injury process is more extensive during the reperfusion period than during ischemia [1]. Growing evidence supports the notion that oxidant stress is the major initiator in eliciting signaling pathways that lead to the onset of necroapoptosis during the hepatic IR procedure, especially in the early stage of the process [2].

The destructive effects of IR result from the acute generation of ROS subsequent to reoxygenation. These ROS inflict direct tissue damage and initiate a cascade of deleterious cellular responses leading to inflammation, cell death, and organ failure [3,4]. The development of hepatic IR injury can be divided into initial and late phases [5]. The initial phase (< 2 h after reperfusion) is characterized by oxidative stress. Here, the excessive ROS cause tissue damage and cell death by binding and altering cellular

Free Radical Res Downloaded from informahealthcare.com by Universitat de Barcelona on 08/26/13  
 For personal use only.

Correspondence: Dr. Carlos Peña, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Suñer (IDIBAPS), Edifici Regeneració Cel·lular, Barcelona (49-153), 3rd floor, office 3.8, 08036 Barcelona, Spain. Tel: +34932275460. Fax: +34932275040. E-mail: opena@idibaps.org

(Received date: 21 March 2013; Accepted date: 21 May 2013; Published Online: 26 June 2013)





## Resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion

María Elías-Miró<sup>1,†</sup>, Mariana Mendes-Braz<sup>1,2,†</sup>, Ruben Cereijo<sup>3</sup>, Francesc Villarroya<sup>3</sup>,  
Mónica B. Jiménez-Castro<sup>1</sup>, Jordi Gracia-Sancho<sup>4</sup>, Sergi Guixé-Muntet<sup>4</sup>, Marta Massip-Salcedo<sup>1</sup>,  
Joan Carles Domingo<sup>5</sup>, Raquel Bermudo<sup>6</sup>, Juan Rodés<sup>1,7</sup>, Carmen Peralta<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil; <sup>3</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, i Institut de Biomedicina, Universitat de Barcelona, CIBER Fisopatologia de la Obesidad y Nutrición, Spain; <sup>4</sup>Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Tumour Bank, IDIBAPS, Barcelona, Spain; <sup>7</sup>Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

**Background & Aims:** This study examined whether the regulation of resistin and visfatin could reduce damage and improve regeneration in both steatotic and non-steatotic livers undergoing partial hepatectomy under ischemia-reperfusion, a procedure commonly applied in clinical practice to reduce bleeding.

**Methods:** Resistin and visfatin were pharmacologically modulated in lean and obese animals undergoing partial hepatectomy under ischemia-reperfusion.

**Results:** No evident role for these adipocytokines was observed in non-steatotic livers. However, obese animals undergoing liver surgery showed increased resistin in liver and plasma, without changes in adipose tissue, together with visfatin downregulation in liver and increment in plasma and adipose tissue. Endogenous resistin maintains low levels of visfatin in the liver by blocking its hepatic uptake from the circulation, thus regulating the visfatin detrimental effects on hepatic damage and regenerative failure. Indeed, the administration of anti-resistin antibodies increased hepatic accumulation of adipocyte-derived visfatin, exacerbating damage and regenerative failure. Interestingly, treatment with

anti-visfatin antibodies protected steatotic livers, and similar results were obtained with the concomitant inhibition of resistin and visfatin. Thus, when visfatin was inhibited, the injurious effects of anti-resistin antibodies disappeared. Herein we show that upregulation of visfatin increased NAD levels in the remnant steatotic liver, whereas visfatin inhibition decreased them. These later observations suggest that visfatin may favour synthesis of NAD instead of DNA and induces alterations in amino acid metabolism-urea cycle and NO production, overall negatively affecting liver viability.

**Conclusions:** Our results indicate the clinical potential of visfatin blocking-based therapies in steatotic livers undergoing partial hepatectomy with ischemia-reperfusion.

© 2013 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Liver surgery; Hepatic steatosis; Regeneration; Resection; Adipocytokines; Ischemia reperfusion

Received 27 March 2013; received in revised form 28 June 2013; accepted 18 July 2013; available online 19 August 2013

\* Corresponding author. Address: Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Esther i Leprovitz Center, Roselló 149 153, 3rd floor, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275400x4177; fax: +34 933 129406.  
E-mail address: cperalt@clinic.ub.es (C. Peralta).

† These authors contributed equally to this work.

**Abbreviations:** PH, partial hepatectomy; I/R, ischemia reperfusion; Nampt, nicotinamide phosphoribosyltransferase; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; Ob, obese; Ln, lean; BrdU, bromo deoxyuridine; AST, aspartate amino transferase; ALT, alanine amino transferase; HGF, hepatocyte growth factor; TGF, transforming growth factor; MPO, myeloperoxidase; MDA, malondialdehyde; LDL, low density lipoprotein; VLDL, very low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; GDH, glutamate dehydrogenase; CPT2, carnitine palmitoyl transferase 2; MCAD, medium chain acyl CoA dehydrogenase; IGF21, fibroblast growth factor 21; SOD2, superoxide dismutase 2; GPX3, glutathione peroxidase 3; SCD1, stearoyl CoA desaturase 1; FAS, fatty acid synthase; COX, cytochrome c oxidase subunit 1; COXIV, cytochrome c oxidase subunit IV.





## ORIGINAL ARTICLE

## The effects of glucose and lipids in steatotic and non-steatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischaemia-reperfusion

Mariana Mendes-Braz<sup>1,2,\*</sup>, Maria Elias-Miró<sup>1,\*</sup>, Burkhard Kleuser<sup>3</sup>, Susan n Fayyaz<sup>3</sup>, Mónica B. Jiménez-Castro<sup>1</sup>, Marta Massip-Salcedo<sup>1,4</sup>, Jordi Gracia-Sancho<sup>5</sup>, Fernando S. Ramalho<sup>2</sup>, Juan Rodes<sup>1,4</sup> and Carmen Peralta<sup>1,4</sup>

1 Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain

2 Departamento de Patología e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

3 Institute of Nutritional Science, University of Potsdam, Potsdam, Germany

4 Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain

5 Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, IOBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain

### Keywords

hepatic steatosis, ischaemia, liver surgery, regeneration, resection

### Abbreviations

ALT, alanine aminotransferase; ANOVA, analysis of variance; AST, aspartate aminotransferase; BrdU, bromodeoxyuridine; CER, Ceramides; ESI, electrospray ionization; H&E, Haematoxylin and Eosin; HDL, high-density lipoprotein; HGF, hepatocyte growth factor; I/R, ischaemia-reperfusion; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; IL-6, interleukin-6; LC-MS/MS, liquid chromatography/tandem mass spectrometry; LDL, low-density lipoprotein; Ln, lean; LPT, lipectomy; MCP1, monocyte chemoattractant protein-1; MyD88, myeloid differentiation factor 88; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; Ob, obese; PH, partial hepatectomy; QTOF, quadrupole/time-of-flight; S1P, sphingosine-1-phosphate; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; TLR4, toll-like receptor 4; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ ; TRF, TR domain-containing-adaptor inducing IRN-beta; VLDL, very-low-density lipoprotein.

### Correspondence

Dr Carmen Peralta, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IIBAPS), Esther Koplowitz Center, Roselló 149-153, 3rd floor, 08036 Barcelona, Spain  
Tel. +34 9 3227 5400 ext.4177  
Fax. +34 9 3312 9406  
e-mail: cperalta@clinicub.es

Received 10 May 2013

Accepted 25 September 2013

DOI:10.1111/liv.12348

\*Both authors contributed equally to this work

### Abstract

**Background:** Steatosis is a risk factor in partial hepatectomy (PH) under ischaemia-reperfusion (I/R), which is commonly applied in clinical practice to reduce bleeding. Nutritional support strategies, as well as the role of peripheral adipose tissue as energy source for liver regeneration, remain poorly investigated. **Aims:** To investigate whether the administration of either glucose or a lipid emulsion could protect steatotic and non-steatotic livers against damage and regenerative failure in an experimental model of PH under I/R. The relevance of peripheral adipose tissue in liver regeneration following surgery is studied. **Methods:** Steatotic and non-steatotic rat livers were subjected to surgery and the effects of either glucose or lipid treatment on damage and regeneration, and part of the underlying mechanisms, were investigated. **Results:** In non-steatotic livers, treatment with lipids or glucose provided the same protection against damage, regeneration failure and ATP drop. Adipose tissue was not required to regenerate non-steatotic livers. In the presence of hepatic steatosis, lipid treatment, but not glucose, protected against damage and regenerative failure by induction of cell cycle, maintenance of ATP levels and elevation of sphingosine-1-phosphate/ceramide ratio and phospholipid levels. Peripheral adipose tissue was required for regenerating the steatotic liver but it was not used as an energy source. **Conclusion:** Lipid treatment in non-steatotic livers provides the same protection as that afforded by glucose in conditions of PH under I/R, whereas the treatment with lipids is preferable to reduce the injurious effects of liver surgery in the presence of steatosis.

