

# **Noves dianes terapèutiques en el trasplantament de fetge amb empelt de mida reduïda**

Susagna Padrissa i Altés

**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.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.





Programa de Doctorat de Biomedicina

Bienni 2006-2008

**NOVES DIANES TERAPÈUTIQUES EN EL TRASPLANTAMENT DE  
FETGE AMB EMPELT DE MIDA REDUÏDA**

Tesi Doctoral presentada per Susagna Padrissa i Altés per optar al Títol  
de Doctora per la Universitat de Barcelona

Directors: Dr. Joan Roselló Catafau      Dra. Carmen Peralta Uroz

Tutor: Dr. Ramon Bartrons Bach

Aquesta tesi ha sigut realitzada a la Unitat d'Isquèmia-Reperfusió  
Experimental del Departament de Patologia Experimental de l'Institut  
d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona-CSIC.

Barcelona, abril 2010



A la meva família



*“Viure és provar-ho infinites vegades”*

Màrius Sampere





...Encara veig a vegades,  
de vegades veig encara  
els meus ulls d'infant que busquen,  
més enllà del glaç del vidre,  
un color a la tramuntana.  
M'han dit les veus assenyades  
que era inútil cansar-me;  
però a mi un somni mai no em cansa,  
i malgrat la meva barba  
sóc infant en la mirada.  
A vegades veig encara... vida, vida!...

Vida, Lluís Llach



Diuen que mai se sap quan et pot venir la inspiració. A mi, em va arribar un 20 de febrer en un tren amb direcció a Rotterdam tornant del millor congrés al que he assistit durant el meu doctorat, escoltant *Halo* de Beyoncé. Això és el que vaig escriure:

Als meus directors de tesi. Al Dr. Roselló Catafau. Joan, gràcies per ajudar a aixecar-me. Gràcies a tu he tornat a tenir il·lusió per venir cada dia al laboratori. No tinguis cap dubte de que ara estic a -40.

A la Dra. Carmen Peralta, per la seva aportació científica.

Al Dr. Ramon Bartrons, per tot el que ha fet per mí, ha estat com tenir un àngel de la guarda científic. Espero que amb el temps et pugui demostrar que ha valgut la pena tot el que has fet.

Al Dr. Gelpí i la Dra. Sunyol, per haver-me acceptat com a becària a l'IIBB.

A la Dra. Hotter, cap del Departament de Patologia Experimental, per haver-me acceptat com a becària al departament.

Al Ministeri d'Innovació i Ciència, per la beca rebuda.

A la Dra. Geneviève Thon, per inspirar-me a començar el camí que avui acaba aquí.

Al Dr. Bruix, per accedir a ser el president del meu tribunal de tesi i per la seva ajuda a l'hora d'establir els meus contactes postdoctorals.

Als membres del tribunal (Dra. Manzano, Dr. Grande, Dra. Calvo, Dra. Carbonell i Dra. Colell) per haver accedit a avaluar la meva tesi. I Al Dr. Pere Puig perquè m'hagués agradat que hagués estat membre del tribunal.

Al Dr. Rimola, al Dr. Valdecasas i al Dr. Fontdevila, per haver-me permès assistir a un trasplantament de fetge a l'Hospital Clínic.

A en Mohammed Amine Zaouali. Amine, gracias por convertirte en el compañero de grupo ideal. Gracias por darme la calma que siempre me falta y por discutir conmigo todas mis teorías. Ya sabes que Túnez-Catalunya es la mejor combinación! Y que en un futuro siga así. **نيم أركش**

A la Iza. Gracias por haber compartido este camino tan duro conmigo. Gracias por todos los momentos de sinceridad, compañerismo y comprensión, sin ti me habría costado el doble caminar hacia delante. Nunca me ha costado convencerte con mis planes, así que voy a seguir proponiéndote cosas porque me lo he pasado muy bien, y de paso he

ganado una amiga! Y a Sarah, porqué ella también ha estado a mi lado cuando la he necesitado.

A la Dra. Massip Salcedo. Marta, tu vas ser la primera d'acollir-me sincerament al grup, em vas fer un lloc, i això no s'oblida. Gràcies per aquesta connexió que hem establert, és especial i la vull cuidar molt.

A la Dra. Franco Gou. Rosa, gràcies per deixar-me seguir la teva línia experimental i per tota la feina que vas fer que m'ha servit per tenir una tesi amb cap i peus, la meitat d'aquesta tesi és teva. Gràcies per tots els moments que hem compartit, sempre plens de vitalitat i energia.

A la resta de companys de grup, que m'han ajudat quan m'ha estat necessari, espero haver pogut correspondre'ls; L'Ismaïl, la Mari i l'Arani. I al Fernando, per haver-me felicitat quan tant ho necessitava.

Als nostres estimats veïns de laboratori, als CGR, als que hi són ara i als que ja se'n van anar! Però en especial a l'Anna Fernández, la Núria, l'Anna Moles i la Clàudia.

A la Dra. Fernández Fernández. Anna, gràcies per ser com ets, tan semblant a mi en moltes coses! Gràcies per estar al meu costat quan ho he necessitat i per totes les xerrades i rialles. He fet una amiga, i ja saps que es compten amb els dits d'una mà.

A la Núria. Núria, ets tan dolça! Que diguin el que vulguin. A mi m'ha encantat compartir tots els moments que he passat amb tu i sento que tenim un bon lligam que tinc ganes de mantenir. Perquè hi hagi moltes més sortides de les 5 nenes!

A la Dr. Von Montfort. Claudia, gracias por compartir tus pensamientos e ideales conmigo, he aprendido mucho. Estoy muy contenta de que Clara haya nacido aquí y de haber compartido estos momentos tan especiales contigo. En Barcelona tendrás siempre una casa y una amiga.

A l'Anna Moles, la primera amiga biòloga que vaig tenir.

A la resta de companys del institut, però en especial al grup de la Gina (Eugenia, Michaela, Crisa, Marina i a l'Albert perquè sempre em fa riure amb les seves entremaliadures) i a la Neus per confiar en mi.

A la Carme Xaus, pels moments de complicitat en aquell primer despatx i per la seva ajuda en les correccions de la meva tesi.

Als meus companys de despatx, a l'Emma, el Jose i l'Anna Sola. Gràcies per compartir amb mi la part més feliç del meu doctorat, ara tinc un

petit refugi a l'IIBB. Emma, quina pena no haver-nos trobat fins al final de la meva tesi, però encara tenim temps per endavant. Vals molt guapetona!

Als companys de Bellvitge, i en especial als "Bartronets" , per ensenyar-me que es pot fer ciència passant-ho bé. Encara tinc nostàlgia "well-beachera".

Al personal de l'estabulari del Clínic, per la seva ajuda, en especial a la Carme Clèries.

A tots els meus amics de fora de l'IIBB, als amics d'ara i de sempre. Però en especial a la Marta Torres, perquè ella ha aguantat el pes d'aquesta tesi tant com jo i perquè la nostra amistat va ser inesperada però s'ha convertit en part de mi. A l'Alba, perquè els anys passen i ella sempre és aquí, i això no té preu. I a la gent de Sant Cugat, perquè ells han estat la meva vàlvula d'escapament durant tots aquests mesos i anys plens de nervis.

A la Dra. Tertu Folch i a la Dra. Isabel Laudo, per haver contribuït a formar la persona que sóc avui.

Al Dr. Sydney Brenner, a la Dra. Lynn Margulis i al Dr. Eudald Carbonell per inspirar-me i per fer emocionants les meves llargues hores de metro cap a la facultat de biologia.

A la meva família, tota! Als meus avis, l'àvia Montserrat, l'avi Anicet i l'àvia Ignàsia, tots tres parts imprescindibles de la meva vida, la meitat de la meva infància és seva. Avi, gràcies per compartir amb mi la teva saviesa científica i curiosa, no tothom té un avi com tu. I gràcies per haver vingut a l'estabulari amb mi a veure com trasplantava.

Als meus pares, per ser les persones més especials i precioses que conec. Sóc conscient que amb qui millor m'ho passo és amb vosaltres, la Blanca i en Joan, i és per això que la nostra família és especial. Vosaltres sou qui més ha col·laborat en aquesta tesi perquè sense vosaltres no seria qui sóc. Mam, gràcies per la ciència, la capacitat comprensió i dedicació i el descobriment del mar i els seus organismes. Pap, gràcies per l'originalitat, l'excentricitat, l'elegància i el saber. Al cap i a la fi, els arbres sempre creixen cap amunt.

A la Blanca, la meva germana petitona. Blanca, Sempre te'n Surts amb la Teva, eh! Jo això, ho veig com una virtut. Gràcies per haver vingut, amb pas Ferm i notable. No hi ha paraules en aquest món per dir-te el que et voldria dir. Ets molt més que una germana, la nostra connexió sobrepassa

fronteres. Gràcies per estar al meu costat incondicionalment, encara ens queda molt camí i sé que arrasarem, que tremolin!

Al Joan, gràcies per haver-me trobat en aquest món ple de gom a gom. Els anys passen i cada dia som més forts, estem més units i ens ho passem millor. Tu em completes, i per això i per tota la teva paciència, he pogut acabar la tesi amb decència. Ara, cap a la següent fase, per la qual ja no puc esperar més. Gràcies per ser qui ets i compartir-ho amb mi.

Gràcies a tots!

## ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ .....	21
1.1. EL FETGE .....	23
1.1.1. GENERALITATS .....	23
1.1.2. ESTRUCTURA DEL FETGE .....	23
1.1.3. IRRIGACIÓ SANGUÍNIA .....	25
1.1.4. FUNCIÓ HEPÀTICA .....	27
1.1.4.1. METABOLISME DELS GLÚCIDS .....	27
1.1.4.2. METABOLISME DELS LÍPIDS .....	27
1.1.4.3. METABOLISME DE LES PROTEÍNES .....	28
1.1.4.4. EXCRECIÓ DE LA BILIRUBINA .....	29
1.1.5. CÈL·LULES HEPÀTIQUES .....	29
1.2. LESIÓ D'ISQUÈMIA-REPERFUSIÓ .....	31
1.2.1. INTRODUCCIÓ .....	31
1.2.2. PATOFISIOLOGIA DE LA LESIÓ PER I/R .....	31
1.2.3. RELLEVÀNCIA QUIRÚRGICA .....	33
1.2.4. DISFUNCIÓ PRIMÀRIA DE L'EMPELT .....	33
1.3. TRASPLANTAMENT HEPÀTIC .....	34
1.3.1. CIRURGIA DEL DONANT .....	35
1.3.2. CIRURGIA DEL RECEPTOR .....	36
1.3.3. ESTRATÈGIES PER A AUGMENTAR EL NÚMERO D'EMPELTS.....	36
1.3.3.1. TRASPLANTAMENT HEPÀTIC DE MIDA REDUÏDA .....	38
1.3.3.2. TRASPLANTAMENT HEPÀTIC DE DONANT DIFUNT AMB EMPELT DE MIDA REDUÏDA .....	40
1.3.3.3. TRASPLANTAMENT HEPÀTIC SPLIT .....	40
1.3.3.4. TRASPLANTAMENT HEPÀTIC DE DONANT VIU .....	41
1.4. REGENERACIÓ HEPÀTICA .....	43
1.4.1. HGF .....	46
1.4.2. TGF- $\beta$ .....	47
1.4.3. LA REGENERACIÓ HEPÀTICA EN CONDICIONS D'I/R: FACTORS .....	48
1.4.3.1. INTRODUCCIÓ .....	48
1.4.3.2. NUCLEÒTIDS D'ADENINA .....	49

1.4.3.3.	RADICALS LLIURES D'OXIGEN .....	49
1.4.3.4.	ELS NEUTRÒFELS .....	50
1.4.3.5.	LES CITOCINES .....	50
1.4.3.6.	L'ÒXID NÍTRIC .....	51
1.4.3.7.	EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA .....	52
1.4.3.8.	LA BRADICININA .....	53
1.4.3.9.	LES METAL·LOPROTEÍNASES DE MATRIU .....	53
1.4.3.10.	LA c-JUN N-TERMINAL CINASA (JNK) .....	55
1.4.3.11.	L'ACTIVADOR DEL PLASMINOGEN DEL TIPUS UROKINASA (uPA) .....	56
1.5.	EL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC .....	57
1.5.1.	VIES DE SENYALITZACIÓ MOLECULAR .....	57
1.5.1.1.	ADENOSINA I ÒXID NÍTRIC .....	59
1.5.1.2.	METABOLISME ENERGÈTIC .....	60
1.5.1.3.	NEUTRÒFELS I ALTERACIONS DE LA MICROCIRCULACIÓ.....	60
1.5.1.4.	ESTRÈS OXIDATIU I CITOCINES .....	61
1.5.1.5.	APLICACIÓ CLÍNICA DEL PC .....	61
2.	<b>OBJECTIUS</b> .....	65
3.	<b>MATERIAL I MÈTODES</b> .....	69
3.1.	ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ .....	71
3.2.	TRASPLANTAMENT HEPÀTIC AMB EMPELT DE MIDA REDUÏDA.....	71
3.2.1.	ANESTÈSIA .....	71
3.2.2.	CIRURGIA .....	71
3.3.	RECOLLIDA I PROCESSAMENT DE LES MOSTRES .....	76
3.4.	GRUPS EXPERIMENTALS .....	76
3.4.1.	ESTUDI 1 .....	76
3.4.2.	ESTUDI 2 .....	79
3.5.	DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES .....	81
3.5.1.	NIVELLS DE TRANSAMINASES .....	81
3.5.2.	NIVELLS DE ANGIOTENSINA II .....	81
3.5.3.	NIVELLS DE BRADICININA .....	82



3.5.4. NIVELLS DE C-JUN N-TERMINAL CINASA FOSFORIL·LADA (JNK) .....	83
3.5.5. NIVELLS DE HGF .....	83
3.5.6. NIVELLS DE TGF- $\beta$ .....	84
3.5.7. CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES .....	84
3.6. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR .....	84
3.6.1. ZIMOGRÀFIA .....	84
3.6.2. WESTERN BLOT .....	85
3.6.3. PCR A TEMPS REAL .....	87
3.7. TÈCNiques HISTOLÒGiques .....	88
3.7.1. IMMUNOHISTOQUÍMICA DE PCNA .....	88
3.7.2. ESTUDI HISTOLÒGIC AMB HEMATOXILINA EOSINA .....	89
<b>4. RESULTATS .....</b>	<b>91</b>
4.1. ESTUDI 1 .....	93
4.2. ESTUDI 2 .....	95
<b>5. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>97</b>
5.1. EFECTE DE LA INHIBICIÓ DE LA ANGIOTENSINA II I LA BRADICININA EN EL ROLT EN RATA .....	99
5.2. LA METAL·LOPROTEINASA DE MÀTRIU 2 EN EL TRASPLANTAMENT HEPÀTIC DE MIDA REDUÏDA .....	102
<b>6. CONCLUSIONS .....</b>	<b>107</b>
6.1. ESTUDI 1 .....	109
6.2. ESTUDI 2 .....	109
6.3. CONCLUSIONS GENERALS .....	110
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>111</b>
<b>8. ANNEXOS .....</b>	<b>149</b>
8.1. ANNEX 1 .....	151
8.2. ANNEX 2 .....	153
8.3. ANNEX 3 .....	163



## ABREVIATURES

ACE	Enzim convertidor de l'angiotensinogen
ALT	Alanina-aminotransferasa
AMP	Adenosina monofosfat
AMPK	Proteïna cinasa dependent d'AMP
Ang II	Angiotensina II
AP-1	Proteïna activadora 1
AST	Aspartat-aminotransferasa
AT <sub>1</sub>	Receptor de l'Angiotensina 1
AT <sub>2</sub>	Receptor de l'Angiotensina 2
ATP	Adenosina trifosfat
BK	Bradicinina
DAG	Diacil glicerol
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DPE	Disfunció primària de l'empelt
ECM	Matriu extracel·lular
eNOS	Òxid nítric sintasa endotelial
ERK	Cinasa regulada per senyals extracel·lulars
ET	Endotelina
FPE	Fallada primària de l'empelt
HB-EGF	Factor de creixement epidermal amb capacitat d'unió a l'heparina
HES	Hidroxyethyl starch
HGF	Factor de creixement hepatocitari
HSP	Proteïnes del xoc tèrmic
ICAM-1	Molècula de adhesió intercel·lular 1
IGF	Factor de creixement insulínic
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Òxid nítric sintasa induïble
I/R	Isquèmia-Reperfusió
JNK	c-Jun N-terminal cinasa
LAP	Pèptid associat a la latència
LDH	Lactat deshidrogenasa

<b>MAPK</b>	Proteïnes cinasa activades per mitògens
<b>MMP</b>	Metal·loproteïnases de matriu
<b>MT1-MMP</b>	MMP de membrana
<b>NADH</b>	NAD deshidrogenasa
<b>NAME</b>	N $\omega$ -nitro-L-Arginine-methyl-ester
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor neuronal $\kappa$ B
<b>nNOS</b>	Òxid nítric sintasa neuronal
<b>NO</b>	Òxid nítric
<b>NOS</b>	Òxid nítric sintasa
<b>PC</b>	Precondicionament isquèmic
<b>PCNA</b>	Antigen nuclear de proliferació cel·lular
<b>PKC</b>	Proteïna cinasa C
<b>mRNA</b>	Àcid ribonucleic missatger
<b>RAS</b>	Sistema Renina-Angiotensina
<b>ROLT</b>	Trasplantament de fetge amb empelt de mida reduïda
<b>ROS</b>	Radicals lliures d'oxigen
<b>SAPK</b>	Proteïnes cinasa activades per estrès
<b>SOD</b>	Superòxid dismutasa
<b>STAT3</b>	Factor de transducció de senyal i activador de la transcripció 3
<b>TIMP</b>	Inhibidors de teixit de les metal·loproteïnases
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosi tumoral- $\alpha$
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de creixement transformant- $\beta$
<b>uPA</b>	Activador del plasminogen de tipus urocinasa
<b>UW</b>	Solució de la Universitat de Wisconsin
<b>XDH</b>	Xantina deshidrogenasa
<b>XOD</b>	Xantina oxidasa

# 1.INTRODUCCIÓ



## 1.1 EL FETGE

### 1.1.1 GENERALITATS

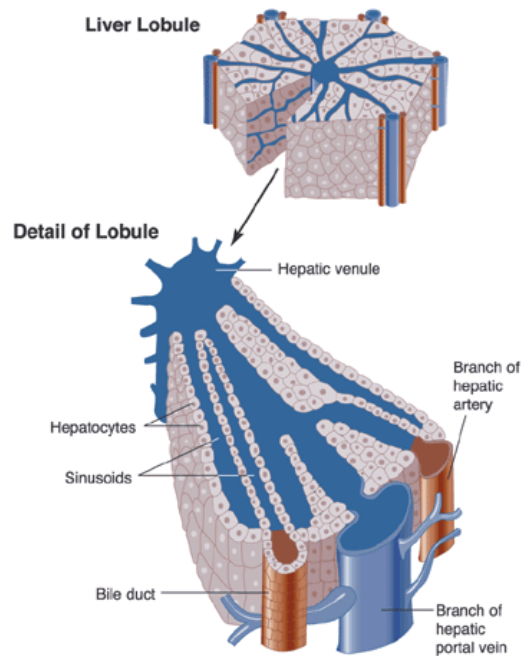
El fetge és una glàndula accessòria de l'aparell gastrointestinal tot i que també té múltiples funcions no relacionades amb l'alimentació. És la glàndula més gran del cos, trobant-se situat en el quadrant superior dret de la cavitat abdominal, just per sota del diafragma. Els vasos sanguinis entren per la seva cara inferior, mentre que els conductes hepàtics dret i esquerra surten per l'hílum, també anomenat *porta hepatis* (1-3).

A més del seu paper en la detoxificació de productes de rebuig del metabolisme, també actua regulant el metabolisme energètic en processar els nutrients que provenen de la digestió per tal de distribuir-los a la resta de teixits. Altres funcions del fetge són: la síntesi i secreció de la bilis, la síntesi de proteïnes i lipoproteïnes plasmàtiques i factors de coagulació, la detoxificació de fàrmacs i toxines, i, a més, funcions metabòliques com la síntesi de glicogen, la gluconeogènesi i també l'emmagatzematge de glicogen i algunes vitamines i lípids (1-3).

### 1.1.2 ESTRUCTURA DEL FETGE

Com la majoria de glàndules exocrines, el fetge està dividit en lòbuls i lobels més petits mitjançant una sèrie d'envans de teixit conjuntiu. El seu parènquima està constituït per grups de cèl·lules epitelials, els hepatòcits, i per un sistema ramificat de conductes. Podem observar un patró repetit d'àrees més o menys hexagonals on els cordons d'hepatòcits es disposen de forma radial al voltant d'una vena central o post-sinusoidal (figura 1.1). En tres dels angles d'aquestes zones poligonals hi ha una petita àrea triangular formada per teixit conjuntiu que conté un conducte biliar, una branca de l'artèria i una branca de la vena porta. Aquest complex s'anomena espai porta o tríada portal. Les branques laterals d'aquests vasos conflueixen en els sinusoides hepàtics, que ocupen els espais que queden entre els cordons d'hepatòcits i drenen cap a la vena central. Per tant, les cèl·lules hepàtiques estan exposades a un gran volum de sang que flueix en sentit centrípet pels sinusoides. La bilis és secretada de forma contínua cap a una

xarxa de canalicles biliars situats a l'interior dels cordons d'hepatòcits, i flueix en sentit centrífug cap als conductes biliars situats en els espais porta (1, 2).



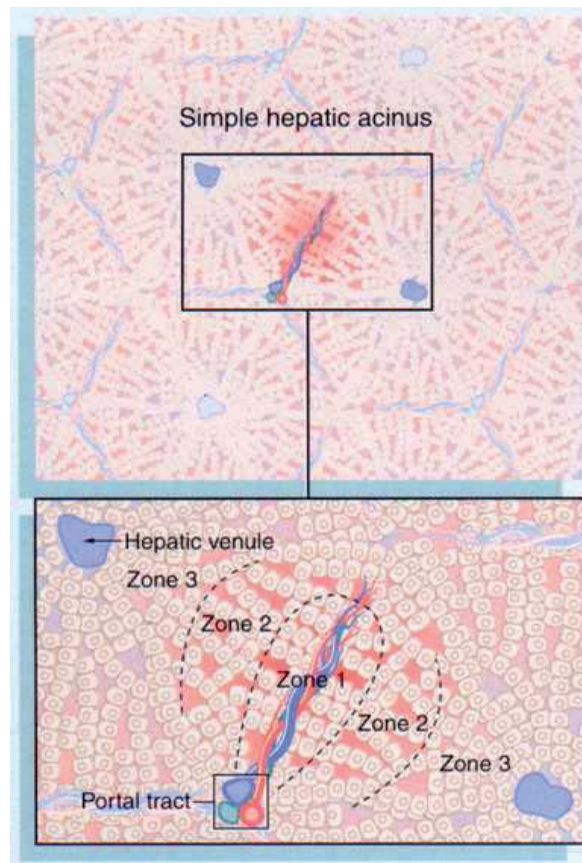
**Figura 1.1.** Estructura del lòbul hepàtic. Font: National Institutes of Health, United States Department of Health and Human Services, EEUU.

La unitat estructural i funcional del fetge és l'acin hepàtic que és una massa més o menys ovalada de cèl·lules parenquimatoses que envolta cada arteriola, vènula i conducte biliar de l'espai porta (figura 1.2). En cada extrem de l'acin hi trobem la vena hepàtica terminal o post-sinusoidal. L'acin es va adoptar com l'estructura bàsica del fetge ja que facilita l'explicació del patró de degeneració cel·lular que s'observa en les lesions hipòxiques i tòxiques del fetge (1-3). L'acin es divideix en 3 zones; la zona 1, la que envolta de forma immediata l'arteriola hepàtica i la vènula porta terminal; La zona 2 o regió intermèdia; i la zona 3, la formada per les cèl·lules que es situen en la proximitat dels extrems de l'acin. La sang circula de manera seqüencial a través d'aquestes zones i surt per les branques terminals de la vena hepàtica en cada extrem de l'acin (1) (figura 1.2).

En els cordons de les cèl·lules parenquimatoses hepàtiques hi ha diferències tant en la ultraestructura com en l'activitat enzimàtica de les cèl·lules de cada zona funcional. En les de la zona 1 predominen els enzims implicats en el metabolisme oxidatiu i la gluconeogènesi, mentre que en les



de la zona 3 són més nombrosos els enzims implicats en la glucòlisi i en el metabolisme dels lípids i substàncies tòxiques. Les cèl·lules de la zona 2 presenten una dotació enzimàtica de característiques intermèdies. Segurament tots els hepatòcits tenen les mateixes capacitats però, en canvi, mostren diferències en la ultraestructura i en la funció segons la concentració d'oxigen i de soluts que hi ha a la sang de la zona de l'acin en què es troben situats (1).



**Figura 1.2.** Estructura de l'acin hepàtic. Font: <https://courses.stu.qmul.ac.uk/SMD/kb/microanatomy/senior/metabolism/liver/answers/index.htm>

### 1.1.3 IRRIGACIÓ SANGUÍNIA

La irrigació del fetge és doble: per una banda rep sang ben oxigenada de la circulació general a través de l'artèria hepàtica, que aporta aproximadament un 25% de la sang. Per altra banda, rep el gran volum de sang poc oxigenada procedent del sistema intestinal a través de la vena

porta i que representa un 75% de l'aportament total. La sang surt a través de les venes hepàtiques les quals desemboquen en la vena cava inferior.

A l'introduir-se per l'hílum hepàtic, la vena porta es divideix en venes interlobars, que a la vegada es divideixen en venes conductores les quals tenen com a característica el fet de tenir una paret més prima que la de vasos de diàmetre comparable a d'altres zones del cos. La ramificació d'aquests vasos dóna lloc a les venes interlobel·lars, de les que s'originen venes encara més petites i amb una paret molt prima. Aquestes venes, juntament amb una branca de l'artèria hepàtica i el conducte biliar, són els components de les tríades portals o espais porta els quals es disposen de manera paral·lela a la vena central. Les branques laterals de les venes dels espais porta són les vècules periportals terminals o vècules perilobel·lars que es van ramificant a intervals petits donant lloc a les vècules d'entrada que desemboquen en els sinusoides.

Tan bon punt travessa l'hílum hepàtic, l'artèria hepàtica es divideix en les artèries interlobars i interlobel·lars. La major part del flux sanguini que passa per aquests vasos es divideix cap als capil·lars de l'estroma de teixit conjuntiu de l'òrgan, tot i que un volum petit continua cap a les arterioles hepàtiques dels espais porta. Aquestes arterioles donen lloc a branques laterals que desemboquen en els sinusoides i a nombroses branques petites que formen una xarxa de capil·lars al voltant del conducte biliar, el plexe periductal, que a la vegada acaben desembocant en els sinusoides hepàtics (2, 3).

La principal funció de la circulació hepàtica es realitza en els sinusoides, que formen un plexe tridimensional a l'interior dels lobels de manera que representen una superfície enorme per a l'intercanvi de metabòlits entre la sang i el parènquima hepàtic. Els sinusoides tenen una amplada superior a la dels capil·lars sanguinis. Tot i que la seva paret està formada per cèl·lules endotelials, hi ha zones de solució de continuïtat que permeten l'accés directe del plasma sanguini als hepatòcits. Cada cèl·lula dels cordons hepàtics disposats radialment està en contacte, almenys per un costat, amb la sang que flueix pels sinusoides. La sang surt dels sinusoides a través de nombroses obertures que existeixen en la vena central, o branca terminal de la vena hepàtica, i continua cap a les venes sublobel·lars i després cap a les venes col·lectores, les quals donen lloc a una

o dues venes hepàtiques, de mida grossa, que surten a través de l'hílum hepàtic i desemboquen en la vena cava inferior(1-3).

#### 1.1.4 FUNCIO HEPÀTICA

El fetge és l'òrgan central d'integració del metabolisme energètic i de nutrients. Les cèl·lules hepàtiques constitueixen una gran reserva química reactiva amb un metabolisme molt elevat, que processen i sintetitzen un gran nombre de substàncies que transportaran cap a altres parts del cos.

##### 1.1.4.1 METABOLISME DELS GLÚCIDS

En el metabolisme dels glúcids, el fetge duu a terme les funcions específiques següents:

- L'emmagatzematge del glicogen
- La conversió de la galactosa i la fructosa en glucosa
- La gluconeogènesi
- La formació de diversos compostos químics importants a partir dels productes intermedis del metabolisme dels glúcids

El fetge juga un paper molt important en l'homeòstasi de la glucosa. L'emmagatzematge del glicogen permet al fetge suprimir l'excés de glucosa en sang, emmagatzemant-la i retornant-la al torrent sanguini quan la concentració sanguínia d'aquesta comença a disminuir. La gluconeogènesi al fetge també està destinada a mantenir la concentració fisiològica de sucre en sang ja que només té lloc quan la concentració de glucosa comença a caure per sota dels valors normals. En aquest cas, els aminoàcids són convertits a glucosa ajudant així a mantenir els seus valors dins els límits fisiològics (4-6).

##### 1.1.4.2 METABOLISME DELS LÍPIDS

El metabolisme dels lípids pot tenir lloc a gairebé totes les cèl·lules, però alguns passos es produeixen amb major rapidesa al fetge (4-7):

- La ràpida oxidació dels àcids grassos per a subministrar energia a l'organisme. Els àcids grassos es catabolitzen mitjançant la  $\beta$ -oxidació i donen lloc a l'acetil co-A, que es pot incorporar al cicle de

Krebbs i pot produir una gran quantitat d'energia. Aquest procés es porta a terme en totes les cèl·lules de l'organisme, però en el fetge és molt més ràpid i no pot utilitzar tota la acetil co-A sintetitzada, la qual és transportada a la resta de cèl·lules.

- La formació de la major part de les lipoproteïnes.
- La formació de grans quantitats de colesterol i fosfolípids.
- La conversió de grans quantitats de glúcids i proteïnes en lípids.

#### 1.1.4.3 METABOLISME DE LES PROTEÏNES

Tot i ser un òrgan molt important per al metabolisme dels glúcids i lípids, la funció del fetge en aquests processos no és imprescindible. En canvi, l'organisme no pot prescindir del fetge en el metabolisme proteic. En el metabolisme de les proteïnes, el fetge realitza les funcions següents:

- La desaminació dels aminoàcids per que es puguin utilitzar per proporcionar energia o convertir-se en glúcids i lípids.
- La formació de la urea per a suprimir l'amoníac que es pot acumular al medi intern. Les bacteries intestinals generen contínuament quantitats moderades d'amoníac que passa a la sang. Si el fetge no eliminés l'excés d'amoníac, aquest podria assolir concentracions tòxiques.
- La formació de proteïnes plasmàtiques. El 90% de les proteïnes plasmàtiques són sintetitzades al fetge.
- Les interconversions entre els diferents aminoàcids i altres compostos. El fetge sintetitza alguns aminoàcids, des del cetoàcid corresponent a través de la transaminació, i altres compostos molt importants a partir d'aquests.

A més a més d'aquestes funcions metabòliques principals, el fetge també participa en el metabolisme de vitamines (sobretot de l'A, la D i la B12), en diversos processos de coagulació, en l'emmagatzematge del ferro i el metabolisme de fàrmacs, hormones i substàncies tòxiques per a l'organisme (4, 5, 7).

#### 1.1.4.4 EXCRECIÓ DE LA BILIRUBINA

Una de les funcions més importants del fetge és la secreció de la bilis.

La bilis té dues funcions:

- Referent a la digestió i l'absorció de lípids, la bilis contribueix a l'emulsió de les grans partícules de greixoses dels aliments per que puguin ser atacades pels enzims pancreàtics i ajuda al transport i l'absorció dels productes finals de la digestió dels greixos a través de la membrana de la mucosa intestinal.
- L'excreció de diferents productes de rebuig de la sang, entre ells la bilirubina, que és un producte final de la destrucció de l'hemoglobina, i també en l'excreció del colesterol sintetitzat per les cèl·lules hepàtiques.

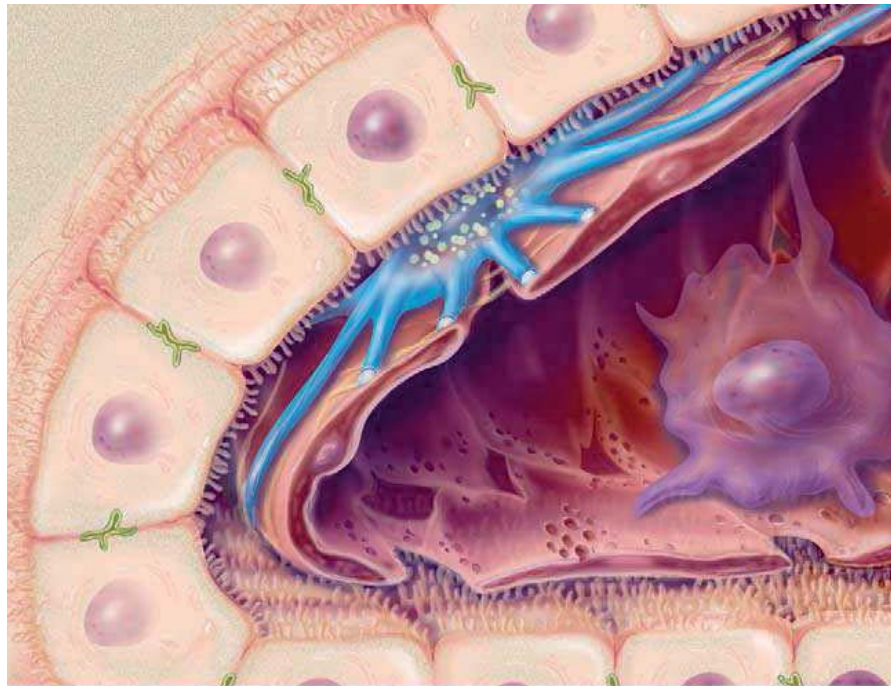
Clínicament, la producció de bilis s'utilitza com a paràmetre de funcionalitat hepàtica; el descens de la producció de bilis indica un fracàs en el funcionament de l'òrgan (4-7).

#### 1.1.5 CÈL·LULES HEPÀTIQUES

- Els **hepatòcits** són les cèl·lules que formen el parènquima hepàtic. Metabòlicament, són les cèl·lules més complexes que existeixen i realitzen múltiples funcions com l'obtenció, emmagatzematge i alliberació d'un gran nombre de nutrients tals com proteïnes plasmàtiques, lipoproteïnes, àcids grassos, colesterol, fosfolípids i glucosa. Els hepatòcits també duen a terme la detoxificació de compostos tòxics per a l'organisme (2, 3, 8, 9) (figura 1.3).
- Les **cèl·lules endotelials** formen la paret dels sinusoides hepàtics i estan separades dels hepatòcits per l'espai de Disse. Entre aquestes cèl·lules hi ha unes grans fenestracions per facilitar l'intercanvi de fluids i macromolècules entre els sinusoides i l'espai de Disse. Les cèl·lules endotelials participen activament en la inflamació, alliberant citocines i òxid nítric davant de determinats estímuls (2, 3, 8, 9) (figura 1.3).
- Les **cèl·lules de Kupffer** són els macròfags del fetge i es troben situats a la superfície de les cèl·lules endotelials. Fagociten eritròcits vells i eliminen bacils que intenten introduir-se a la circulació portal

després del seu pas pels intestins. Quan s'activen, per diferents estímuls, generen mediadors citotòxics com les citocines, radicals lliures d'oxigen (ROS) i proteases. Alguns d'aquests compostos poden ser tòxics per a les cèl·lules adjacents, actuar com a mediadors de la inflamació o bé regular la funció dels hepatòcits (2, 3, 8, 9) (figura 1.3).

- Les **cèl·lules estelades** es troben situades a l'espai de Disse. Aquestes cèl·lules sintetitzen proteïnes de la matriu extracel·lular. A més, són importants mediadors de processos de reparació del fetge i constitueixen el principal reservori de vitamina A de l'organisme(2, 3, 8, 9) (figura 1.3).



**Figura 1.3.** Cèl·lules hepàtiques. Font: Friedman. J Hepatol 2003.

## 1.2 LESIÓ D'ISQUÈMIA-REPERFUSIÓ

### 1.2.1 INTRODUCCIÓ

La lesió per isquèmia-reperfusió (I/R) té lloc quan es duu a terme un procés de trasplantament d'un òrgan i correspon al dany no immunològic de l'empelt que resulta dels processos perioperatoris implicats en l'extracció, la preservació i la reperfusió del fetge donant. La lesió per I/R és un procés complex que s'inicia quan un òrgan es veu privat temporalment de l'aportament sanguini (isquèmia) i es manifesta de manera predominant després del posterior restabliment del flux (reperfusió). Aquesta lesió té dos components fonamentals: la lesió per isquèmia deguda a la hipòxia, i la lesió per reperfusió provocada principalment per la síntesi de mediadors de la inflamació (10, 11).

### 1.2.2 PATOFISIOLOGIA DE LA LESIÓ PER ISQUÈMIA-REPERFUSIÓ

En condicions d'oxigenació habituals, la síntesi dels principals substrats es realitza mitjançant el metabolisme aeròbic, obtenint-ne així l'energia necessària en forma d'ATP, a més a més d'uns metabòlits fàcilment eliminables com són l'anhídrid carbònic i l'aigua.

En la fase d'isquèmia, la falta d'oxigen condueix cap al metabolisme anaeròbic amb un rendiment energètic menor i amb un augment de metabòlits com l'àcid làctic (11-16). L'acidosi resultant altera la cinètica enzimàtica normal i la cèl·lula es veu privada de l'energia necessària per a mantenir la seva homeòstasi. La degradació de l'ATP produeix una alteració de les bombes de sodi/potassi i calci, amb una pèrdua del gradient a través de les membranes cel·lulars (17-19). Aquests fenòmens indueixen una alteració dels orgànuls citoplasmàtics i de la integritat de la membrana que pot portar a la mort cel·lular (20). En aquesta fase, també s'activen enzims proteolítics responsables de la conversió de la xantina deshidrogenasa (XDH) en xantina oxidasa (XOD). Simultàniament, degut a la degradació de l'ATP, es produeix una acumulació de xantina i hipoxantina, que són substrats de la XDH i la XOD. D'aquesta manera, quan arriba la fase de reperfusió, existeix una quantitat de xantina acumulada i l'enzim està en forma oxidasa, de manera que amb el nou aportament d'oxigen, la xantina és metabolitzada per la XOD

i com a subproducte es formen anions superòxid que juguen un paper molt important en la lesió d'isquèmia-reperfusió (21, 22).

En la fase de reperfusió, s'estableix el flux sanguini i amb això tenen lloc dos processos beneficiosos per al teixit isquèmic: es restableix l'aportament d'energia i s'eliminen els metabòlits tòxics. Des d'aquest punt de vista, la reperfusió és un prerrequisit per a la recuperació de la lesió isquèmica. De totes maneres, la incorporació de metabòlits tòxics a la circulació sistèmica pot tenir conseqüències metabòliques greus per culpa de l'acidosis(23). A més, aquesta reperfusió indueix la lesió tissular a nivell local. La lesió hepàtica causada per la reperfusió sembla que consta de dues etapes (24-29). La primera, s'iniciaria immediatament després de la reperfusió i tindria una durada de 4 a 6 hores. Després, hi hauria una segona fase que s'allargaria fins als 2 o 3 dies. Com a fets més rellevants, durant la primera fase trobem la fallada de la microcirculació hepàtica i la generació de diversos mediadors de la inflamació, com els ROS, IL-1, TNF- $\alpha$  per part de les cèl·lules de Kupffer activades, la tumefacció de les cèl·lules endotelials, la vasoconstricció, l'acumulació de leucòcits i l'agregació plaquetària als sinusoides hepàtics donant lloc a una fallada en la microcirculació (24-28, 30-35). En aquesta fase també té lloc un reclutament i adhesió dels neutròfils a l'endoteli (36). En la segona fase, els neutròfils s'activen alliberant encara més ROS i proteases agreujant la lesió (36-39). El dèficit d'energia degut al període d'isquèmia provoca una fallada en el transport actiu de membrana que acaba en edema i tumefacció de les cèl·lules endotelials i les cèl·lules de Kupffer (31). La vasoconstricció és el resultat, entre altres, del desequilibri del balanç d'òxid nítric i les endotelines (40-42). Això comporta l'estrenyiment de la llum dels sinusoides i la disminució de la velocitat dels leucòcits que fa incrementar la freqüència de les interaccions entre les cèl·lules endotelials i els leucòcits fomentant la leucostàsia. Els leucòcits estancats contribueixen a obstaculitzar el flux sanguini de la xarxa de sinusoides fent que s'allargui el període d'hipòxia i que hi hagi zones del fetge que siguin isquèmiques un cop iniciada la reperfusió (43). A més, també comporta l'activació de les cèl·lules de Kupffer que generen citocines inflamatòries (44) i ROS (45), agreujant la lesió hepàtica.



### 1.2.3 RELLEVÀNCIA QUIRÚRGICA

El procediment estàndard per al trasplantament hepàtic s'inicia amb l'extracció de l'òrgan donant en situació de mort cerebral i a cor no parat del pacient donant. La preservació de l'empelt es realitza mitjançant la infusió de la solució UW a 4°C, és aquí on comença el període d'isquèmia freda que en la pràctica clínica sol durar de 6 a 8 hores. Després d'aquest període d'isquèmia freda, l'òrgan serà sotmès a una fase d'isquèmia calenta que comença quan aquest es col·loca a la cavitat abdominal del receptor i es realitza l'anastomosi dels vasos sanguinis, es restableix el flux sanguini i comença la reperfusió de l'empelt. Finalment, es connecta el conducte biliar.

En el trasplantament de donant viu, l'extracció del fetge es fa a partir d'un donant sa i viu. En coordinar la intervenció del donant i del receptor, el temps d'isquèmia freda és molt menor que en el cas del donant en estat de mort cerebral.

Durant tot el procés es poden donar situacions que contribueixin al desenvolupament de la lesió per I/R. En el cas del trasplantament de donant viu, es minimitzen els problemes inherents al donant ja que té un fetge sa. En la preservació i la reperfusió de l'empelt, tenen lloc canvis estructurals que s'accentuen com més gran és el temps d'isquèmia freda. Les lesions de preservació es produeixen durant el període d'extracció i implantació del fetge donant, degut a la falta de flux sanguini, i es poden agreujar quan el fetge ja està implantat en el receptor ocasionant lesions de reperfusió. En el receptor, la gravetat de la lesió per I/R depèn de la durada del període d'isquèmia freda i calenta, de la reducció del flux sanguini des de la vena porta o l'artèria hepàtica, de la durada del procés, de possibles episodis d'hipotensió intraoperatoris i del grau d'isquèmia esplènica (46).

### 1.2.4 DISFUNCIÓ PRIMÀRIA DE L'EMPELT

La lesió per I/R és una de les principals causes de disfunció primària i de fallada primària de l'empelt (47); a més a més de la insuficiència pulmonar i de la fallada multiorgànica associada al trasplantament de fetge.

Després d'un trasplantament hepàtic, sempre es dona alguna disfunció clínica o bioquímica la severitat de la qual depèn del grau de lesió hepàtica. Aquesta lesió primerenca rep el nom de disfunció primària de

l'empelt (DPE). Aquesta disfunció pot ser tant una funció pobre de l'empelt com una fallada primària de l'empelt (FPE), es sent, en aquest últim cas, necessari el retrasplantament(47). A Espanya, segons el "Registro Español de Trasplante Hepático", l'FPE és la segona causa de retrasplantament després de les complicacions tècniques i el rebuig immunològic, es sent responsable del 82,1% dels retrasplantaments durant la primera setmana després del trasplantament hepàtic (46).

### 1.3 TRASPLANTAMENT HEPÀTIC

El trasplantament de fetge és actualment l'única opció terapèutica efectiva per a pacients que pateixen malalties cròniques en fase terminal i insuficiència hepàtica aguda (48). Algunes de les malalties susceptibles de trasplantament de fetge són la insuficiència hepàtica crònica o cirrosi de qualsevol etiologia, la insuficiència hepàtica aguda greu, alguns tumors hepàtics, les anomalies hepàtiques congènites, malalties genètiques o aquells trastorns metabòlics la seva deficiència dels quals resideix en el fetge (tant si originen la malaltia hepàtica com si la repercussió del trastorn metabòlic és fora del fetge) i, per últim, el fracàs del fetge trasplantat (49).

Des que l'any 1963 es va realitzar el primer trasplantament hepàtic amb èxit en l'home, s'han aconseguit millores en els diferents aspectes relacionats amb el trasplantament hepàtic, tals com el mètode de selecció de candidats, la preservació de l'òrgan, les tècniques experimentals i la immunosupressió.

A Espanya, el número de donacions d'òrgans i trasplantaments de fetge suposen les taxes per milió d'habitants més elevades del món i la mitjana de temps d'espera per al trasplantament hepàtic és menor que en la resta d'Europa (46). De totes maneres, encara que aquestes xifres denoten un benefici en la supervivència, hi ha un creixement progressiu de les llistes d'espera, fet que comporta que un número considerable de pacients morin esperant un fetge per poder ser trasplantat.

La cirurgia del trasplantament hepàtic es pot dividir en dues fases: la cirurgia del donant i la cirurgia del receptor (49):

### 1.3.1 CIRURGIA DEL DONANT

Extracció de l'òrgan: Després de l'exploració de la cavitat abdominal per valorar la grandària, color i consistència de l'òrgan, es dissecciona el retroperitoneu inframesocòlic, aïllant l'aorta abdominal, a nivell de la bifurcació, i la vena cava inferior, per a realitzar una canulació ràpida dels vasos en cas de necessitat. Posteriorment, s'identifica i es dissecciona l'hílum hepàtic i es passa a canular l'aorta abdominal i el sistema portal per perfondre el líquid de preservació, i es canula la vena cava inferior per facilitar l'exsanguinació i impedir l'edema. Quan el fetge ja està alliberat dels seus elements de fixació lligamentosos, es procedeix a seccionar la vena cava infrahepàtica per sobre de les venes renals, l'aorta abdominal amb el tronc celíac i, fins i tot, l'òstium de l'artèria mesentèrica superior. Per últim, es procedeix a seccionar part del diafragma.

Transport de l'òrgan i cirurgia del banc: L'òrgan s'introdueix en un recipient hermètic i estèril que conté la solució de preservació a 4°C. Seguidament, es col·loca aquest recipient en una nevera portàtil plena de gel. La cirurgia del banc consisteix a examinar l'òrgan en condicions de hipotèrmia, i preparar els caps vasculars per a la posterior anastomosi. Bàsicament, es realitza la dissecció de la vena cava infrahepàtica, la vena porta, el tronc celíac i la via biliar.

Preservació de l'òrgan: Amb la preservació de l'òrgan es vol aconseguir satisfer les necessitats metabòliques d'aquest durant l'emmagatzematge i protegir les cèl·lules davant els efectes adversos de la isquèmia (falta d'aportament sanguini). La solució de preservació més utilitzada és la solució de la Universitat de Winsconsin (UW), que es basa en: 1) l'ús de la rafinosa i el lactobionat (en comptes de glucosa) per evitar la inflor cel·lular induïda per la hipotèrmia, 2) tampons adequats ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) que evitin l'acidosis intracel·lular, 3) els col·loides (hidroxietil starch, HES) per a mantenir la integritat de l'espai intersticial, 4) els inhibidors dels ROS (glutatió i al·lopurinol) i, 5) els precursors de l'ATP (adenosina i adenina) que mantenen l'estat energètic cel·lular i permeten una funció adequada de la bomba de sodi-potassi.

### 1.3.2 CIRURGIA DEL RECEPTOR

Fase d'hepatectomia: La dissecció del fetge comença buscant un pla adequat per fora de la càpsula del fetge. Posteriorment, s'identifiquen i s'alliberen les diferents estructures de l'hílum hepàtic i es lliga l'artèria hepàtica. La dissecció de la via biliar es realitza després de la secció entre unes determinades lligadures. A continuació, es dissequen la vena porta i la cava inferior. En aquest moment s'extreu el fetge, després d'haver col·locat uns clamps vasculars, que interrompen el flux sanguini, a la vena porta, la cava infrahepàtica i la cava suprahepàtica.

Fase anhepàtica: Durant aquesta fase s'origina la interrupció brusca del retorn venós de les venes porta i la cava inferior, fet que provoca congestió venosa en el terreny esplènic, així com la disminució de la pressió arterial pulmonar i de la despesa cardíaca. Es retira el fetge del camp quirúrgic i es preparen els pedicles vasculars per a la reconstrucció vascular.

Fase d'implantació: En aquesta fase els aspectes tècnics són molt crítics. Es realitza l'anastomosis (unió de caps vasculars del fetge donant amb els del fetge receptor) de la vena cava suprahepàtica, de la vena cava infrahepàtica, de la vena porta, de l'artèria hepàtica i es procedeix a la reconstrucció biliar.

Fase de revascularització o reperfusió: En finalitzar l'anastomosi venosa es procedeix a la revascularització de l'empelt retirant els clamps vasculars. És important comprovar que l'empelt es revascularitza de manera ràpida, homogènia i que adquireix una consistència adient.

### 1.3.3 ESTRATÈGIES PER A AUGMENTAR EL NOMBRE D'EMPELTS

El factor limitant més important per a l'aplicació del trasplantament hepàtic és la falta d'òrgans donants. Aquest fet provoca que no tots els pacients puguin rebre un fetge (50). La diferència entre el número d'òrgans disponibles i el número de receptors potencials va en augment com a conseqüència de l'augment de les indicacions per al trasplantament, el descens de les contraindicacions a causa dels avenços tècnics i en el camp de la anestesiologia i per l'augment de la mortalitat deguda a malalties hepàtiques (50).

Per intentar disminuir el dèficit d'òrgans s'han adoptat diferents estratègies: L'edat màxima i mitja dels donants s'ha ampliat fent que aquest factor ja no sigui limitant a l'hora d'acceptar un fetge per a trasplantament (51-54), i han deixat de ser rebutjats els òrgans de persones que patien algunes malalties cròniques com la hipertensió arterial o la diabetis mellitus. Tot i això, actualment aproximadament un 20% dels empelts són rebutjats per no estar considerats aptes per al trasplantament (46).

El desenvolupament de noves tècniques quirúrgiques en la pràctica clínica també ha augmentat el número de trasplantaments possibles. Algunes d'aquestes tècniques són la tècnica de Split, el trasplantament de donant viu, el trasplantament dòmino i el trasplantament a cor parat:

Tècnica de Split: La tècnica de Split o de bipartició hepàtica permet la realització de dos trasplantaments hepàtics a partir d'un únic fetge donant. La freqüència d'aquesta tècnica ha augmentat en els últims anys amb resultats satisfactoris. En el seus començaments, aquesta tècnica va ser desenvolupada per equips de cirurgia pediàtrica davant la falta de donants en aquest sector de la població i la necessitat d'un escàs volum hepàtic que generalment no sobrepassava el 20% de la massa hepàtica d'un fetge adult. D'aquesta manera, aquesta tècnica es va començar a realitzar utilitzant un mateix empelt que s'implantava en un receptor pediàtric i un altre d'adult. Posteriorment, es va començar a utilitzar aquesta tècnica per a realitzar el trasplantament a dos receptors adults, un d'ells de pes inferior a 60kg (55-57).

Trasplantament de donant viu: Aquesta tècnica consisteix a utilitzar com a empelts segments hepàtics provinents d'un donant viu. Inicialment, aquesta tècnica va ser utilitzada per a receptors pediàtrics (58) però l'any 1994 es va reportar el primer cas d'un trasplantament hepàtic a un receptor adult realitzat amb un lòbul dret d'un donant viu (59). Actualment, aquesta modalitat representa una alternativa vàlida i segura en centres amb experiència en cirurgia hepàtica arribant a representar el 25% del total de trasplantaments realitzats (60).

Trasplantament dòmino: El trasplantament dòmino consisteix a utilitzar com a empelt un fetge d'un receptor pre al qual la indicació per al trasplantament sigui la polineuropatia amiloidòtica familiar (61, 62). La polineuropatia amiloidòtica familiar és una malaltia metabòlica crònica en la que el fetge està estructural i funcionalment bé però té una síntesi anòmala

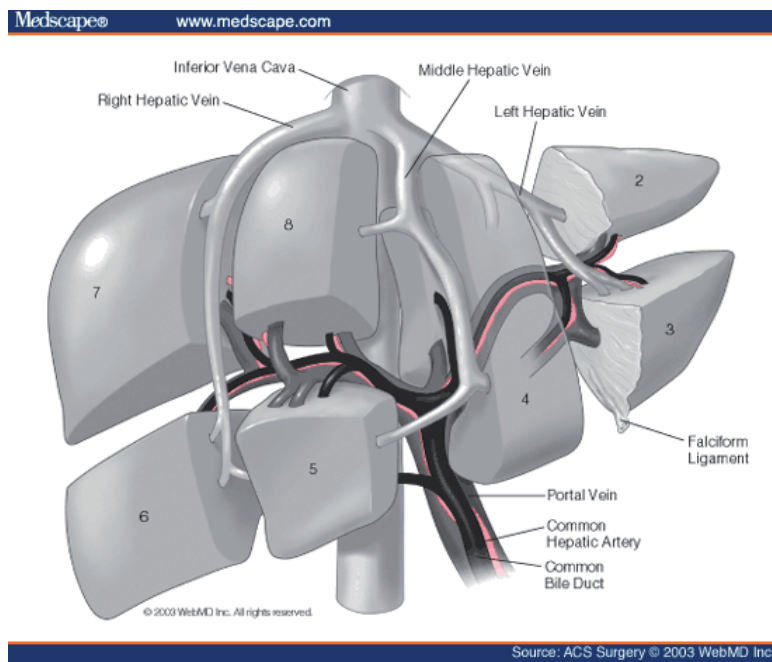
d'una proteïna denominada transferrina, que provoca el dipòsit d'una substància amiloide en diferents òrgans, però sobretot al sistema nerviós autònom. Els símptomes es comencen a manifestar entre la segona i la tercera setmana de vida encara que en alguns casos triga fins a 75 anys a manifestar-se (63, 64). La utilització d'aquests empelts estaria indicada en receptors d'edat avançada o en aquells tumors hepàtics de mal pronòstic en els quals la supervivència esperada després del trasplantament sigui menor al temps de desenvolupament dels símptomes de la polineuropatia amiloidòtica familiar.

Donant a cor parat: El donant a cor parat va ser, al començament del trasplantament, l'única font de òrgans donants fins que es va acceptar el concepte de mort cerebral. El principal inconvenient que presenta aquesta modalitat és que no es pot saber amb exactitud el temps d'isquèmia calenta (període en que l'òrgan no ha estat irrigat per la sang arterial mantenint-se dins l'organisme) a la qual ha estat sotmès l'empelt abans de la seva extracció. Actualment, hi ha diversos estudis que han demostrat que amb la utilització d'òrgans, com ara el ronyó (65, 66), procedents de donants a cor parat es poden obtenir resultats molt similars als obtinguts amb donants en estat de mort cerebral. L'experiència en trasplantament de fetge encara és molt limitada i les dades disponibles encara són poques.

#### 1.3.3.1 TRASPLANTAMENT HEPÀTIC DE MIDA REDUÏDA

El trasplantament d'empelt hepàtic de mida reduïda (ROLT) es va desenvolupar amb la finalitat de disminuir la mortalitat associada a la falta d'òrgans de donants en estat de mort cerebral i per la necessitat de tenir empelts de mida petita per a receptors pediàtrics i adults de poc pes. El ROLT engloba el conjunt de tècniques que redueixen un fetge natiu en un empelt de mida menor (67).

La utilització d'empelts hepàtics reduïts es troba associat amb una important taxa de disfunció primària de l'empelt (68). La reducció del fetge suposa generalment un procés llarg podent produir-se períodes d'hipotèrmia no adients. De totes maneres, la utilització de empelts reduïts de donant viu no presenta aquesta tendència degut als curts temps d'isquèmia freda que pateixen (69).



**Figura 1.4.** Segments hepàtics. Font: ACS Surgery 2003.

L'anatomia dels segments del fetge permet dividir aquest òrgan en unitats funcionals independents, amb aportaments sanguinis (venosos i arterials) separats i, de la mateixa manera, amb fluxos de sortida i drenatges biliars independents (67) (figura 1.4). Aquestes unitats es presenten a la taula 1.1.

Tipus d'empelt	Segments hepàtics
Dret complet	V VI VII VIII ± I
Esquerre complet	II III IV ± I
Lateral esquerre	II III
Esquerre extès	I IV V VI VII VIII

**Taula 1.1.** Tipus d'empelts en funció dels segments hepàtics

A continuació es descriuran les tres tècniques incloses en el ROLT.

### 1.3.3.2 TRASPLANTAMENT HEPÀTIC DE DONANT DIFUNT AMB EMPELT DE MIDA REDUÏDA

La tècnica del trasplantament de fetge reduït consisteix en la reducció d'un fetge provinent d'un donant difunt de gran grandària per introduir-lo en un receptor de menors proporcions. Amb aquesta tècnica s'ha aconseguit reduir notablement la mortalitat infantil en pacients en espera d'un empelt hepàtic. El trasplantament hepàtic reduït permet tractar nens menors de nou mesos de les seves afeccions hepàtiques.

L'any 1975, Starzl va realitzar el primer trasplantament hepàtic de mida reduïda encara que sense èxit (70). El 1984, Broelsch i Bismuth duen a terme simultàniament aquest procés amb èxit (71, 72).

El tipus d'empelt hepàtic escollit depèn bàsicament de la diferència de mida entre donant i receptor. L'empelt dret complet normalment cap en un receptor de la meitat de la grandària del donant. En canvi, l'empelt esquerre complet permet una relació de grandària donant/grandària receptor 1:4. En el cas de l'empelt lateral esquerre, la relació seria de 10:1 (67). De totes maneres, la decisió final es pren després de visualitzar el fetge donant i la fosa hepàtica del receptor. La situació ideal és que es realitzi la reducció de l'empelt per un equip diferent al mateix temps que es realitza l'hepatectomia del receptor, per minimitzar els temps d'isquèmia freda.

S'ha demostrat que aquesta tècnica és tan efectiva com el trasplantament d'un empelt hepàtic sencer (73, 74), amb una supervivència a l'any del 80%. Aquesta tècnica elimina el problema de la diferència de grandària entre donant i receptor.

### 1.3.3.3 TRASPLANTAMENT HEPÀTIC SPLIT

En el trasplantament hepàtic Split s'obtenen dos empelts a partir d'un donant difunt i es trasplanta a dos receptors diferents. El primer en realitzar aquest tipus de trasplantament va ser Pichlmayer l'any 1988 (75).

Segons on es realitzi la divisió del fetge obtindrem empelts de diferents grandàries:

-Si l'hemihepatectomia es realitza a l'esquerra de la línia de Cantilie, s'obtenen un empelt dret complet i un empelt lateral esquerra. El segment IV es descarta.



-Si la línia de divisió és la línia Cantillie s'obtenen dos empelts complets, el dret i l'esquerre.

-Quan la divisió es realitza seguint el lligament falciforme, s'obtenen un empelt dret estès i un altre lateral esquerre.

La tècnica de Split és similar a la utilitzada en el trasplantament de mida reduïda però en aquest cas s'han de tractar curosament les dues meitats separant perfectament els vasos i els conductes biliars.

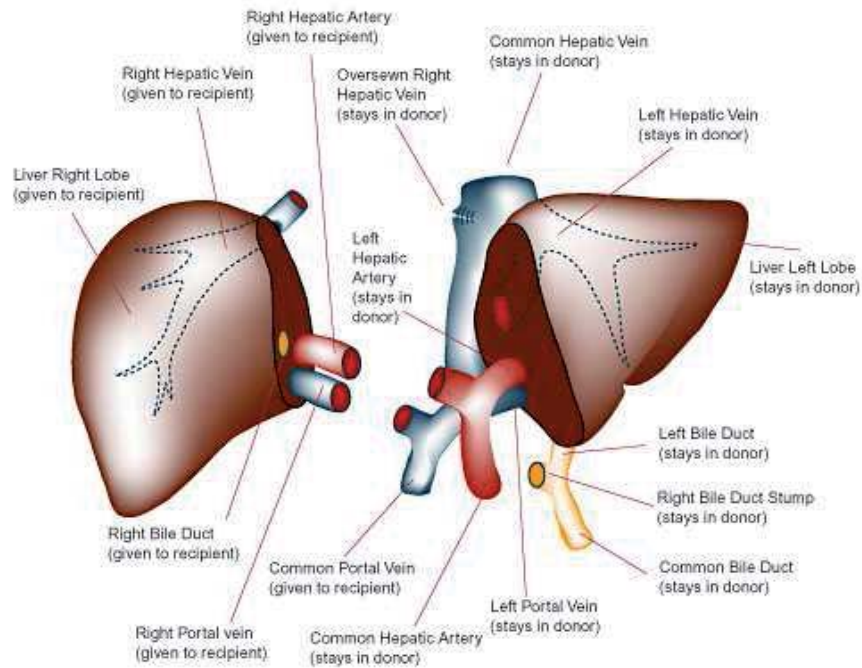
El trasplantament hepàtic Split es va utilitzar, inicialment, en situacions d'emergència i no es van obtenir bons resultats, sobretot en els empelts de la meitat dreta (51). Als seus inicis, aquesta tècnica va ser desenvolupada per a receptors pediàtrics i més tard es va utilitzar per a trasplantar un receptor pediàtric i un receptor adult. Posteriorment, es va començar a utilitzar per a trasplantar dos receptors adults (un d'ells amb pes inferior a 60kg) (71, 76, 77). Actualment, s'han obtingut resultats millors amb una supervivència a l'any del 75% (78).

Amb aquesta tècnica s'augmenta el número d'empelts a trasplantar tot i que presenta un sèrie d'inconvenients: Són necessaris dos o tres tipus d'equips mèdics, dues sales d'operacions, dos equips de anestesiologia, els temps d'isquèmia freda són alts i és una tècnica molt complexa.

#### 1.3.3.4 TRASPLANTAMENT HEPÀTIC DE DONANT VIU

En el trasplantament hepàtic de donant viu l'empelt s'obté de l'hepatectomia d'un familiar del receptor (figura 1.5). Aquesta tècnica representa un gran avenç per a superar la falta d'òrgans en pacients pediàtrics i es va poder desenvolupar gràcies a l'experiència prèvia amb el trasplantament Split (67). L'any 1988 va tenir lloc el primer cas conegut en nens i l'any 1994 el primer cas en adults (79).

En el trasplantament pediàtric (d'adult a nen) de donant viu es trasplanta el lòbul lateral esquerre o l'esquerre complet, dependent del pes del receptor. En el cas del trasplantament de donant viu d'adult a adult, s'han obtingut bons resultats utilitzant l'empelt dret complet, però en receptors de poc pes s'utilitza el lòbul esquerre, i també l'esquerre estès, per a receptors de major pes(79).



**Figura 1.5.** Trasplantament hepàtic de donant viu. Font: Schwartz, Principles of Surgery, 8a ed.

En aquest tipus de trasplantament s'han de tenir en compte algunes consideracions ètiques: Només un parent completament sa pot ser el donant, ja que existeix un risc mínim per al donant amb una mortalitat del 0,5%. Els resultats per al receptor són excel·lents amb un 80-90% de supervivència a l'any del trasplantament (79, 80).

Per al receptor, el risc quirúrgic és similar al que existeix quan es realitza un trasplantament Split del lòbul esquerre. Els beneficis potencials són remarcables: A) possibilitat d'accés al trasplantament sense haver d'enregistrar-se a la llista d'espera el pacient, B) el trasplantament es realitza en condicions òptimes ja que és una operació programada, C) la qualitat de l'empelt és millor perquè el donant és una persona sana i no existeix el deteriorament que es produeix per la mort cerebral en el donant difunt, D) el temps de preservació (isquèmia freda) de l'empelt es redueix al coordinar-ne les operacions del donant i del receptor i, E) s'obté una major compatibilitat immunològica ja que el donant i el receptor són parents propers (81-83).

Tot i que és una tècnica més complexa que el trasplantament total o el de mida reduïda aquesta modalitat quirúrgica representa actualment una alternativa vàlida i segura en els centres amb experiència en cirurgia hepàtica arribant a representar el 25% del total dels trasplantaments realitzats (84). L'any 1988 s'havien realitzat 800 trasplantaments de donant viu a tot el món,

la major part d'aquests s'havien realitzat al Japó, on fins fa poc estava prohibida l'obtenció d'òrgans a partir de donants difunts (81). Per un altra banda, la utilització de donants vius és una tendència creixent als Estats Units d'Amèrica, on el 60% dels trasplantaments hepàtics es realitzen amb aquest mètode. A Espanya, hi ha una gran quantitat de donants per la qual cosano és tan necessària aquesta opció.

#### 1.4 REGENERACIÓ HEPÀTICA

El fetge és l'únic òrgan del cos que és capaç de regenerar-se totalment després d'una agressió o una resecció. La capacitat del fetge per regenerar-se va ser reconeguda per primer cop en l'antic mite de Prometeu, el mortal que va robar el foc dels déus per donar-lo als humans. Prometeu va ser castigat i encadenat a una roca on cada dia els ocells se li menjaven el fetge, però durant la nit se li regenerava, d'aquesta manera era condemnat eternament. Aquesta història il·lustra la increïble capacitat del fetge per regenerar-se: És l'únic òrgan capaç de fer-ho i, al mateix temps, de mantenir alhora la seva funció metabòlica.

Totes les evidències fins ara mostren que l'hepatòcit totalment diferenciat el que es replica en massa i al mateix instant per aconseguir una regeneració ràpida del fetge després d'una hepatectomia (85). Amb el temps i la investigació duta a terme per diferents científics, cada cop es coneix més bé tota la xarxa d'esdeveniments que es donen després d'una hepatectomia. És conegut que certes citocines i factors de creixement, com el factor de necrosi tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) o la interleucina 6 (IL-6), juguen papers primordials en la iniciació de la regeneració hepàtica, fet que es coneix com a "priming". El "priming" consisteix en la preparació dels hepatòcits de manera que obtinguin capacitat proliferativa i així puguin entrar en el cicle cel·lular, responent a factors de creixement com el factor de creixement hepatocitari (HGF), el factor de creixement transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) o el factor de creixement epidermal amb capacitat d'unió a l'heparina (HB-EGF). Aquest alliberament d'IL-6 induït pel TNF- $\alpha$  per part de les cèl·lules de Kupffer i que té com a conseqüència la replicació de l'hepatòcit, també estimula l'activació de factors de transcripció tals com el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), el factor de transducció de senyal i activador de la transcripció 3 (STAT3), la cinasa regulada per factors extracel·lulars (ERK) i la c-Jun N-terminal cinasa (JNK).

Aquest procés lidera l'activació d'una gran quantitat de gens, immediats i retardats, necessaris per a les funcions normals del fetge com ara la regeneració i la reparació, o com les ciclines que són les proteïnes encarregades de regular l'entrada i la progressió del cicle cel·lular (revisat a (86)).

Qualsevol de les tècniques de trasplantament hepàtic de mida reduïda porta associada una regeneració post-trasplantament de l'empelt. La regeneració hepàtica és crítica per a l'èxit del trasplantament de donant viu i té lloc ràpidament tant en el donant com en el receptor. Si es trasplanta el lòbul dret, després de la donació, el lòbul esquerre duplica la seva grandària als 7 dies i arriba a més del 85% de la massa hepàtica pre-donació al mes de la cirurgia. El lòbul dret trasplantat també duplica la seva grandària en 7 dies i excedeix la massa intacta del donant als 14 dies.

La capacitat de regeneració del fetge quan pateix una lesió o una reseció quirúrgica no deixa de sorprendre ja que aquest és un òrgan quiescent, en termes de proliferació cel·lular (87), en el que tan sols menys del 0,01% dels hepatòcits s'estan dividint en un moment determinat.

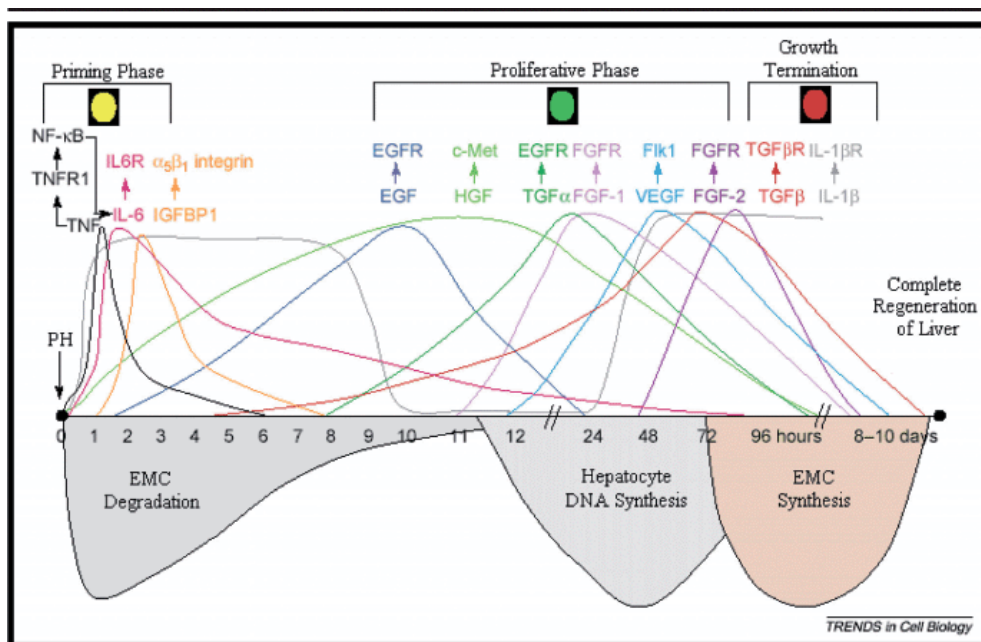


FIGURE 1 - Scheme for the start and stop of the liver regeneration (11).

Figura 1.6. Factors implicats en la regeneració hepàtica. Font: Mohammed F & Khokha R, Trends Cell Biol, 2005.

Una lesió hepàtica o una resecció quirúrgica provoca una proliferació massiva dels hepatòcits supervivents que s'interromp quan la massa del fetge arriba a una fracció determinada del pes de l'individu, que varia amb l'edat i l'espècie (87). Per exemple, si s'extreu el 40 % de l'òrgan, el donant recupera la massa perduda als 6 mesos. Encara que els hepatòcits són els primers a proliferar, tots els tipus cel·lulars hepàtics es divideixen, des de les cèl·lules epitelials biliars fins les cèl·lules endotelials, passant per les cèl·lules de Kupffer (88). La cinètica de la proliferació cel·lular és diferent entre espècies. Immediatament després de l'estímul regeneratiu, els hepatòcits surten de l'estat  $G_0$  per entrar en la fase  $G_1$ , dupliquen el seu DNA en la fase S i entren en la fase M (fase de mitosi), arribant al pic de màxima regeneració a les 24 hores en el cas de les rates. Existeix un segon pic de regeneració menor entre les 36 hores i les 48 hores (87, 88). Els altres tipus cel·lulars entren en divisió 24 hores després dels hepatòcits.

Segons Nelson Fausto, la regeneració hepàtica es divideix en dues etapes: L'entrada de l'hepatòcit en cicle cel·lular des del seu estat quiescent (Iniciació) i la progressió a través del punt de restricció de la fase  $G_1$  (Progressió). Segons aquest autor, aquestes etapes estan controlades independentment l'una de l'altra. En la iniciació hi intervindrien les citocines, el factor de necrosi tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i la interleucina-6 (IL-6). En la progressió hi intervindrien factors de creixement com el factor de creixement hepatocitari (HGF) i el TGF- $\beta$  (89) (figura 1.6).

En la regeneració hepàtica hi intervenen diferents citocines i factors de creixement, però només ens centrarem en uns determinats ja que tenen una rellevància especial en aquest estudi. Les cèl·lules no parenquimals del fetge tenen una funció important com a font de factors de creixement i interleucines que promouen i inhibeixen la proliferació dels hepatòcits, encara que fins avui no és del tot conegut el paper individual de cada tipus cel·lular. Les cèl·lules de Kupffer produeixen i alliberen citocines proliferatives TNF- $\alpha$  i IL-6, i citocines antiproliferatives IL-1 i TGF- $\beta$  (90). Les cèl·lules endotelials dels sinusoides, encara que no són la font majoritària de citocines, són capaces de generar TGF- $\beta$ , HGF i IL-6. Les cèl·lules estrellades sintetitzen i alliberen HGF i TGF- $\beta$  (90) (figura 1.7).

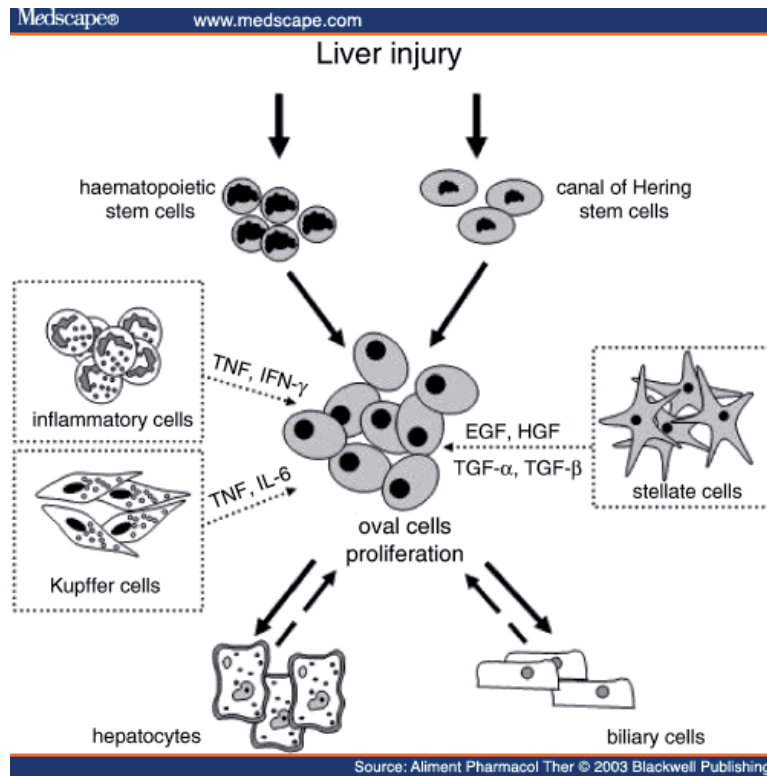


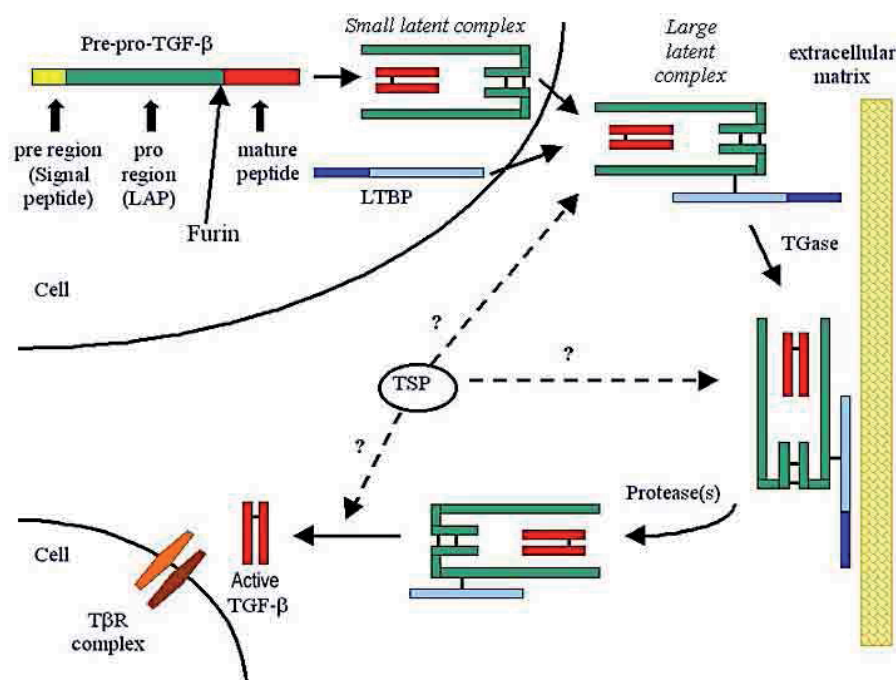
Figura 1.7. Interacció entre les cèl·lules hepàtiques durant la regeneració del fetge. Font: Aliment Pharmacol Ther, 2003.

#### 1.4.1 HGF

L' HGF va ser descobert gràcies a la seva capacitat d'induir la síntesi de DNA en un cultiu d'hepatòcits, però ara se sap que també té efectes pleiotròpics en altres teixits. Aquest factor exerceix els seus efectes a través de la unió al seu receptor, anomenat c-met tirosina cinasa (91). Estudis *in vivo* van demostrar la seva capacitat inductora de la regeneració hepàtica. També s'ha observat el seu augment en plasma quan es produeix una disminució de la massa hepàtica tant en humans com en rates (88, 91). En un estudi de trasplantament hepàtic de mida reduïda en rata, l'administració de HGF va donar lloc a un augment de la regeneració hepàtica de l'empelt (92). A més a més, en un estudi amb un model de regeneració hepàtica per administració de tetràclorur de carboni, l'administració d'anticossos anti-HGF va impedir la regeneració correcta del fetge (93).

### 1.4.2 TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$  és un factor que inhibeix la divisió dels hepatòcits en cultiu. Pertany a una superfamília de més de 30 membres. Aquest factor és sintetitzat en forma de prepro-molècula i requereix certes modificacions per a la seva activació. De la família del TGF- $\beta$  se'n coneixen tres membres: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, i, TGF- $\beta$ 3. Cada proteïna d'aquesta família té un pèptid senyal a l'extrem N-terminal de 20-30 aminoàcids, una pro-regió (anomenada pèptid associat a la latència o LAP) i una regió de 112-114 aminoàcids a l'extrem C-terminal que es converteix en el TGF- $\beta$  madur després del seu alliberament de la pro-regió a través d'un tall proteolític. El TGF- $\beta$  dimeritza per formar una estructura activa de 25 KDa. L'associació amb el pèptid LAP serveix al TGF- $\beta$  per facilitar el trànsit d'aquesta proteïna des de l'interior cel·lular i per donar lloc a un TGF- $\beta$  biològicament inactiu. El LAP es desprèn amb pH extrems, calor, proteases o altres mecanismes (94) (figura 1.8).



**Figura 1.8.** Processament del TGF $\beta$ . Font: Gressner et al. Front Biosci, 2002.

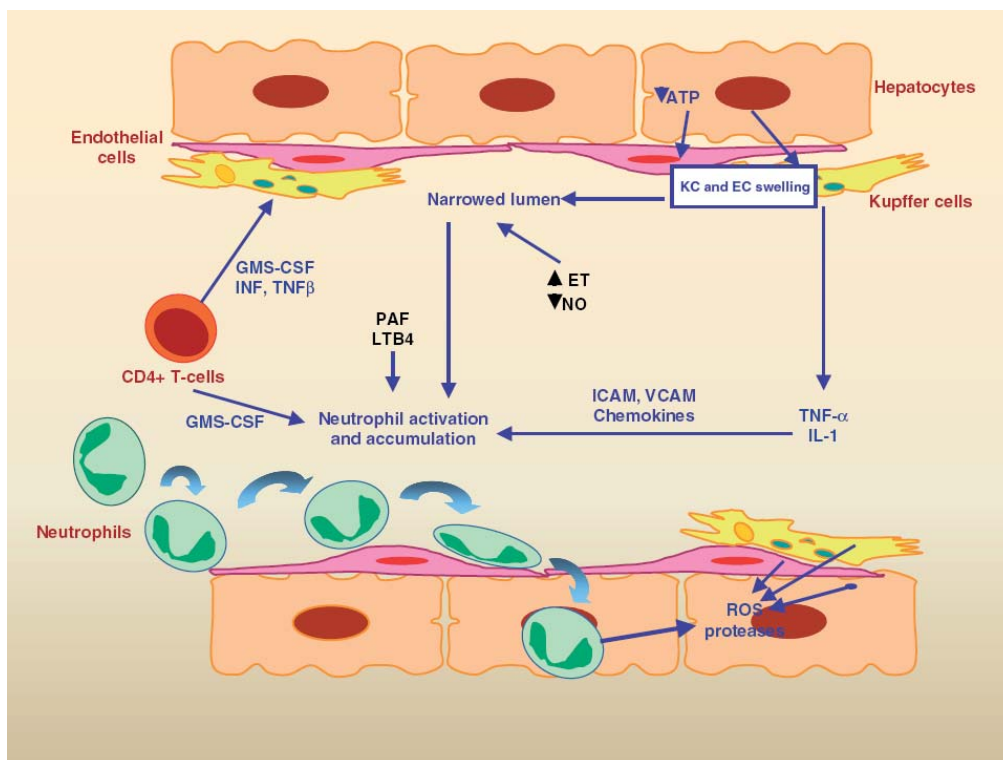
Al fetge, el TGF- $\beta$  es comença a sintetitzar a les poques hores de l'hepatectomia, arribant a la seva màxima concertació cap a les 48 hores.

L'administració intravenosa de TGF- $\beta$  inhibeix la fase primerenca de la regeneració hepàtica després d'una hepatectomia a la rata (95). A més, el tractament amb anticossos anti-TGF- $\beta$  a rates que se'ls ha practicat una hepatectomia, dóna lloc a un augment de la regeneració del fetge (96).

### 1.4.3 LA REGENERACIÓ HEPÀTICA EN CONDICIONS D'ISQUÈMIA-REPERFUSIÓ: FACTORS

#### 1.4.3.1 INTRODUCCIÓ

Quan el fetge és sotmès a un procés d'I/R aquest pateix un dany hepàtic resultat de la interacció entre els diferents mecanismes duts a terme per diferents tipus cel·lulars (figura 1.9).



**Figura 1.9.** Representació esquemàtica dels esdeveniments cel·lulars i intravasculars en la I/R després d'un trasplantament. Font: Massip-Salcedo et al., Liver Int, 2006.

En la present tesis ens centrarem en el sistema renina-angiotensina, la bradiginina (BK), les metal·loproteinases de matriu (MMP), la c-jun N-terminal cinasa (JNK) i l'òxid nítric (NO) que són factors implicats en la lesió per



isquèmia-reperfusió i que poden afectar a la regeneració hepàtica després d'un trasplantament de mida reduïda.

#### 1.4.3.2 NUCLEÒTIDS D'ADENINA

Existeix una correlació directe entre el contingut d'ATP en el fetge al final de la isquèmia freda i la recuperació del pacient trasplantat (97). Resultats obtinguts a partir d'un model d'hepatectomia parcial van mostrar que existeix una relació entre els nivells d'ATP al fetge romanent i la regeneració hepàtica del mateix (98). També s'ha vist que la isquèmia freda inhibeix la síntesi de DNA en un model d'hepatectomia parcial (99).

#### 1.4.3.3 RADICALS LLIURES D'OXIGEN

Els ROS estan fortament implicats en la lesió per I/R i tenen una influència negativa sobre la divisió cel·lular ja que danyen les proteïnes i el DNA (13, 99, 100). L'activació de les cèl·lules de Kupffer i els neutròfils, l'acumulació de la xantina, la conversió de XDH a XOD i els desordres mitocondrials que es produeixen en la I/R són responsables de la producció de ROS.

Estudis d'altres grups han implicat els neutròfils i les cèl·lules de Kupffer en la formació de ROS responsables de la lesió per I/R (25, 37, 101-103). De totes maneres, altres estudis han posat en dubte que aquests dos tipus de cèl·lules fossin les fonts majoritàries de ROS en aquest tipus de lesió (104, 105).

El sistema XDH/XOD intervé en el metabolisme final de degradació dels àcids nucleics. Aquest enzim presenta dues isoformes que catalitzen les mateixes reaccions: el pas d'hipoxantina a xantina i de xantina a àcid úric. La diferència està en què la forma deshidrogenasa utilitza  $\text{NAD}^+$  com a acceptor d'electrons, mentre que la forma oxidasa utilitza la molècula de l'oxigen, generant radical superòxid (106).

Com ja hem comentat abans, durant la isquèmia es duu a terme la conversió de la forma XDH a la forma XOD i, degut a la degradació d'ATP, fet que també s'esdevé en la isquèmia, es produeix una acumulació de xantina i hipoxantina. Aquests fets provoquen que durant la fase de reperfusió es formi anió superòxid, que és un tipus de ROS.

S'ha demostrat, en diferents models experimentals d'I/R normotèrmica i de trasplantament hepàtic, que durant la reperfusió hi ha una gran quantitat de XOD, i que l'al·lopurinol (inhibidor de la XOD) disminueix la lesió per I/R en el fetge, demostrant així que el sistema xantina/XOD pot ser el sistema clau en la generació de ROS associats a la I/R hepàtica (21, 22).

#### 1.4.3.4 ELS NEUTRÒFILS

Com a conseqüència de la I/R, es produeix una acumulació de neutròfils facilitada per una sèrie de factors que alteren les característiques d'adherència d'aquests, així com una xarxa d'interaccions entre leucòcits, citocines i quimioatracients (107). Entre aquests factors hi trobem l'alliberació de substàncies des dels hepatòcits, la producció de citocines per part de les cèl·lules de Kupffer i l'augment de l'expressió de molècules d'adhesió com la ICAM-1 (108, 109).

Diversos treballs han demostrat que l'activació dels neutròfils està implicada en la lesió del parènquima i en les alteracions de la microcirculació associats a la I/R (26, 29, 33, 37, 110, 111). En prevenir la infiltració de neutròfils als teixits, tant disminuint el número de neutròfils com disminuint l'adhesió d'aquests, es redueix significativament la fallada de la microcirculació i la lesió tissular en models animals d'I/R (39, 112).

En el moment que els neutròfils s'activen alliberen proteases i ROS. Aquests ROS, al entrar en contacte amb el hepatòcits i les cèl·lules endotelials dels sinusoides, produeixen l'oxidació dels àcids grassos de la membrana plasmàtica i faciliten la lesió per les proteases (113), podent afectar també a la regeneració hepàtica en el cas del trasplantament amb empelt de mida reduïda, ja que les proteases són imprescindibles per a la regeneració del fetge i els ROS inhibeixen la divisió cel·lular (99, 100).

#### 1.4.3.5 LES CITOCINES

Les citocines són proteïnes produïdes per diverses cèl·lules, principalment limfòcits activats i macròfags, però també cèl·lules endotelials, epitelials i del teixit conjuntiu.

Les citocines proinflamàtores més importants en la lesió per I/R són el TNF- $\alpha$  i la IL-1. Les dues indueixen la síntesi de la IL-8 (114) i regulen

l'expressió de molècules d'adhesió promovent una major alliberació de citocines. El paper d'aquestes citocines en la I/R ha estat demostrat en diversos estudis on es reporta la disminució de la lesió per I/R amb una menor infiltració de neutròfils i un descens en la lesió del parènquima hepàtic quan aquestes citocines són inhibides o impedides de la seva funció (45, 115).

Sobre el paper d'aquestes citocines sobre la regeneració hepàtica se sap que el TNF- $\alpha$  actua com a agent responsable de la iniciació de la proliferació dels hepatòcits en la primera fase de la regeneració hepàtica, deixant les cèl·lules preparades per tal que responguin als factors de creixement (89, 91). D'altra banda, la IL-1 té una acció inhibidora sobre la regeneració hepàtica ja que és capaç d'inhibir la proliferació cel·lular dels hepatòcits en cultiu (116, 117) i de disminuir la regeneració hepàtica quan és administrada exògenament (117).

#### 1.4.3.6 L'ÒXID NÍTRIC

L'òxid nítric (NO) és una molècula que actua de missatgera intracel·lular i extracel·lular, produïda per una família d'enzims anomenats NO sintases (NOSs).

S'han descrit tres tipus de NOS: L'endotelial (eNOS), la neuronal (nNOS) i la induïble (iNOS), essent les dues primeres constitutives. La nNOS és exclusivament d'origen neuronal i l'eNOS d'origen endotelial de la vasculatura hepàtica (118, 119). Contràriament, la iNOS no s'expressa constitutivament al fetge sinó que ho fa de manera induïble i, quan ho fa, ho fa en gairebé en tots els tipus cel·lulars del fetge si hi ha l'estímul adient.

El paper de l'NO en la lesió per I/R és controvertit. Alguns autors diuen que l'NO té efectes benèfics davant d'una I/R en fetge (120-123), mentre que d'altres diuen que l'NO participa en la resposta davant d'una I/R hepàtica en el seu paper perjudicial (124). Se sap, però, que l'NO pot ser beneficiós a través de la millora en les alteracions de la microcirculació hepàtica i la disminució de l'acumulació de neutròfils (125-127). D'una altra manera, la producció excessiva d'NO pot ser citotòxica ja que pot reaccionar amb l'anió superòxid i formar peroxinitrit, que és una espècie reactiva altament oxidant (128-130).

Pel que fa a l'efecte de l'NO sobre la regeneració hepàtica, se sap que l'NO és necessari per a la viabilitat dels hepatòcits (131) i que juga un paper important en la repoblació hepatocitària del fetge (87). Després d'una hepatectomia, el fetge romanent rep el flux que abans rebia tot el fetge sencer produint-se una major quantitat d'NO per part de les cèl·lules endotelials. Aquest fet porta els hepatòcits a entrar en la fase G<sub>1</sub> i que comenci la regeneració hepàtica (87). Sembla que l'iNOS té un paper més important a les 6-8 hores després de l'hepatectomia (87).

#### 1.4.3.7 EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (RAS)

L'Angiotensina II (AngII) és una hormona endocrina clàssica considerada com un dels vasoconstrictors més potents i la major efectora del sistema renina-angiotensina (RAS). L'Ang II és produïda a través de l'enzim convertidor de l'angiotensinogen (ACE) a partir de l'angiotensina I i efectua les seves accions biològiques a través de la unió als seus dos subtipus de receptors, el receptor de l'angiotensina II de tipus I (AT<sub>1</sub>) i el receptor de l'angiotensina II de tipus II (AT<sub>2</sub>) (132). L'Ang II juga un paper central en la regulació de la pressió sanguínia i l'homeòstasi del sodi (133). Per altra banda, l'Ang II també té altres funcions que són independents de la regulació de la pressió sanguínia, com ara efectes mitogènics i tròfics sobre el creixement cel·lular (134), o bé l'estimulació de l'expressió de citocines proinflamàtores (135) i de molècules d'adhesió (136), o l'activació de factors de transcripció proinflamatoris (137). A més a més, s'ha vist que l'Ang II pot incrementar la producció de ROS (138).

El RAS està dividit en dos compartiments: El sistèmic o circulant i el local o de teixit. El RAS circulant està implicat en el manteniment de la pressió sanguínia i el balanç de sal i aigua, mentre que el RAS local juga un paper en la patofisiologia de cada òrgan individual (139-141).

En la lesió per I/R, se sap que l'administració de bloquejadors de l'acció de l'Ang II protegeix el fetge davant d'aquest tipus de lesió en fetges grassos (142). A més, en estudis de trasplantament de fetge s'ha vist que l'Ang II està implicada en la lesió per I/R inherent a aquest procediment, gràcies a l'administració d'antagonistes dels receptors de l'Ang II (143).

Per altra banda, estudis d'altres grups també han implicat el sistema RAS en el procés de la regeneració hepàtica. Per exemple, Ramalho et al. i

Yayama et al. van mostrar en estudis d'hepatectomia parcial, que els inhibidors de l'ACE incrementaven la regeneració hepàtica (144, 145).

#### 1.4.3.8 LA BRADICININA

La Bradicinina (BK) és un pèptid del sistema Cal·licreïna-cinina que forma part de la família dels Autacoides (146). És coneguda com un dels vasodilatadors més importants i com a modulador de reaccions d'inflamació (147). També se sap que la BK actua com a factor de creixement per a determinades cèl·lules (148-150), i que promou l'activació de les cèl·lules endotelials (147).

La BK pot ser degradada per l'enzim ACE i altres proteïnases. Per tant, la inhibició d'aquest enzim, a part de promoure la irrupció de la síntesi de la Ang II, té com a conseqüència l'augment de la concentració i els efectes de la BK (151). És per això que en un estudi ja citat prèviament, van observar que els efectes beneficiosos de la inhibició de l'enzim ACE no eren conseqüència de la inhibició de la síntesi de la Ang II sinó que eren deguts a l'increment de BK (142).

Sobre el paper de la BK en la lesió per I/R se sap que aquesta cinina és capaç de reduir la lesió per I/R en fetge quan aquesta és incrementada per la inhibició de l'enzim ACE (142, 152). Per altra banda, un estudi sobre la regeneració hepàtica ja va demostrar que la BK estava implicada en l'augment de la regeneració hepàtica després d'una hepatectomia (144, 145).

#### 1.4.3.9 LES METAL·LOPROTEINASES DE MATRIU

Les metal·loproteïnases de matriu (MMP) són una família d'enzims zinc-dependents de més de 25 membres. Són conegudes per la seva capacitat d'hidrolitzar les proteïnes de la matriu extracel·lular (ECM) en diferents condicions fisiològiques i patològiques, entre les que podem trobar l'embriogènesi, la reparació de ferides, la inflamació, l'artritis, l'angiogènesi i el càncer (153). Més recentment, s'ha observat que les MMP tenen altres funcions gràcies a la seva capacitat d'hidrolitzar proteïnes que no pertanyen a l'ECM. Inicialment, la matriu extracel·lular era vista únicament com a suport físic i estructural de les cèl·lules. Actualment se sap que la seva funció és molt

més complexa i se la veu com a un component dinàmic que està involucrat en l'organització i remodelació dels teixits (153).

La majoria de membres de la família de les MMP, que són generalment sintetitzades intracel·lularment com a proenzims, comparteixen una estructura altament conservada composta per tres dominis diferents: un propèptid aminoterminal, un domini catalític, i un domini de tipus hemopexina a l'extrem carboxiterminal. El domini propèptid serveix per mantenir l'enzim inactiu i està compost per una seqüència d'aproximadament 80-90 aminoàcids (153).

Les MMP poden ser activades biològicament de diferents maneres, però totes acaben en la dissociació del residu cisteïna sulfhidril del seu complex amb el residu catalític  $Zn^{2+}$ . D'aquest procés se'n diu mecanisme d'activació per "cysteine-switch", i es pot dur a terme a través de diferents vies. La via més descrita inclou l'eliminació proteolítica del propèptid per proteases, com ara la plasmina, la tripsina, les cal·licreïnes o altres. Alternativament, es coneix una altra via en la qual el grup tiol de la cisteïna del propèptid reacciona amb els ROS, particularment amb el peroxinitrit. Aquesta reacció té lloc en presència de baixes concentracions micromolars de peroxinitrit i nivells citosòlics de glutatió, però no es dona amb l'NO sol. Com a resultat, el grup cisteïnil tiol pateix una s-glutatinització que elimina l'enllaç entre la cisteïna i el zinc. Això comporta un canvi conformacional que dona accés als substrats al centre catalític, i, per tant, s'obté una MMP activa catalíticament sense la hidròlisi del propèptid. Es pensa que aquesta via té un paper clau en condicions d'estrès oxidatiu com el que s'observa en processos com la inflamació i la lesió per I/R (153).

Al fetge, la font majoritària de MMP són les cèl·lules estelades, que produeixen bàsicament MMP-2 i MMP-9, i les cèl·lules de Kupffer. Se sap que el fetge, en condicions d'inflamació, com aquelles de lesió per I/R o lesions per hipòxia-reoxigenació, les cèl·lules endotelials sinusoidals alliberen MMP-2 i MMP-9 i que els neutròfils migren cap a l'àrea danyada causant la producció i alliberació de diverses MMP (153).

Entre les funcions independents de l'ECM de les MMP hi trobem la capacitat d'hidròlisi i activació de múltiples factors. Diversos estudis han observat la capacitat de les MMP per activar factors com l'IGF (154), el TGF- $\beta$  (155) o la IL-1 (156).

En el camp de la lesió per I/R, múltiples estudis han observat la participació de les MMP en aquest tipus de lesió. Estudis amb inhibidors sintètics de les MMP, han observat una disminució de la lesió per I/R en model d'I/R normotèrmica quan aquests inhibidors eren administrats (157-159). A més, en estudis de trasplantament de fetge, s'ha observat que les MMP també participen en la lesió per I/R en aquest tipus de models (160, 161).

Finalment, la participació d'aquestes proteïnes també s'ha observat en models de regeneració hepàtica (162, 163), on es veu l'augment de l'activitat de les MMP després d'una hepatectomia. A més, en un estudi sobre la regeneració hepàtica, es va observar que les MMP i els inhibidors de teixit de les metal·loproteïnases (TIMP) regulaven l'alliberació del factor de creixement HGF de la matriu extracel·lular, regulant així la seva activitat i, per tant, el cicle cel·lular dels hepatòcits (164).

Les MMP tenen els seus propis inhibidors endògens, els anomenats inhibidors de teixit de les metal·loproteïnases (TIMP). Els TIMP són una família de 4 proteïnes diferents (TIMP-1, 2, 3 i 4). Són inhibidors endògens de l'activitat de les MMP caracteritzats per la seva alta afinitat per unir-se a elles (165). El TIMP2 inhibeix específicament la MT1-MMP (166) i té una funció dual sobre la MMP2. A concentracions baixes, el TIMP2 promou l'activació proteolítica de la MMP2 junt amb la MT1-MMP, mentre que a concentracions altes d'aquest inhibeixen l'activitat de la MMP2 (167). Recentment, s'ha vist que aquests inhibidors no només regulen l'activitat de les MMP sinó que també tenen funcions independents de les MMP, com ara la capacitat d'actuar com a factors de creixement o de factors antiapoptòtics o antiangiogènics (153). En un estudi de trasplantament de fetge, els nivells de TIMP2 es van veure significativament disminuïts en plasma després del procés quirúrgic (160). A més, en un estudi d'I/R hepàtica es va veure que els nivells de TIMP2 s'incrementaven durant la fase de recuperació després de la reperfusió que és quan té lloc la regeneració del teixit (158).

#### 1.4.3.10 LA c-JUN N-TERMINAL CINASA (JNK)

La JNK és una proteïna activada per estrès de la família de les proteïnes cinases activades per mitògens (MAPK). Aquestes proteïnes cinases Ser/Thr converteixen estímuls extracel·lulars en senyals intracel·lulars

i controlen l'expressió gènica. La via de les MAPK és activada davant de diferents estímuls com poden ser l'estrès ambiental, les citocines proinflamatories, el xoc tèrmic, els inhibidors de la síntesi proteica, etc. Dins de la superfamília de les MAPK hi trobem la subfamília de les proteïnes cinases activades per estrès (SAPK), de la qual en formen part la JNK i la p38 MAPK. L'activació de les SPAK requereix la fosforilació dels residus conservats de serina i treonina en el domini catalític (168-170). La proteïna JNK és ràpidament activada en resposta a estressos físics com la hipòxia, la radiació ultraviolada i canvis en el pH, i també en resposta a mediadors de la inflamació i antigens derivats de patògens(171). En condicions com aquestes, la JNK s'activa i fosforila el factor c-Jun/AP-1 i aquest promou l'expressió *de novo* de diferents gens implicats en la resposta immunològica (172). En situacions d'estrès agut sever, la JNK pot també induir l'apoptosis (172).

Estudis sobre el trasplantament hepàtic han parlat de l'activació de la JNK en aquest procés. Concretament, en estudis sobre el trasplantament hepàtic on es va administrar un inhibidor de la JNK, es va observar una disminució de la lesió per I/R (172, 173). Altres estudis també han correlacionat la lesió per I/R amb l'activació de la proteïna JNK (174-178).

Paral·lelament, també s'ha vist que la JNK participa en processos de regeneració hepàtica. Estudis en models de regeneració del fetge han reportat que l'activació de la JNK és crucial per que el procés de la regeneració hepàtica és porti a terme correctament (179-181). Se sap que en situacions de regeneració hepàtica, la JNK és fosforilada en dos residus, fet que incrementa la seva activitat cinasa. La JNK activada fosforila el seu substrat majoritari, la c-Jun, i n'incrementa la seva funció. La c-Jun és un gen primerenc immediat que forma part del complex AP-1 (proteïna activadora-1), que és un factor de transcripció que estimula l'expressió de gens imprescindibles per a la proliferació dels hepatòcits com el gen de la ciclina D1 (182, 183).

#### 1.4.3.11 L'ACTIVADOR DEL PLASMINOGEN DE TIPUS UROCINASA (uPA)

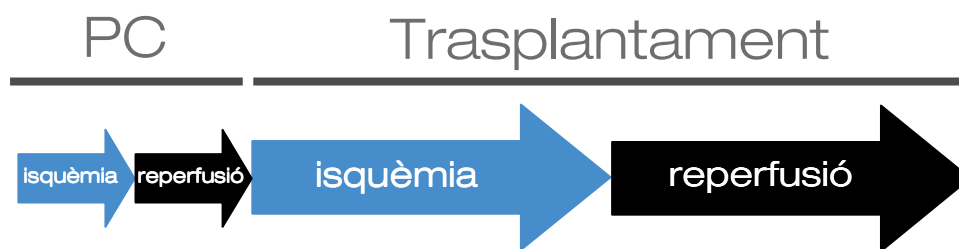
La uPA és una glicoproteïna responsable de la conversió del plasminogen a plasmina (184). La plasmina és un enzim present al torrent sanguini que degrada diferents proteïnes plasmàtiques entre les quals la fibrina. La plasmina també juga un paper important en l'activació de proteïnes



com les MMP i el TGF $\beta$  (185). Estudis previs van mostrar que la uPA és capaç d'activar l'HGF (186, 187). Per altra banda, estudis més recents van demostrar que l'activitat de la uPA s'incrementa durant els primers 5 minuts posteriors a una hepatectomia en rates (186, 188).

## 1.5 EL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC

El preconditionament isquèmic (PC) és una estratègia quirúrgica que protegeix els teixits davant la lesió per I/R. Aquest fenomen va ser descrit per primer cop en estudis de cor per Murry i col. (189) i posteriorment s'ha demostrat que és un mecanisme eficient en diferents òrgans com l'intestí, el cervell, el múscul i el fetge (190, 191). El PC consisteix en l'aplicació de períodes curts d'isquèmia i reperfusió abans de la I/R perllongada (figura 1.10).



**Figura 1.10.** Esquema de l'aplicació del PC prèvia a la I/R que té lloc en el trasplantament de fetge.

Tot i que s'han postulat diferents hipòtesis, els mecanismes protectors del PC encara no es coneixen del tot. A nivell molecular, un cop s'ha induït el PC es posen en marxa una sèrie de vies de senyalització que s'amplifiquen fins a aconseguir un efecte beneficiós.

### 1.5.1 VIES DE SENYALITZACIÓ MOLECULAR

Durant el PC té lloc la degradació d'ATP generant així adenosina en grans quantitats. Aquesta adenosina s'allibera a l'espai extracel·lular i promou l'activació dels receptors d'adenosina A<sub>2</sub> acoblats a proteïna G (191, 192). Aquests, a la vegada, promouen l'activació de la fosfolipasa C o D, que genera inositol trifosfat fet que indueix l'alliberació de calci des de les

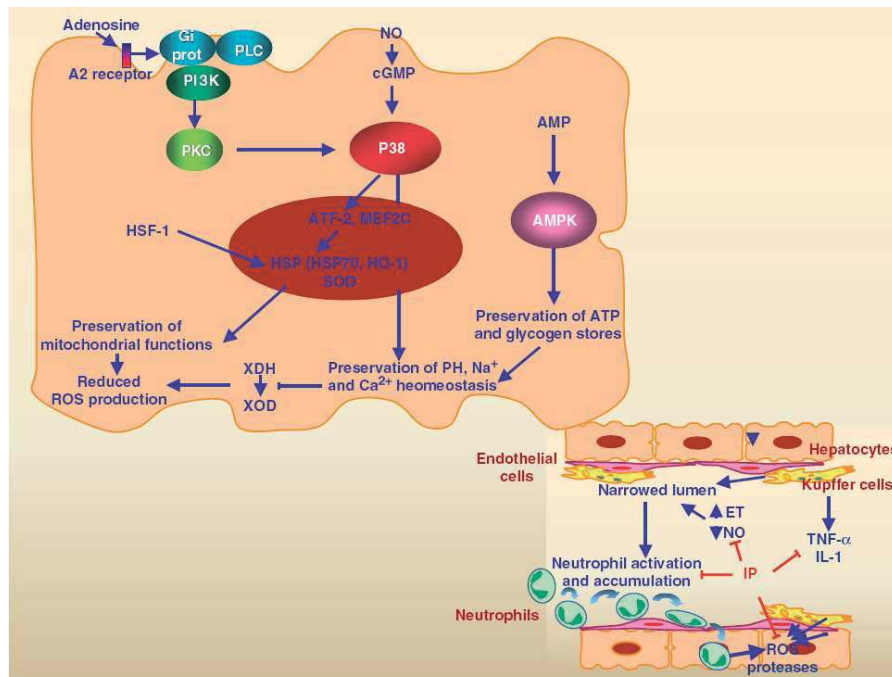
reserves intracel·lulars no mitocondrials, i diacilglicerol (DAG), que activa la PKC (193-195). Se sap que la PKC fosforila diverses molècules efectores com, per exemple, les tirosinacinasas (196) i les MAPK (197), fet que porta a l'augment de la tolerància dels hepatòcits i de les cèl·lules endotelials a la lesió per I/R i a l'entrada d'aquestes cèl·lules al cicle cel·lular, promovent la regeneració hepàtica (198).

L'activació de la PKC pot induir també l'activació de diversos factors de transcripció, com el NF- $\kappa$ B, que són els principals responsables dels efectes protectors del PC a llarg termini (199, 200). Aquests factors de transcripció modulen l'expressió de determinats gens i donen lloc a la síntesi de proteïnes, com la superòxid dismutasa (SOD) o les proteïnes de xoc tèrmic (HSP), que han estat proposades com a efectores dels efectes protectors del PC.

Les HSP juguen un paper important mantenint l'estabilitat de les proteïnes (201). Quan es produeix un augment en la síntesi de proteïnes i durant un estímul d'estrès, les HSP s'uneixen als pèptids que s'estan formant perquè no es despleguin, ni interaccionin amb altres molècules i per facilitar el seu transport a través de les membranes cel·lulars (201). S'ha descrit el paper d'aquestes proteïnes en el teixit isquèmic reparant proteïnes danyades, oferint protecció contra els ROS, suprimint citocines proinflamatòries i reparant canals iònics (202).

També s'ha suggerit que el PC pot disminuir la transcripció de gens com c-fos i c-jun, implicats en el desenvolupament de la lesió per I/R hepàtica, i que l'activació de NF- $\kappa$ B pot induir l'activació de STAT-3, que està implicat en la hepatoprotecció i la proliferació cel·lular (197, 198, 203-210).

A més de totes aquestes vies de senyalització implicades en el PC, treballs recents indiquen que el PC pot induir alliberació d'una petita quantitat de ROS (22, 209) i de TNF- $\alpha$  (211), els quals contribueixen a l'efecte protector del PC (figura 1.11).



**Figura 1.11.** Esquema representatiu dels mecanismes involucrats en els efectes protectors del PC en la I/R hepàtica. Font: Massip-Salcedo et al., Liver Int, 2006.

### 1.5.1.1 ADENOSINA I ÒXID NÍTRIC

Diversos treballs en models d'I/R normotèrmica i trasplantament hepàtic han demostrat la implicació de l'NO i l'adenosina en l'efecte protector del PC. L'NO inhibeix l'adhesió dels neutròfils a l'endoteli sinusoidal i, en inhibir la presència de molècules d'adhesió, inhibeix l'efecte vasoconstrictor de les endotelines (ET) i actua de segrestador dels ROS, com ara el superòxid (125-127, 212, 213). Així doncs, la inhibició de la síntesi de l'NO en un model d'I/R normotèrmica va anul·lar els efectes protectors del PC (191, 214-216). Contràriament, quan es van administrar donadors d'NO, va disminuir la lesió per I/R (215, 217). En trasplantament de fetge, la modulació farmacològica de l'NO en empelts hepàtics sotmesos a 16 hores d'isquèmia freda va confirmar la implicació de l'NO en la protecció induïda pel PC (122).

Durant el breu període d'isquèmia del PC es produeix una degradació d'ATP que porta a un augment dels nivells d'adenosina i genera un augment d'NO que seria responsable de l'efecte protector conferit pel PC (191). Així ho confirmen els resultats obtinguts en models d'I/R normotèrmica basats en la modulació farmacològica de l'NO i/o de l'adenosina en animals sotmesos a

I/R hepàtica, amb o sense PC previ. També s'ha demostrat el paper de l'adenosina en la protecció del PC en model d'I/R hepàtica *ex vivo* (214, 216).

Així doncs el període de temps òptim que indueix els efectes protectors del PC al fetge ve determinat per dos factors: un és la concentració d'adenosina suficient com per induir la generació d'NO a través de l'activació dels receptors d'adenosina A<sub>2</sub>, i el segon la baixa concentració de xantina que eviti els efectes perjudicials d'aquesta (218).

#### 1.5.1.2 METABOLISME ENERGÈTIC

El PC és capaç de preservar els nivells d'ATP després d'una I/R hepàtica contribuint a l'efecte protector del PC (192, 219, 220). Els mecanismes pels quals el PC exerceix aquest efecte no són del tot coneguts.

A més de la generació d'adenosina, el breu període d'I/R del PC provoca l'activació de l'enzim proteïna cinasa dependent d'AMP (AMPK). L'AMPK és un enzim que s'activa en situacions de dèficit energètic cel·lular desencadenant la fosforilació de diversos substrats amb la finalitat de mantenir els nivells cel·lulars d'ATP. D'aquesta manera es redueix l'activitat de la via glucolítica durant la isquèmia perllongada i, per tant, es redueixen els nivells d'intermediaris d'aquesta via així com el seu producte final, l'àcid làctic, que té efectes nocius. Existeixen estudis que confirmen aquest fet a través de l'administració d'inhibidors i activadors de l'AMPK en animals sotmesos a una I/R hepàtica normotèrmica (219, 220).

#### 1.5.1.3 NEUTRÒFILS I ALTERACIONS DE LA MICROCIRCULACIÓ

S'ha demostrat que part de l'efecte protector del PC està relacionat amb la modulació de l'acumulació de neutròfils i l'alteració de la microcirculació (221, 222). El mecanisme pel qual el PC modula l'acumulació de neutròfils en el teixit hepàtic no és del tot ben conegut. S'ha demostrat que el PC redueix l'adherència dels leucòcits després d'una isquèmia normotèrmica. D'altra banda, també hi ha evidències que indiquen que no hi ha diferències en l'expressió de molècules d'adhesió després d'induir el PC. Hi ha estudis que suggereixen que durant el procés d'isquèmia es danyen les cèl·lules endotelials, fet que facilita que els neutròfils tinguin lliure accés al teixit

hepàtic, sense haver d'expressar les molècules d'adhesió. Segons aquesta teoria podria ser que el PC reduís l'acumulació de neutròfils a través de la reducció del dany endotelial (196, 199, 223-226).

En models experimentals de trasplantament hepàtic, els fetges en els quals s'indueix PC mostren una milloria en el flux hepàtic després de la reperfusió. En aquest sentit, s'ha vist, en fetges sotmesos a isquèmia normotèrmica, que l'aplicació del PC millora els desordres de la microcirculació. Sembla que el PC mitjançant la generació de NO té efectes vasodilatadors i d'aquesta manera contraresta la vasoconstricció produïda durant el procés de la I/R conseqüència de l'alliberació de mediadors de la inflamació com la ET (221, 222, 227).

#### 1.5.1.4 ESTRÈS OXIDATIU I CITOCINES

És un fet ben conegut que el PC és capaç de disminuir l'estrès oxidatiu associat al procés d'I/R hepàtica. Diversos estudis han demostrat que el PC actua preservant l'estructura mitocondrial i modulant l'activació de les cèl·lules de Kupffer, disminuint així la producció de ROS en la lesió per I/R (214, 228). S'ha demostrat a nivell experimental que el PC modula el sistema de defensa contra els ROS i el sistema generador de ROS xantina/XOD (21). Els beneficis del PC no només s'han observat a nivell de prooxidants sinó que hi ha estudis que demostren que aquesta estratègia quirúrgica és capaç de preservar els nivells d'antioxidants com el glutatió (197).

A nivell de citocines, hi ha estudis que indiquen que la inhibició de les cèl·lules de Kupffer pel PC porta també a una disminució en la producció de les citocines proinflamatòries després d'una I/R hepàtica (229, 230). Existeixen estudis que demostren la influència del PC sobre les citocines proinflamatòries com el TNF- $\alpha$  i la IL-1 en processos d'I/R normotèrmica (229, 231, 232).

#### 1.5.1.5 APLICACIÓ CLÍNICA DEL PC

Des del moment en que es va descriure l'efectivitat del PC, s'han realitzat diversos treballs amb la finalitat de buscar estratègies que puguin mimetitzar els seus efectes beneficiosos. Entre aquestes estratègies s'hi troben el preconditionament tèrmic, que consisteix a induir un augment en la

temperatura corporal abans de la isquèmia hepàtica (233, 234); el preconditionament químic amb diversos agents com la doxorubicina (235) i el factor natriurètic (236). De totes maneres, l'aplicació clínica d'aquestes estratègies és molt limitada tant per la dificultat que això comportaria com per problemes de toxicitat o d'efectes secundaris.

Si bé totes les estratègies adreçades a reduir la lesió per I/R hepàtica no han pogut tenir la seva aplicació a la clínica, les investigacions sobre l'efectivitat del PC en models experimentals d'I/R hepàtica han estat la base per que aquesta estratègia quirúrgica pugui ser aplicada a la clínica per reduir la lesió per I/R associada a les reseccions hepàtiques de tumors. Encara que no es tenen dades de l'aplicació del PC en trasplantaments de fetge en humans, hi ha estudis que recolzen la seva possible aplicació en clínica en un futur.

L'ús pioner del PC en cirurgia cardíaca per Yellon i cols. va obrir la possibilitat de la utilització d'aquesta tècnica en diferents tipus de cirurgia (237). Aquest grup va demostrar que l'aplicació del PC abans de la realització d'un bypass de l'artèria coronària, reduïa la lesió del miocardi que era conseqüència del procés quirúrgic. Més tard, s'han dut a terme assajos clínics en diferents òrgans amb resultats molt esperançadors (238-243).

Al fetge, assajos clínics duts a terme per Clavien i cols. i Nuzzo i cols. han demostrat el paper protector de l'aplicació del PC en reseccions hepàtiques (244-246). En aquests estudis, Clavien i cols. van observar que l'aplicació del PC va tenir un efecte protector en 24 pacients sotmesos a una hepatectomia (244). En els pacients on es va aplicar el PC es va produir una reducció dels nivells plasmàtics d'ALT i una reducció de la mort cel·lular per apoptosi de les cèl·lules endotelials. En un altre estudi més recent, es van poder observar els mateixos resultats, però es va utilitzar una mostra de població encara més àmplia, de 100 pacients (245).

Posteriorment a aquests estudis, altres grups també han realitzat estudis sobre la aplicació del PC en reseccions hepàtiques. Chouker i cols. van observar que l'aplicació del PC en reseccions hepàtiques va incrementar l'estabilitat hemodinàmica després de la reperfusió i va disminuir els nivells de transaminases (233). Més tard, Li i cols. van demostrar els efectes beneficiosos del PC en pacients amb cirrosis sotmesos a hepatectomia (247) i per últim, Nuzzo i cols. en reseccions hepàtiques a temps més llargs d'oclusió del flux sanguini que els utilitzats en els estudis anteriors (246).

Si bé hi ha estudis sobre els beneficis del PC en I/R hepàtica normotèrmica i trasplantament de fetge, no hi ha gaire informació sobre l'eficàcia del PC en empelts de mida reduïda, per tant, aquest camp d'investigació encara és un gran desconegut.





## 2. OBJECTIUS



Tenint en compte el llarg temps que un pacient ha d'estar a la llista d'espera per a un trasplantament de fetge i el fet que molts d'aquests pacients no arriben a rebre mai un fetge, és urgent augmentar el número d'òrgans disponibles per a trasplantar. En el cas del fetge i gràcies a la seva capacitat regenerativa, podem optar per utilitzar un donant viu en comptes d'un donant difunt per a un pacient en llista d'espera. Aquesta opció té com a desavantatge la necessitat que tindrà l'òrgan de regenerar-se un cop implantat al donant i, si s'escau, també en el receptor. Sabent que la isquèmia i la reperfusió, a la que es veu sotmès qualsevol òrgan al ser trasplantat disminueix la capacitat regenerativa del fetge, a part de danyar-lo severament, és de màxima importància trobar estratègies tant quirúrgiques com farmacològiques que afavoreixin la regeneració hepàtica i disminueixin la lesió que aquests òrgans pateixen.

Com ja s'ha comentat abans, el PC és una estratègia quirúrgica que disminueix la lesió per I/R i augmenta la regeneració del fetge després d'un trasplantament. La investigació dels mecanismes del PC quan aquest és aplicat en models de trasplantament de fetge amb empelt de mida reduïda, poden portar al descobriment de noves estratègies farmacològiques que, combinades amb el PC, augmentin la protecció d'aquest sobre els empelts de mida reduïda.

Per això els objectius de la present tesi són els següents:

- Objectiu 1: Té com a objectiu avaluar si el sistema Renina-angiotensina participa en els efectes beneficiosos del PC en un model experimental de trasplantament de fetge amb empelt de mida reduïda on hi intervenen tant la lesió per I/R com la regeneració hepàtica.
- Objectiu 2: Té com a objectiu avaluar si les MMP estan implicades en els efectes protectors del PC en un model experimental de trasplantament de fetge amb empelt de mida reduïda i si estan regulades per la JNK.

A més, l'estudi de la lesió per I/R hepàtica deguda a un trasplantament de fetge amb empelt de mida reduïda ens permet conèixer més bé els intricats mecanismes de la inflamació i l'estrès oxidatiu, al mateix temps que ens permet desvetllar els secrets darrera el misteriós esdeveniment que és la regeneració hepàtica. En sí, conèixer els detalls de la complexitat de la natura ja és un objectiu a assolir.



### 3. MATERIAL I MÈTODES



### **3.1 ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ**

Els animals d'experimentació utilitzats van ser rates mascle de la soca Sprague-Dawley de 200-250gr de pes (Charles River, Wilmington, EEUU) mantingudes a l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona com a mínim una setmana abans de la seva intervenció. Les condicions ambientals es van mantenir constants; la temperatura va ser de 21-22°C, la humitat relativa del 70% i els cicles de llum i fosc de 12 hores. Tots els estudis es van realitzar d'acord amb les normes reguladores de la Unió Europea per a models d'experimentació animal (Directiva 86/609/ECC).

### **3.2 TRASPLANTAMENT HEPÀTIC AMB EMPELT DE MIDA REDUÏDA**

#### **3.2.1 ANESTÈSIA**

Els animals van ser anestesiats per via respiratòria (Fluorane Abott Laboratories, Madrid). L'anestèsia es va induir amb isofluorà al 4% i amb flux d'oxigen de 2.5 a 3 L/min. El manteniment de l'anestèsia en els animals donants es va dur a terme amb la inhalació d'isofluorà a l'1.5-2% i un flux d'oxigen de 2-2.5 L/min, fins al inici de la reperfusió de l'òrgan amb la solució d'UW i la posterior parada cardíaca. En el receptor, l'anestèsia va ser interrompuda a la fase anhepàtica. Un cop finalitzada aquesta fase, la inhalació d'isofluorà va ser del 0.5-1% fins a finalitzar la intervenció. En el receptor es va mantenir el flux d'oxigen constant durant tota la intervenció.

#### **3.2.2 CIRURGIA**

##### **Cirurgia del donant**

El model experimental utilitzat en aquests estudis es basa en la tècnica del doble "cuff" descrita per Kamada i cols. l'any 1979 (248), en la que no es duu a terme la reconstrucció de l'arteria hepàtica.

Un cop anestesiada la rata, es va afaitar l'abdomen de l'animal i es va col·locar en decúbit supí sobre la taula d'operacions (Figura 3.1). Es va netejar

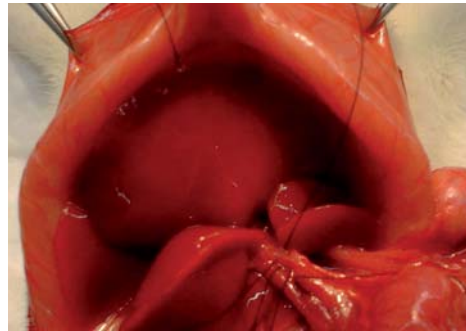
la zona a operar amb povidona iodada i es va realitzar una laparotomia transversal un centímetre per sota dels apèndixs xifoides.

Es va seccionar el lligament rodó, es va alliberar la vena cava inferior suprahepàtica i posteriorment es va lligar la vena diafragmàtica dreta.

Tot seguit, es van disseccionar l'artèria aorta, la vena cava inferior i el pedicle renal dret i es van lligar l'artèria i la vena renal dreta, les venes suprarenals i les lumbars dretes. A l'hílum hepàtic es va separar la vena porta de l'artèria hepàtica i del conducte biliar comú. El conducte biliar es va canular amb un catèter de polietilè d'aproximadament 2 cm de llarg, 0.96 mm de diàmetre extern i de 0.50 mm de diàmetre intern (Cole-Palmer Instrument Company, Vernon Hills, Illinois, EEUU), i es va fixar amb una doble lligadura de seda 6/0 (Suturas Aragón, Barcelona) (Figura 3.2).

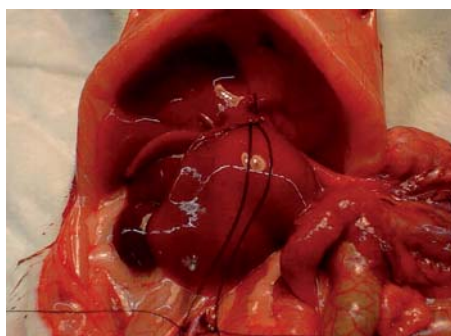


**Figura 3.1.** Camp quirúrgic.

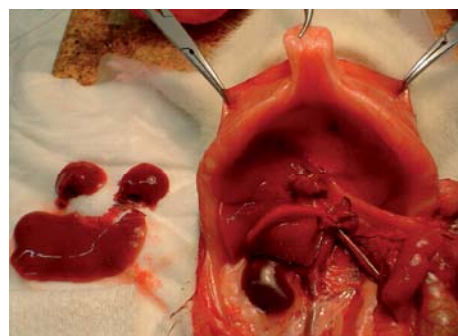


**Figura 3.2.** Hílum hepàtic del donant.

La reducció del fetge es va dur a terme mitjançant l'extirpació del lòbul lateral esquerre i dels lòbuls caudats amb la realització d'una doble lligadura amb una seda 5.0 en el pedicle dels lòbuls esmentats (Figura 3.3) i la subsegüent extirpació (Figura 3.4) (92, 249, 250).



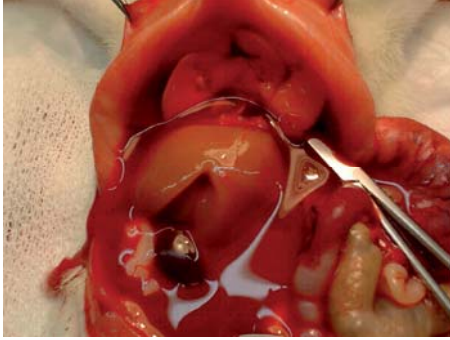
**Figura 3.3.** Lligadura del lòbul lateral esquerre.



**Figura 3.4.** Lòbuls extirpats.



Prèviament a l'extirpació dels lòbuls, es van administrar 300 unitats d'heparina. Un cop preparat l'òrgan per a la seva extracció, es va canular l'aorta amb un catèter de 20 G (Medicuth, Venflon, Helsinborg, Suècia) amb la prèvia obertura del diafragma. Seguidament, es va ocloure l'aorta toràcica i es va seccionar la vena cava inferior suprahepàtica per sobre del diafragma.



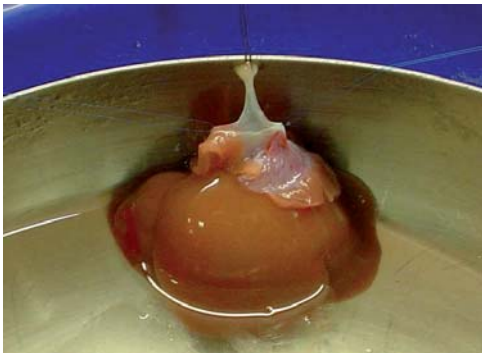
És en aquest moment que comença la perfusió de l'empelt amb 50 ml de Solució de Winsconsin (UW) (ViaSpan®, BristolMyers, Madrid) (Figura 3.5). A continuació es va realitzar l'extracció del fetge donant i es va col·locar en un bany amb solució UW a 4°C.

**Figura 3.5.** Perfusió de l'empelt.

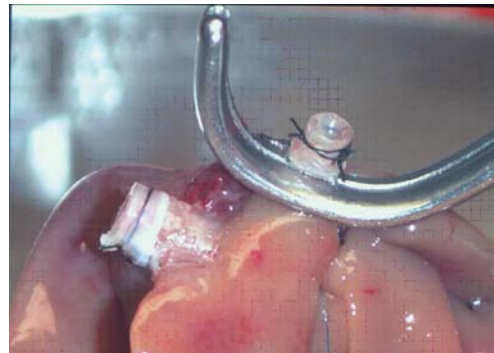
### Cirurgia del banc

La cirurgia del banc té com a finalitat preparar l'empelt per a implantar-lo en l'animal receptor. Es va tallar el diafragma que envolta la vena cava inferior suprahepàtica, deixant aproximadament uns 3 mil·límetres de teixit al voltant de la vena per poder facilitar la posterior anastomosis (Figura 3.6). Es van col·locar dos punts de referència de Prolene 7/0 en ambdós costats de la vena cava per a facilitar l'orientació de l'anastomosis.

Les anastomosis de les venes porta i cava inferior infrahepàtica es van realitzar mitjançant la tècnica del doble "cuff". Es van col·locar, a les dues venes, unes estructures tubulars de polietilè anomenades "cuffs".



**Figura 3.6:** Vena cava suprahepàtica del donant.



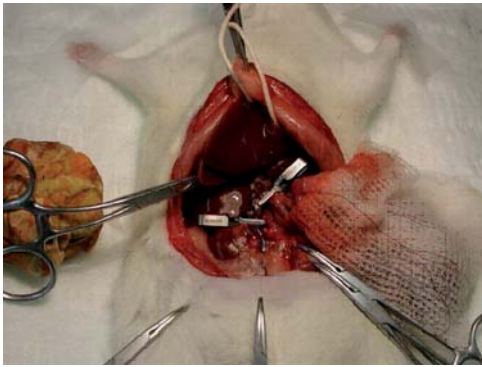
**Figura 3.7:** Cuffs de la vena porta i de la vena cava inferior infrahepàtica.

El “cuff” utilitzat a la vena cava tenia un diàmetre extern de 3.30 mm i intern de 2.60 mm. El “cuff” de la vena porta tenia uns 2.09 i 1.58 mm de diàmetre extern i intern, respectivament (Figura 3.8). La col·locació d'aquestes estructures va permetre, en el moment de l'implant, la unió d'aquestes venes sense la necessitat de realitzar una sutura contínua i disminuir, per tant, la duració de la intervenció (factor important per a la supervivència del receptor) (Figura 3.7).

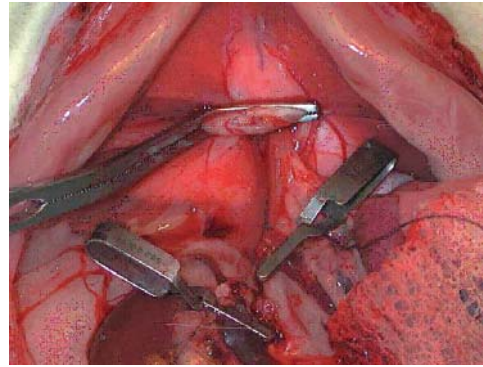
### **Cirurgia del banc**

Es van fer la laparotomia i la dissecció del fetge de manera similar a la realitzada en el donant. A l'hílum hepàtic es va seccionar el conducte biliar a nivell de la confluència d'ambdós conductes hepàtics. Per a facilitar la introducció dels “cuffs” i orientar adientment les venes porta i cava inferior infrahepàtica, es van col·locar dos punts de sutura de Prolene 7/0 als seus extrems.

Amb la utilització de clamps microvasculars es van ocloure les venes porta just a la seva confluència amb la vena esplènica i la vena cava inferior infrahepàtica just per sobre de la vena renal dreta.



**Figura 3.8:** Inici de la fase anhepàtica.



**Figura 3.9:** Hepatectomia del receptor.

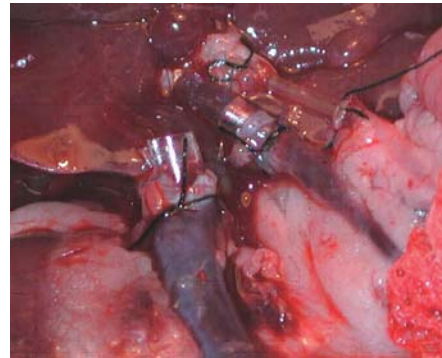
A continuació, amb una pinça de Satinsky, es va ocloure la vena cava inferior suprahepàtica (Figura 3.8). És en aquest instant que comença la fase anhepàtica. L'hepatectomia del receptor es va completar quan es van seccionar les venes porta i cava inferior supra i infrahepàtiques, totes en la zona més proximal al fetge (Figura 3.9).

L'implant del fetge es va començar amb la sutura contínua, amb Prolene 7/0, entre la vena cava inferior suprahepàtica del donant i la del receptor (Figura 3.10). Seguidament, es va realitzar l'anastomosis de la vena

porta, mitjançant la introducció del “cuff” col·locat a la vena porta de l'empelt, a dins de la vena porta del receptor. Una vegada introduït el “cuff”, es va assegurar amb una sutura de seda 6/0. A continuació es va procedir a la reperfusió de l'empelt a través de l'alliberació de les pinces que oclïen les venes, primer la vena porta i immediatament després la vena cava inferior infrahepàtica.



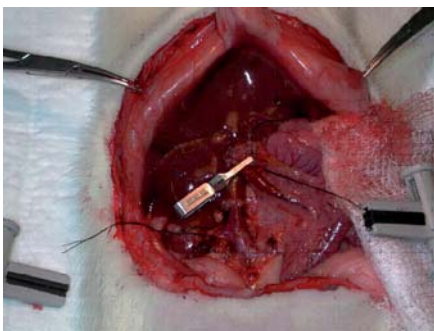
**Figura 3.10:** Anastomosis de la vena cava inferior suprahepàtica.



**Figura 3.11:** Anastomosis de la vena cava infrahepàtica, porta i conducte biliar.

L'anastomosis de la vena cava inferior infrahepàtica es va realitzar de manera similar a la vena porta; es va alliberar la pinça de la vena i així es va restablir el flux sanguini a aquest nivell.

Un cop restablert el flux sanguini, es va procedir a la rehidratació de l'empelt amb la injecció d'un bolus intravenós a través de la vena dorsal del penis que contenia 0.5 ml de bicarbonat sòdic 1 M, i 2.5 ml de solució isotònica de Ringer Lactat. D'aquesta manera es va restablir el volum perdut i es contrarestavava l'acidosi produïda durant la cirurgia.



**Figura 3.12.** Inducció del preconditionament isquèmic.

Finalment, es va realitzar l'anastomosis del conducte biliar amb la unió dels conductes del donant i del receptor, mitjançant el tub de polietilè prèviament col·locat al fetge del donant (Figura 3.11). Per acabar la intervenció es va tancar el pla muscular i després la pell amb una sutura contínua amb seda 2/0.

### **Precondicionament isquèmic (PC)**

El PC es va realitzar al fetge donant a través de l'oclusió de l'artèria hepàtica i la vena porta amb un clamp microvascular durant 10 minuts (Figura 3.12). Posteriorment, es va retirar el clamp i es va deixar que la reperfusió del fetge fos de 10 minuts més, després dels quals es va procedir a la perfusió de l'empelt amb la solució UW (251).

## **3.3 RECOLLIDA I PROCESSAMENT DE LES MOSTRES**

Amb l'animal anestesiàt es van recollir mostres del teixit hepàtic a les 24 hores després del trasplantament. Una part de les mostres es van congelar amb neu carbònica i es va mantenir a  $-80^{\circ}\text{C}$ , i l'altra part es va fixar amb paraformaldehid al 4% tamponat per a processar-lo posteriorment i fer-ne l'anàlisi histològic i immunohistològic.

Es van recollir també mostres de sang de l'animal trasplantat a les 24 hores després del trasplantament, amb tubs contenint heparina que es van mantenir a  $4^{\circ}\text{C}$  fins que van ser centrifugats a 3000g durant 10 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$  per a obtenir el plasma que posteriorment es va emmagatzemar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **3.4 GRUPS EXPERIMENTALS**

### **3.4.1 ESTUDI 1**

**Protocol 1:** Efecte dels bloquejadors de l'Ang II sobre la lesió hepàtica per I/R i la regeneració hepàtica en el ROLT 24 hores després del trasplantament. Grups:

1. Sham (n=6): Es va practicar una laparotomia transversal als animals i seguidament es van lligar la vena suprarenal dreta i l'artèria hepàtica.
2. Trasplantament de fetge amb empelt de mida reduïda (ROLT) (n=12, 6 trasplantaments): Es va practicar el ROLT als animals segons la tècnica de Kamada ja descrita prèviament en aquesta tesi (248). Es va practicar, també, una hepatectomia parcial a l'empelt del 40% extirpant els lòbuls caudats i el lòbul lateral esquerre (92, 249, 250). La solució de preservació utilitzada per a la perfusió i preservació de l'empelt va ser la solució UW. El temps de isquèmia freda va ser d'una hora aproximadament (92),

simulant la realitat en la clínica. La durada de la fase anhepàtica va ser de 17-20 minuts(252).

3. Precondicionament isquèmic + ROLT (PC) (n=12, 6 trasplantaments): Es va practicar el ROLT als animals, però al fetge donant se li va practicar el PC. El PC va consistir en interrompre el flux sanguini mitjançant un clamp vascular, a nivell de la vena porta i l'artèria hepàtica, durant 10 minuts. Posteriorment, es va retirar el clamp deixant que al fetge el flux es restablís durant 10 minuts més. Al final d'aquest període es va procedir a la perfusió del fetge amb la solució d'UW (253).
4. ROLT + antagonista del receptor AT1 de l'Ang II (AT1R) (ROLT + antagonista AT1R) (n=12, 6 trasplantaments): Es van realitzar les mateixes condicions que al grup 2 però es va administrar oralment als animals un antagonista de l'AT1R (Losartan) 24 hores i una hora abans del procés quirúrgic, tant al donant com al receptor. La dosi administrada va ser de 5mg/kg (254).
5. ROLT + antagonista del receptor AT2 de l'Ang II (AT2R) (ROLT + antagonista AT2R) (n=12, 6 trasplantaments): Es van realitzar les mateixes condicions que al grup 2 però es va administrar intravenosament un antagonista de l'AT2R (PD123319) als animals donants 25 minuts abans de la isquèmia freda i als animals receptors just després de la finalització del trasplantament. La dosi administrada va ser de 30mg/kg (142).
6. ROLT + inhibidor de l'enzim convertidor de l'angiotensina (ACE) (ROLT + inhibidor ACE) (n=12, 6 trasplantaments): Es van realitzar les mateixes condicions que al grup 2 però es va administrar oralment un inhibidor de l'ACE (Captopril) 24 hores i una hora abans del procés quirúrgic, tant al donant com al receptor. La dosi administrada va ser de 100mg/kg (254).

24 hores després del trasplantament es van recollir les mostres de plasma i teixit. L'avaluació de la lesió hepàtica es va realitzar mitjançant la determinació de transaminases en plasma. Es van realitzar també les determinacions de nivells d'Ang II i BK i els nivells d'expressió de l'angiotensinogen i l'enzim ACE en el teixit hepàtic. Per avaluar la regeneració hepàtica es van determinar l'índex de marcatge de l'antigen nuclear de proliferació cel·lular (PCNA) i els nivells de HGF i TGF- $\beta$  en el teixit hepàtic. Finalment, també es va fer l'estudi histològic del fetge.

**Protocol 2:** Paper de la BK en els efectes dels bloquejadors de l'Ang II en la lesió hepàtica per I/R i la regeneració hepàtica en el ROLT 24 hores després del trasplantament. Grups:

7. ROLT + inhibidor de l'ACE + antagonista del receptor de la BK (ROLT + inhibidor ACE + antagonista BK) (n=12, 6 trasplantaments): Es van realitzar les mateixes condicions que al grup 2 però es va administrar oralment un inhibidor de l'enzim ACE (Captopril) 24 hores i una hora abans del procés quirúrgic, tant al donant com al receptor. També es va administrar un antagonista del receptor 2 de la BK (HOE140), subcutàniament, una hora abans del procés quirúrgic i durant tot el procés de la cirurgia (amb l'ús d'un bolus subcutani), només al receptor. La dosi administrada va ser de 100mg/kg per l'inhibidor de l'ACE i 0.5mg/kg per l'antagonista del receptor de la BK (142, 254).
8. ROLT + antagonista del receptor de la BK (ROLT + antagonista BK) (n=12, 6 trasplantaments): Es van realitzar les mateixes condicions que al grup 2, però es va administrar un antagonista del receptor 2 de la BK (HOE140), subcutàniament, una hora abans del procés quirúrgic i durant tot el procés de la cirurgia (amb l'ús d'un bolus subcutani), només al receptor. La dosi administrada va ser de 0.5mg/kg (142).
9. ROLT + antagonista del receptor AT1 de l'Ang II + antagonista del receptor AT2 de l'AngII + antagonista del receptor de la bradicinina (ROLT + antagonista AT1R + antagonista AT2R + antagonista BK) (n=12, 6 trasplantaments): Es van realitzar les mateixes condicions que al grup 4 però es va administrar intravenosament un antagonista de l'AT2R (PD123319) als animals donants 25 minuts abans de la isquèmia freda i als animals receptors just després de la finalització del trasplantament. També es va administrar un antagonista del receptor 2 de la BK (HOE140), subcutàniament, una hora abans del procés quirúrgic i durant tot el procés de la cirurgia (amb l'ús d'un bolus subcutani), només al receptor. La dosi administrada va ser de 30mg/kg per antagonista del receptor AT1R i de 0.5mg/kg antagonista del receptor de la BK (142).

24 hores després del trasplantament es van recollir les mostres de plasma i teixit. Les determinacions bioquímiques i l'anàlisi histològica del fetge van ser les mateixes que al protocol 1.

### 3.4.2 ESTUDI 2

**Protocol 1:** Paper de les MMP en l'efecte protector del PC en la lesió hepàtica per I/R i la regeneració hepàtica en el ROLT. Grups:

1. Sham (n=6): Es va practicar una laparotomia transversal als animals i seguidament es van lligar la vena suprarenal dreta i l'artèria hepàtica.
2. Trasplantament de fetge amb empelt de mida reduïda (ROLT) (n=12, 6 trasplantaments): Es va practicar el ROLT als animals segons la tècnica de Kamada ja descrita prèviament en aquesta tesi (248). Es va practicar, també, una hepatectomia parcial a l'empelt del 40% extirpant els lòbuls caudals i el lòbul lateral esquerre (92, 249, 250). La solució de preservació utilitzada per a la perfusió i preservació de l'empelt va ser la solució UW. El temps d'isquèmia freda va ser d'una hora aproximadament (92), simulant la realitat en la clínica. La durada de la fase anhepàtica va ser de 17-20 minuts (252).
3. Precondicionament isquèmic + ROLT (PC) (n=12, 6 trasplantaments): Es va practicar el ROLT als animals però al fetge donant se li va practicar el PC. El PC va consistir a interrompre el flux sanguini mitjançant un clamp vascular, a nivell de la vena porta i l'artèria hepàtica, durant 10 minuts. Posteriorment, es va retirar el clamp deixant que al fetge el flux es restablís durant 10 minuts més. Al final d'aquest període es va procedir a la perfusió del fetge amb la solució d'UW (253).
4. PC + inhibidor de l'activitat de la MMP2 (PC + inhibidor MMP2) (n=12, 6 trasplantaments): Es van realitzar les mateixes condicions que al grup 3 però es va administrar intravenosament un inhibidor de la MMP2 (Calbiochem, Alemanya) al donant 25 minuts abans de la isquèmia freda i al receptor just després del trasplantament. La dosi administrada va ser de 5µg/kg (255).

24 hores després del trasplantament es van recollir les mostres de plasma i teixit. L'avaluació de la lesió hepàtica es va realitzar mitjançant la determinació de transaminases en plasma. Es van realitzar també les determinacions de nivells d'activitat i expressió de les MMP2 i MMP9, i els nivells de la JNK fosforil·lada en el teixit hepàtic. Per avaluar la regeneració hepàtica es van determinar l'índex de marcatge de l'antigen nuclear de

proliferació cel·lular (PCNA), i els nivells de HGF i TGF- $\beta$  en el teixit hepàtic. Finalment, també es va fer l'estudi histològic del fetge.

**Protocol 2:** Paper de la JNK en la inducció de l'expressió i l'activitat de la MMP2 en els mecanismes del PC en el ROLT. Grups:

5. PC + inhibidor de la JNK (PC + inhibidor JNK) (n=12, 6 trasplantaments): Es van realitzar les mateixes condicions que al grup 3, però es va administrar subcutàniament un inhibidor de la JNK (SP600125, Sigma-Aldrich, Madrid) al donant una hora abans de la cirurgia i al receptor just després del trasplantament. La dosi administrada va ser de 6mg/kg (256).
6. ROLT + activador de la JNK (ROLT + activador JNK) (n=12, 6 trasplantaments): Es van realitzar les mateixes condicions que al grup 2, però es va administrar intraperitonealment un activador de la JNK (Anisomicina, Sigma-Aldrich, Madrid) al donant 24 hores abans de la cirurgia i al receptor just després del trasplantament. La dosi administrada va ser de 0.1mg/kg (256).
7. ROLT + NO (ROLT + NO) (n=12, 6 trasplantaments): Es van realitzar les mateixes condicions que al grup 2, però es va administrar intravenosament un donador d'NO (Spermine NONOate, Cayman Chemical, Ann Arbor, EEUU) 5 minuts abans de la perfusió del fetge amb la solució UW. La dosi administrada va ser de 10mg/kg (251).
8. PC + inhibidor de la síntesi d'NO (NAME) (PC + NAME) (n=12, 6 trasplantaments): Es van realitzar les mateixes condicions que al grup 3, però es va administrar intravenosament un metil ester metil de N $\omega$ -nitro-L-arginina (NAME, Sigma-Aldrich, Madrid) al donant just després de l'inici de la isquèmia freda i al receptor just després del trasplantament. La dosi administrada va ser de 10mM al donant i 20mg/kg al receptor (251).

24 hores després del trasplantament es van recollir les mostres de plasma i teixit. Les determinacions bioquímiques i l'anàlisi histològica del fetge van ser les mateixes que al protocol 1.



### 3.5 DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES

#### 3.5.1 NIVELLS DE TRANSAMINASES

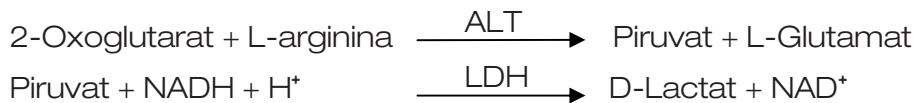
L'aspartat aminotransferasa (AST) i l'alanina aminotransferasa (ALT) són els enzims coneguts com a transaminases. Són enzims citoplasmàtics molt abundants al fetge que participen en el metabolisme dels aminoàcids, realitzant la conversió d'un aminoàcid en un àcid carboxílic.

Quan es produeix una lesió hepàtica, aquestes transaminases són alliberades al torrent sanguini de manera que la determinació dels seus nivells és un reflex de la lesió hepàtica.

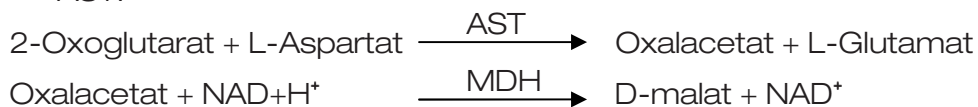
L'activitat d'aquestes proteïnes es va determinar amb l'ús d'un kit comercial de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanya). L'assaig enzimàtic mesura la desaparició de NADH mitjançant espectrofotometria a una longitud d'ona de 365nm.

Les reaccions que es duen a terme són les següents:

- ALT:



- AST:

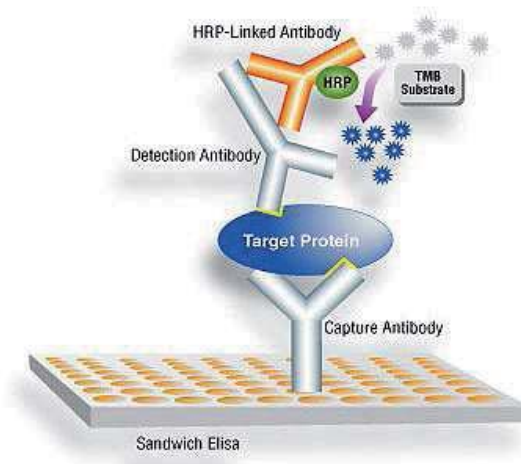


#### 3.5.2 NIVELLS DE ANGIOTENSINA II

Es van bullir les mostres de teixit hepàtic en un tampó que contenia àcid acètic 0.1M i un comprimit d'inhibidor de proteases (Complete Mini, Roche, Suïssa) durant 10 minuts. Posteriorment, es van homogeneïtzar les mostres amb un homogeneïtzador Polytron. Després de refredar les mostres en gel, es van centrifugar a 2000g durant 20 minuts a 4°C. Es va extreure el sobrenedant i es va evaporar amb l'ajuda d'un concentrador de buit Savant. Finalment, es van congelar les mostres a -40°C fins a la seva utilització.

Per a determinar els nivells d'Ang II es va utilitzar un kit comercial del tipus ELISA (de l'anglès *enzyme-linked immunoassay*) de la casa SPI bio, Montigny Le Bretonneux, França. Aquests kits es basen en la unió

d'anticossos contra l'Ang II al fons dels pous d'una placa de 96 pous on s'uneix la proteïna Ang II continguda al teixit hepàtic. La molècula de Ang II s'uneix a l'anticòs a través d'enllaços covalents. Posteriorment, es renta la placa i s'incuba amb un anticòs contra l'Ang II marcat amb la acetilcolinesterasa. Finalment, s'afegeix un substrat de l'enzim mencionat que també és un cromogen i que, per tant, permet utilitzar l'espectrofotòmetre per detectar el nivell d'absorbància (a una longitud d'ona de 450nm) de cada pou i que és proporcional al nivell de Ang II de cadascun (Figura 3.13).



**Figura 3.13.** Esquema del sistema ELISA.  
Font: Cell Signaling Tech.

### 3.5.3 NIVELLS DE BRADICININA

Per a determinar els nivells de BK en el teixit hepàtic, es van homogeneïtzar les mostres de fetge en un tampó que contenia 90% d'etanol i 0.1% de trifluoroacètic, en un homogeneïtzador Polytron. Seguidament, es van sonicar les mostres durant 30 segons i es van centrifugar a 1500g durant 30 minuts a 4°C. Finalment, es van passar les mostres pel concentrador de buit Savant, es van redissoldre en un tampó del kit comercial i es van centrifugar a 10000g durant 15 minuts a 4°C.

A continuació, es van determinar els nivells de BK amb la utilització d'un kit de la casa comercial Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, Estats Units. El kit també es basa en la tècnica immunològica d'ELISA amb la utilització d'un anticòs conjugat amb l'estreptavidina amb peroxidasa que catalitza la solució

substrat per a poder llegir-ne l'absorbància a 450nm en un espectrofotòmetre.

#### **3.5.4 NIVELLS DE C-JUN N-TERMINAL CINASA FOSFORIL·LADA (JNK)**

Es van homogeneïtzar les mostres de teixit hepàtic amb un tampó que contenia Tris base 10mM, clorur de sodi 100mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, fluorur de sodi 1mM, ortofosfat de sodi 20mM, ortovanadat de sodi 2mM, tritó X-100 a l'1%, glicerol al 10%, SDS al 0.1%, àcid deoxicòlic al 0.5%, PMSF 1mM i un comprimit d'inhibidors de proteases (Complete Mini, Roche, Suïssa) a pH 7.4. Es van incubar les mostres homogeneïtzades en gel durant 20-30 minuts i es van centrifugar a 4000g durant 15 minuts a 4°C. Finalment, es van congelar els sobrenedants a -80°C.

Per determinar els nivells de JNK fosforilada en el teixit hepàtic es va utilitzar un kit comercial ELISA de la casa Invitrogen, Camarillo, Estats Units. Aquest kit utilitza per a la detecció de la proteïna d'interès un anticòs conjugat amb la peroxidasa que catalitza la solució substrat per a poder llegir-ne l'absorbància a 450 nm en un espectrofotòmetre.

#### **3.5.5 NIVELLS D'HGF**

Es van homogeneïtzar les mostres de teixit hepàtic amb un tampó que contenia Tris hidròxid clorhídric 20mM, clorur de sodi 2M, Tween 80 al 0.1%, EDTA 1mM, i PMSF 1mM a un pH de 7.5 amb l'ajuda d'un homogeneïtzador Polytron. Seguidament, es van centrifugar els homogeneïtzats a 20000g durant 60 minuts a 4°C. Es va recollir el sobrenedant i es va congelar a -40°C.

Per determinar els nivells d'HGF en el teixit es va utilitzar un kit comercial de la casa B-Bridge International Inc., Tokio, Japó. Per a la detecció de la proteïna d'interès, aquest kit utilitza un anticòs marcat amb la peroxidasa i una solució substrat de la qual se'n pot llegir l'absorbància a 450 nm en un espectrofotòmetre.

### 3.5.6 NIVELLS DE TGF- $\beta$

Per a la determinació del TGF- $\beta$ , les mostres de fetge van ser homogeneïtzades amb un tampó fosfat que contenia PMSF 2mM i pepstatina A 1mg/ml a 4°C amb l'ajuda d'un homogeneïtzador Polytron. Seguidament, les mostres van ser centrifugades a 10000g durant 10 minuts a 4°C i es va recollir el sobrenedant del qual es va determinar la concentració de TGF- $\beta$  actiu. Per a mesurar la concentració de TGF- $\beta$  total (actiu + latent), les mostres es van acidificar amb hidròxid clorhídric 1M i després es van neutralitzar amb hidròxid de sodi 1M.

Per a la determinació tant dels nivells totals com actius de TGF- $\beta$  es va utilitzar un kit de la casa comercial Biosource, Camarillo, Estats Units. Aquest kit utilitza per a la detecció de la proteïna d'interès un anticòs conjugat amb la peroxidasa que catalitza la solució substrat per a poder llegir-ne l'absorbància a 450 nm en un espectrofotòmetre.

### 3.5.7 CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES

La concentració de proteïnes en els extrems de fetge de les mostres utilitzades per als estudis es va determinar amb el mètode colorimètric de Bradford amb la utilització del reactiu comercial BioRad (Richmon, EEUU). Aquest assaig es basa en el canvi d'absorbància, en medi àcid, que presenta el blau de coomassie en unir-se a les proteïnes. La concentració de proteïnes és directament proporcional a l'absorbància observada a una longitud d'ona de 595nm. Es va emprar una recta patró d'albúmina de la qual el punt més concentrat era 4.75mg/ml, i a partir d'aquesta concentració es van fer 6 dilucions seriades a la meitat.

## 3.6 TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 3.6.1 ZIMOGRÀFIA

La zimografia és una tècnica electroforètica que permet observar l'activitat d'alguns enzims. Es realitza amb poliàcrilamida i en condicions suaus per evitar la pèrdua de l'activitat de l'enzim estudiat. Per a la detecció de les MMP2 i MMP9, es va realitzar una zimografia de gelatina.

Primer de tot, es van extreure les MMP de les mostres de teixit hepàtic de la manera que descriurem a continuació. Es van homogeneïtzar les mostres amb un homogeneïtzador manual amb un tampó de lisis sense inhibidors de proteases. El tampó contenia Tris HCl 50mM, clorur de sodi 150mM, clorur de calci 5mM, BRIJ-35 al 0.05%, azida sòdica al 0.02% i tritó X-100 a l'1% a un pH de 7.6. A continuació, es van centrifugar les mostres a 12000g durant 10 minuts a 4°C i es van guardar els sobrenedants. Posteriorment, es van extreure les MMP d'aquests amb l'ajuda d'una columna d'afinitat gelatina-sefarosa (Gelatin-Sepharose 4B, Amersham Bioscience, Uppsala, Suècia) seguint les instruccions del producte. Un cop obtinguts els eluents passats per la gelatina-sefarosa, que és on hi havia les MMP concentrades, es van congelar a -80°C fins a la realització de la zimografia.

Per a fer la zimografia de gelatina es van barrejar els extrems de MMP amb un tampó de càrrega 1:1 (Laemmli, BioRad, EEUU). Seguidament, es van carregar les mostres en un gel de poliàcrilamida al 8% amb 1mg/ml de gelatina porcina (Sigma-Aldrich, Madrid), durant 2 hores i mitja a 120V i 4°C. Com a marcadors de pes, es van utilitzar un estàndards de zimografia (Chemicon, Billerica, EEUU). Un cop acabada l'electroforesis, es van fer 3 rentats de 15 minuts amb un tampó de tritó X-100 al 2.5%. Després es va fer un rentat amb aigua miliQ i es van posar a incubar els gels 24 hores a 37°C en un tampó que contenia Tris HCl 50mM, clorur de calci 10mM i azida sòdica 0.02% a pH 7.5. Un cop passades les 24 hores, temps durant el qual les MMP encara estan actives i digereixen la gelatina del gel, es van tenyir els gels amb blau de coomassie al 4% en metanol al 40% i àcid acètic al 10%. I finalment, es van destenyir els gels fins que les bandes van ser visibles amb una solució de destinció que contenia àcid acètic al 10% i metanol al 10% (158, 257). Finalment, es van obtenir les imatges per a la densitometria amb un densitòmetre (Agfa, Barcelona), que posteriorment van ser analitzades amb el programa Quantity One.

### 3.6.2 WESTERN BLOT

Es van determinar la MMP2, el TIMP2 i la uPA en homogeneïtzats de teixit hepàtic realitzats de les següent manera:

Es van homogeneïtzar 250mg de teixit hepàtic en 700µL de tampó d'homogeneïtzació que contenia Tris-HCl 50mM (pH=7.6), NaCl 150mM, CaCl<sub>2</sub> 5mM, BRIJ-35 0.05%, NaN<sub>3</sub> 0.02%, Tritó X-100 1% i una pastilla de inhibidors de proteases per cada 50 mL de tampó (Complete, Roche). Es van homogeneïtzar els teixits amb l'ajut d'un homogeneïtzador manual de la casa Sartorius i després es van centrifugar a 12.000g durant 10 minuts a 4°C. De cada homogeneïtzat se'n va reservar el sobrenedant i se'n va determinar la concentració de proteïnes amb un reactiu comercial de BioRad (Richmon, EEUU).

Les mostres es van barrejar amb tampó de càrrega (relació 1:1), que constava de β-mercaptoetanol i tampó Laemmli (BioRad, EEUU) en proporció 1:20. Es van carregar 100µg de proteïna tant per a la MMP2 com per a la uPA i el TIMP2. Es va fer córrer un gel al 10% de SDS-poliacrilamida per separar les proteïnes i es van transferir a una membrana de PVDF. Els gels es van tenyir amb blau de coomassie per estar segurs que s'havien transferit bé totes les proteïnes.

Es van incubar les membranes una hora a temperatura ambient amb un tampó de blocatge (5% de llet en pols no greixosa en TBS amb el 0.1% de Tween-20). La incubació amb l'anticòs primari es va fer durant tota la nit a 4°C. Les dilucions van ser les següents per a cada anticòs: dilució 1/200 per la MMP2, dilució 1/500 per la uPA i dilució 1/500 per al TIMP2 en un tampó TBS amb el 0.1% de Tween-20 i amb el 5% de llet en pols no grassa. Posteriorment, es van rentar les membranes amb tampó TBS amb el 0.1% de Tween-20 en 3 rentats de 10 minuts i es van incubar amb l'anticòs secundari conjugat amb la peroxidasa anti-mouse a una dilució 1/10.000 en TBS amb el 0.1% de Tween-20 i amb el 5% de llet en pols no grassa, durant una hora a temperatura ambient. Finalment, es van rentar les membranes dues vegades amb TBS amb el 0.1% de Tween-20 durant 10 minuts i una vegada amb TBS durant 10 minuts més.

Per a la visualització del senyal quimiluminiscent es va emprar el sistema SuperSignal® West Femto Maximum Sensivity (Thermo Scientific, Rockford, EEUU). Es van exposar les membranes incubades durant 4 minuts al substrat a pel·lícules fotogràfiques. Les pel·lícules obtingudes van ser escanejades i analitzades amb el software QuantityOne (BioRad, CA, EEUU). La quantificació de les diferents proteïnes va ser estandarditzada amb la quantificació de la β-actina obtinguda gràcies a la incubació de les mateixes

membranes amb l'anticòs primari anti- $\beta$ -actina (dilució 1/1000 en tampó TBS amb el 0.1% de Tween-20 i amb el 5% de llet en pols no grassa, durant tota la nit a 4°C. Finalment, es van incubar les membranes amb l'anticòs secundari anti-mouse (dilució 1/5000 en TBS amb el 0.1% de Tween-20 i amb el 5% de llet en pols no grassa) durant una hora a temperatura ambient. Finalment es va obtenir el senyal quimiluminiscent de la mateixa manera que hem descrit anteriorment, però utilitzant el reactiu Immun-Star HRP de BioRad (CA, EEUU). L'anàlisi de les dades es va fer de la mateixa manera que hem descrit prèviament.

Els anticossos primaris utilitzats contra la MMP2 van ser comprats a la casa Chemicon (Millipore, Billerica, EEUU), els anti-uPA de la casa Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, EEUU), els anti-TIMP2 de la casa Abcam (Cambridge, Regne Unit) i els anti- $\beta$ -actina de la casa Sigma Chemical (St. Louis, EEUU).

### 3.6.3 PCR A TEMPS REAL

Per a analitzar l'expressió de l'angiotensinogen, l'enzim ACE i les MMP2 i 9, es van realitzar PCR a temps real (RT-PCR).

Primer es va aïllar l'RNA total de les mostres de fetge amb la utilització d'un kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen, Barcelona). Bàsicament, es va homogeneïtzar el teixit hepàtic, es va centrifugar l'homogenat i es va passar per una columna de purificació d'RNA. Un cop purificat l'RNA total de les mostres, es va quantificar amb l'ajuda d'un espectrofotòmetre NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, EEUU). A continuació, es va obtenir el cDNA a través de la retrotranscripció amb l'ajuda d'un kit comercial (Rady-to-go You-Prime First-strand Beds (Amersham, Uppsala, Suècia).

Finalment, es va amplificar el cDNA dels gens angiotensinogen, ACE, MMP2 i MMP9 mitjançant la RT-PCR amb els "sets" de "primers" Assays-on-Demand TaqMan Rn00593114\_m1 per l'angiotensinogen, Rn00561094\_m1 per l'ACE, Rn02532334\_s1 per la MMP2, Rn00579162\_m1 per la MMP9 i Rn00667869\_m1 per la  $\beta$ -actina (Applied Biosystems, Foster City, EEUU) (Figura 3.14). La quantificació de l'expressió gènica dels gens d'interès es va relativitzar amb la de la  $\beta$ -actina i es va calcular amb el sistema del  $\Delta\Delta C_{T(258)}$ .

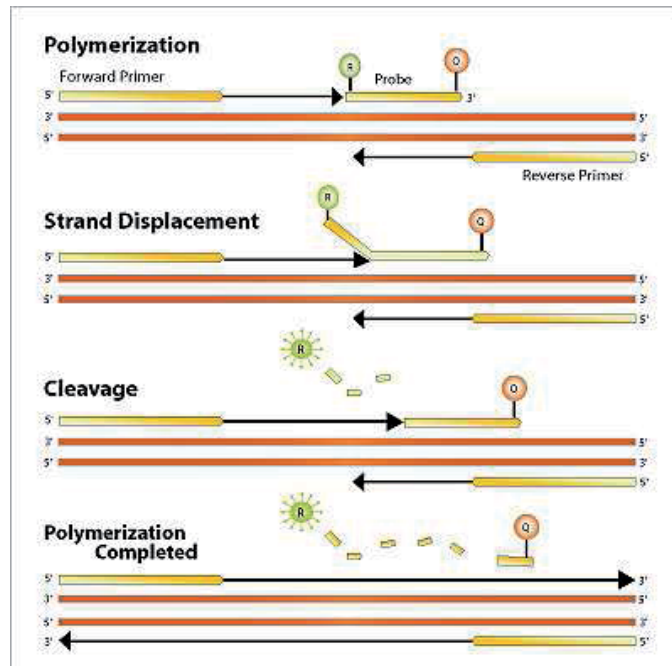


Figura 3.14. Esquema de la RT-PCR TaqMan.  
Font: Applied Biosystems.

### 3.7 TÈCNiques HISTOLÒGIQUES

#### 3.7.1 IMMUNOHISTOQUÍMICA DE PCNA

L'antigen nuclear de proliferació cel·lular (PCNA) és una proteïna multifuncional de 32 kDa que s'expressa en grans quantitats al final de la fase  $G_1$  i al principi de la fase S del cicle cel·lular. Aquesta proteïna és essencial per a la progressió del cicle ja que forma part de la maquinària de replicació del DNA, funcionant com a proteïna accessòria a la DNA polimerasa  $\delta$  i de la polimerasa  $\epsilon$ . La determinació d'aquesta proteïna ens dona una idea de la proporció de cèl·lules que s'estan dividint.

Les mostres de teixit hepàtic es van fixar en paraformaldehid tamponat al 4% i passades les 24 hores en van incloure en parafina. Es van realitzar talls histològics de 3  $\mu\text{m}$  d'aquests blocs en un ultramicròtom. Els talls es van desparafinar amb xilol i es van hidratar amb solucions d'etanol de concentracions decreixents.



La immunohistoquímica es va realitzar amb l'ajuda d'un kit comercial (DAKO Envision+System, preoxidase (DAB), Dako, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant. En primer lloc, es va bloquejar la peroxidasa interna de la mostra i es va incubar amb l'anticòs primari anti-PCNA (clone PC10, dilució 1:20, Dako, Alemanya). Després, es va incubar amb l'anticòs secundari i es van tractar les mostres amb DAB i el substrat cromogen que dona un precipitat marró a les cèl·lules que estan en divisió. Finalment, es tenyeixen els talls amb hematoxilina per donar una tinció de contrast i es van muntar els portaobjectes.

L'índex de marcatge de PCNA es va determinar mitjançant el comptatge de nuclis tenyits en 30 camps de gran augment. Les dades van ser expressades en forma de percentatge de cèl·lules tenyides respecte el nombre total d'hepatòcits (259, 260).

### **3.7.2 ESTUDI HISTOLÒGIC AMB HEMATOXILINA EOSINA**

Les mostres de fetge es van processar segons el procediment estàndard pel seu estudi mitjançant microscòpia òptica. Immediatament després de l'extracció, les mostres es van fixar en paraformaldehid tamponat al 4% com a mínim durant 24 hores. Després de la inclusió en parafina, es van tallar les mostres amb un ultramicròtom en seccions de 4-5µm. Finalment es va realitzar la tinció d'hematoxilina eosina.

Per estudiar la lesió hepàtica, les seccions es van avaluar mitjançant un comptatge utilitzant la següent escala: grau 0, lesió mínima o sense evidència; lesió 1, lesió greu que consisteix en vacuolització citoplasmàtica i picnòs nuclear focal; grau 2, lesió de moderada a severa amb picnòs nuclear extensa, hipereosinofília citoplasmàtica; grau 3, necrosi severa amb desintegració dels cordons d'hepatòcits, hemorràgies i infiltració de neutròfils. Per determinar el grau de necrosi es van valorar 40 camps de gran augment per cada secció, de manera aleatòria (261, 262).



## 4.RESULTATS



#### 4.1 ESTUDI 1

### EFFECT OF ANGIOTENSIN II AND BRADYKININ INHIBITION IN RAT REDUCED-SIZE LIVER TRANSPLANTATION

Padrissa-Altés S, Franco-Gou R, Boillot O, Serafin A, Rimola A, Arroyo V, Rodés J, Peralta C & Roselló-Catafau J.

Liver Transplantation, 2009; 15:313-320.

Aquest estudi va examinar si els bloquejadors de l'acció de l'Ang II (antagonista de l'AT1R, antagonista de l'AT2R i el inhibidor de l'ACE) podien reduir la lesió hepàtica per I/R i millorar la regeneració hepàtica en el ROLT, i si els efectes protectors del PC en el ROLT podien ser explicats a través de canvis en l'Ang II. Es va demostrar que els empelts hepàtics reduïts generen Ang II després d'un ROLT i que això està associat amb un increment dels nivells d'mRNA de l'angiotensinogen i l'ACE. A més, la inhibició de l'Ang II no contribueix a la protecció induïda per PC en el ROLT. Tots els bloquejadors de l'acció de l'Ang II van reduir la lesió per I/R però cap va incrementar la regeneració hepàtica. L'antagonista del receptor de la BK va incrementar la regeneració hepàtica però no va reduir la lesió per I/R en els ROLT. Finalment, la combinació dels bloquejadors de l'acció de l'Ang II i l'antagonista del receptor de la BK va reduir la lesió per I/R i va incrementar la regeneració hepàtica després d'un ROLT. En conclusió, els bloquejadors de l'acció de l'Ang II o l'antagonista del receptor de la BK no poden, per ells sols, millorar el pronòstic del ROLT, ja que encara que els bloquejadors de l'acció de l'Ang II redueixen la lesió per I/R i que l'antagonista del receptor de la BK va incrementar la regeneració hepàtica, cap dels dos pot induir els dos canvis alhora. Conseqüentment, seria d'interès clínic aplicar ambdós tractaments simultàniament.

**\*Article sencer a l'annex 2**



## 4.2 ESTUDI 2

### MATRIX METALLOPROTEINASE 2 IN REDUCED-SIZE LIVER TRANSPLANTATION: BEYOND THE MATRIX

Padrissa-Altés S, Zaouali MA, Franco-Gou R, Bartrons R, Boillot O,  
Rimola A, Arroyo V, Rodés J, Peralta C & Roselló-Catafau J

American Journal of Transplantation, 2010; In Press.

En aquest estudi vam estudiar la implicació de l'MMP2 i l'MMP9 en els efectes protectors del PC en el ROLT. També, vam examinar el paper de la JNK i si aquesta regulava l'MMP2 en les condicions esmentades. Els animals van ser sotmesos a un ROLT amb o sense previ PC i modulació farmacològica, i es van recollir mostres del fetge per ser analitzades. Vam observar que l'MMP2, però no l'MMP9, està implicada en els efectes protectors del PC en el ROLT. L'MMP2 va reduir la lesió per I/R i va incrementar la regeneració hepàtica. A més, la inhibició de l'MMP2 en el PC va reduir la supervivència dels animals després d'un ROLT. La inhibició de la JNK en el grup PC, va reduir la lesió per I/R i va millorar la regeneració hepàtica. També, la JNK va regular a la alça l'MMP2 en el PC. A més, també vam demostrar que el TIMP2 també està regulat a l'alça pel PC i que la modulació de la JNK també va alterar els seus nivells en el PC i el ROLT. Els nostres resultats obren noves possibilitats per a desenvolupar nous tractaments terapèutics per a reduir la lesió per I/R i incrementar la regeneració hepàtica després d'un ROLT, factors que són les limitacions més grans en el transplantament de fetge de donant viu.

**\*Article sencer a l'annex 3**





## 5.DISCUSSIÓ



## 5.1 EFECTE DE LA INHIBICIÓ DE L'ANGIOTENSINA II I LA BRADICININA EN EL ROLT EN RATA

El primer estudi presentat en aquest memòria mostra el paper de l'Ang II i la BK en el dany hepàtic per I/R i la regeneració hepàtica en el model de trasplantament hepàtic amb empelt de mida reduïda en rata (Figura 5.1).

Segons estudis anteriors, l'Ang II està involucrada en la patogènesis del dany de l'òrgan diana, incloent el vessament cerebral, les malalties del ronyó i l'infart de miocardi, tant en situacions clíniques com experimentals (263-266). Estudis del fetge van mostrar els efectes beneficiosos de l'activació dels receptors de l'Ang II, l'AT1R i l'AT2R, sobre el dany hepàtic per I/R i en el trasplantament de fetge complet (254, 267, 268). En aquest estudi es va mostrar que el fetge és capaç de generar Ang II després d'un ROLT i que això està associat a un increment d'angiotensinogen i d'mRNA de l'ACE. A més, els nostres resultats van indicar que l'ús de bloquejadors de l'acció de l'Ang II, com per exemple els antagonistes de l'AT1R i l'AT2R i els inhibidors de l'ACE, podrien ser prometedors per a la reducció del dany hepàtic associat al ROLT. El present estudi demostra que els bloquejadors de l'acció de l'Ang II redueixen el dany hepàtic. Tot i això, es requereixen més estudis per determinar els mecanismes pels quals aquests bloquejadors milloren el dany hepàtic després d'un ROLT. Un d'aquests mecanismes podria ser l'alteració de la microcirculació hepàtica. Sabem per la literatura que la inhibició de l'activitat de l'AT1R millora la microcirculació hepàtica en un model d'I/R normotèrmica en gossos (267). Per altra banda, també coneixem els efectes beneficiosos dels bloquejadors de l'Ang II sobre la hipertensió en humans (269).

En la investigació del PC, estudis previs van mostrar resultats contradictoris en relació a l'efecte d'aquest sobre l'Ang II (142, 270-272). Alguns estudis del cor indiquen que el PC inhibeix les accions biològiques de l'Ang II (270), mentre que altres estudis mostren que l'Ang II participa en els efectes protectors del PC (271, 272). Un estudi recent del nostre grup va mostrar un efecte diferencial del PC sobre l'Ang II en un model experimental d'isquèmia normotèrmica, dependent del tipus de fetge; el PC va reduir la producció d'Ang II en fetges grassos, però no en fetges no grassos (142). A més, estudis anteriors del nostre grup, ja havien descrit els efectes beneficiosos del PC sobre la I/R hepàtica i la regeneració en un ROLT (251).

Els resultats del present estudi van mostrar que el PC no modifica l'expressió dels enzims o precursors capaços de generar Ang II. Per altra banda, la manca de canvis en l'expressió d'aquests no significa que hi puguin haver modificacions post-transcripcionals que acabin modificant els nivells de proteïna. De totes maneres, en els nostres estudis hem pogut veure que els efectes beneficiosos del PC no són deguts a canvis en la generació d'Ang II.

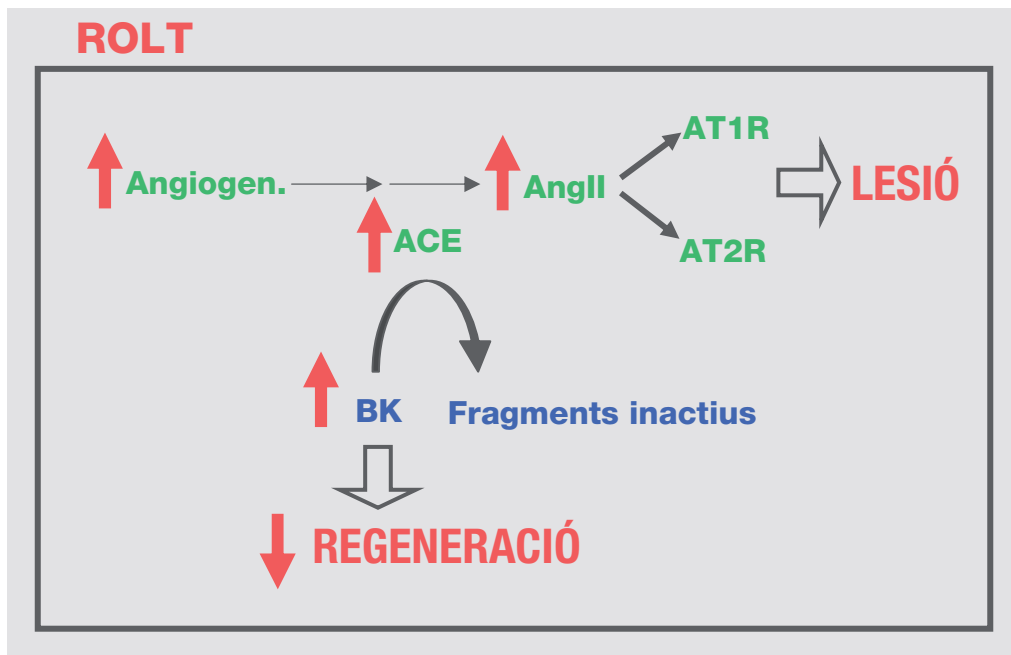


Figura 5.1. Els sistema RAS en el ROLT.

Els efectes beneficiosos dels inhibidors de l'ACE sobre la regeneració hepàtica després d'una hepatectomia són ben coneguts gràcies a estudis previs (144, 145). Altres estudis van mostrar que els inhibidors de l'ACE incrementen els nivells d'mRNA de l'HGF renal i la concentració d'HGF cardíac en models experimentals de rates hipertenses (273). A més, altres investigacions també van mostrar que l'Ang II regula a la baixa la producció d'HGF en cèl·lules mesangials en cultiu (274). L'HGF i el TGFβ són els marcadors més comuns de regeneració del fetge usats en models de regeneració hepàtica en rates (275). L'HGF és el més potent dels mitògens del fetge (89). Per altra banda, el TGFβ inhibeix la síntesi d'ADN hepatocel·lular tant en cultiu (276, 277) com *in vivo*(95). S'ha suggerit que el TGFβ pot ser el principal contra regulador de la proliferació hepatocitària durant la regeneració (278). Els nostres resultats van mostrar que ni els

inhibidors de l'ACE ni cap dels bloquejadors de l'Ang II són capaços d'induir la regeneració hepàtica després d'un ROLT: Els inhibidors de l'ACE no van modificar ni els nivells d'hepatòcits positius per PCNA ni els nivells de cap factor de creixement (HGF i TGF $\beta$ ) comparats amb els del grup ROLT sense cap tractament.

Els inhibidors de l'ACE no només inhibeixen la generació d'Ang II, sinó que també promouen l'augment de la concentració de BK, ja que l'ACE també pot degradar la BK (152). En aquest estudi també vam demostrar que la BK no juga cap paper en el dany hepàtic per I/R associat a un ROLT ja que l'antagonista del receptor de la BK administrat a un grup ROLT no va modificar els nivells de dany hepàtic. Contràriament, l'antagonista del receptor de la BK sí que va modificar els nivells de regeneració hepàtica quan es va administrar a un grup ROLT. L'antagonista del receptor de la BK va millorar la regeneració hepàtica després d'un ROLT tal i com es va poder observar en l'increment dels nivells d'hepatòcits positius per PCNA, l'increment en els nivells d'HGF i la reducció en els de TGF $\beta$ . Per altra banda, tots els bloquejadors de l'Ang II van disminuir el dany hepàtic després d'un ROLT, però cap no va incrementar la regeneració hepàtica. Els paràmetres histològics i bioquímics de dany hepàtic dels grups ROLT + inhibidor del ACE, ROLT + antagonista AT1R, i ROLT + antagonista AT2R van resultar en nivells més baixos que els del grup ROLT, però cap no va mostrar diferències amb el grup ROLT en els paràmetres de regeneració hepàtica. Observant aquestes dades hom s'adona que la inhibició conjunta de l'acció de l'Ang II i de la BK ajudaria a reduir el dany hepàtic per I/R i a millorar la regeneració hepàtica després d'un ROLT. Efectivament, els resultats obtinguts d'un grup ROLT al qual se li van administrar els bloquejadors de l'Ang II i l'antagonista del receptor de la BK van mostrar una millora tant en el dany hepàtic com en la regeneració hepàtica. Clínicament, els bloquejadors de l'Ang II o els antagonistes dels receptors de l'Ang II per ells sols no poden millorar suficientment el pronòstic del ROLT ja que els primers milloren el dany hepàtic i els segons milloren la regeneració, però cap dels dos pot millorar els dos paràmetres alhora. Per tant, el que seria d'interès clínic, seria l'administració conjunta d'ambdós. Els inhibidors de l'ACE són àmpliament usats en la pràctica clínica, però s'han descrit hepatotoxicitats i malalties colestatiques del fetge degut a la inhibició de l'ACE (279, 280). Tenint en compte aquesta observació i el fet que els antagonistes del receptor de l'Ang

El van ser igualment efectius en la millora del dany hepàtic després d'un ROLT, nosaltres proposem que la millor estratègia per a ser aplicada en un ROLT a fi de reduir el dany hepàtic i millorar la regeneració és la combinació dels antagonistes del receptor de l'Ang II i els antagonistes del receptor de la BK.

## 5.2 LA METAL·LOPROTEINASA DE MATRIU 2 EN EL TRASPLANTAMENT HEPÀTIC DE MIDA REDUÏDA

El segon estudi presentat en aquesta memòria mostra el paper de l'MMP2 en els mecanismes del PC en el ROLT, i la seva regulació a través de la JNK i el TIMP2.

És ben sabut que les MMP estan involucrades en el procés de la I/R hepàtica. De fet, diversos estudis experimentals d'I/R hepàtica en rata van demostrar que les MMP estan regulades a l'alça després d'una I/R (157-159, 281). En particular, Shirahane *et al.* van demostrar que la inhibició de les MMP redueix el dany hepàtic per I/R (159). Per altra banda, les MMP també participen en el procés de la regeneració hepàtica a través de la remodelació de l'ECM (163). Per exemple, Kim *et al.* van mostrar que les MMP eren activades després d'una hepatectomia en rata (163). De totes maneres, no hi ha dades sobre el paper de les MMP en situacions que impliquin tant la I/R com la regeneració hepàtica, tal i com és el cas del ROLT. D'aquesta manera, tampoc no hi ha informació sobre el paper de les MMP en els efectes benèfics del PC en el ROLT. En aquest estudi, vam mostrar per primer cop que els efectes protectors del PC en el ROLT són deguts, en part, a un increment dels nivells d'MMP2. En les nostres condicions, el PC va comportar un augment de l'activitat i de l'expressió d'mRNA de l'MMP2. De fet, el que vam poder observar va ser que els nivells d'mRNA de l'MMP2 en el grup ROLT eren molt més baixos que en el grup Sham. Però quan aplicaven el PC abans del ROLT, els nivells d'mRNA de l'MMP2 tornaven a augmentar fins a nivells similars als del grup Sham. Per tant, podem dir que en el nostre model, el ROLT va reprimir l'expressió de l'MMP2, però el PC va revertir aquesta repressió i va restaurar l'expressió de l'mRNA de l'MMP2 fins a nivells del grup Sham. D'aquesta manera, la proteïna MMP2 pot ser sintetitzada a un ritme normal de nou i exercir la seva funció, vital per a la regeneració normal del fetge. Aquest mateix efecte va ser observat en els grups modulats (ROLT + activador JNK i PC + inhibidor JNK). Estudis previs

van mostrar que l'MMP2 s'expressa de forma latent en fetges control (158, 282). Tenint en compte aquesta observació i el fet que el ROLT provoca que els nivells d'mRNA de l'MMP2 disminueixin fins a nivells inferiors als del grup Sham, no és sorprenent que el fetge pateixi un dany tan sever quan és sotmès a un ROLT. A més, la inhibició de l'MMP2 en fetges preconditionats va comportar una reducció dels efectes protectors del PC fins al punt que la supervivència d'aquests animals es va reduir dràsticament. Numèricament, la inhibició de l'MMP2 en animals sotmesos a un PC abans del ROLT va reduir la supervivència d'aquests en un 65%. Aquests animals (PC+ inhibidor MMP2) van mostrar una reducció significativa de la regeneració hepàtica i un increment significatiu del dany hepàtic.

Contràriament al que vam veure amb l'MMP2, no vam observar canvis significatius en cap dels grups experimentals excepte per al grup Sham en els nivells de l'MMP9. Els nostres resultats mostren que el ROLT és capaç d'augmentar els nivells d'mRNA i de proteïna de l'MMP9, però el PC no va tenir cap efecte sobre aquesta. Com que els objectius d'aquest estudi eren la investigació dels mecanismes del PC, no vam aprofundir en l'estudi d'aquest augment de l'MMP9 en el ROLT. De totes maneres, aquest augment de l'MMP9 podria ser l'objecte d'investigacions futures. Estudis previs van mostrar que l'MMP9 té un paper actiu en el trasplantament hepàtic(160), però en el nostre model sembla no estar implicada en els mecanismes del PC. De fet, l'augment de l'expressió de l'MMP9 en els fetges sotmesos a un ROLT ja ens indica que l'MMP9 està participant d'aquest procés i que per tant deu participar del dany hepàtic que es manifesta en el ROLT. Per tant, en aquest aspecte, els nostres resultats si que estarien en consonància amb la resta d'estudis que diuen que l'MMP9 és responsable del dany hepàtic (157-159). Però, els mecanismes protectors del PC no semblen activar o modificar l'expressió d'aquesta proteïna. Segons els nostres resultats, l'MMP que participa més activament en el procés de la regeneració del fetge en el nostre model és l'MMP2, ja que és justament l'MMP que s'indueix quan augmenta la regeneració a causa de l'aplicació del PC. De totes maneres, tampoc podem descartar el fet que si el PC fos capaç d'induir l'MMP9, que aquesta també fos capaç d'augmentar la regeneració. Però com que el PC no és capaç d'induir-la, l'MMP9 no té cap efecte sobre aquesta.

La funció clàssica i més ben coneguda de les MMP és la degradació de l'ECM (153). En els darrers anys s'han anat descobrint noves funcions d'aquestes proteïnes. Per exemple, estudis recents van indicar que les MMP són capaces de processar directament el TGF $\beta$  (153, 283) o bé d'alliberar l'HGF de l'ECM (284). Sabent això, podem dir que a través d'aquestes funcions les MMP poden regular la regeneració hepàtica a través de la modulació dels inhibidors i promotors d'aquesta. Nosaltres creiem que l'MMP2 és un dels efectors finals del PC i que actua modulant la regeneració hepàtica. En altres paraules, pensem que l'MMP2 està implicada en la desestructuració de l'ECM, pas previ essencial de la regeneració del fetge. Per altra banda, l'MMP2 podria estar interactuant, i per tant modulant, factors de creixement com el TGF $\beta$ , factor conegut com un dels principals contra reguladors de la regeneració hepàtica (285). En resum, nosaltres pensem que l'MMP2 és capaç de protegir el fetge després d'un ROLT gràcies a la seva acció sobre la regeneració hepàtica, i que aquest fet té un efecte indirecte sobre la lesió hepàtica. Sabem que en situacions on el fetge té una mida massa petita, com és el cas de la Síndrome del Small-For-Size (286), o quan el fetge és incapaç de regenerar-se adientment, com en el cas del nostre estudi, el fetge no aconsegueix tenir una mida adient per acomplir les seves funcions. En aquests casos, els nivells de transaminases es veuen incrementats, reflectint una lesió hepàtica severa (287-289), com en el cas del nostre estudi. De totes maneres, tampoc no es pot descartar la possibilitat que l'MMP2 pugui modular directament una via de senyalització que pugui disminuir directament la lesió hepàtica.

Estudis anteriors van mostrar que les MMP eren responsables del dany per I/R en el fetge (158, 160). Aquesta discrepància amb els nostres resultats podria ser deguda bàsicament a la diferència en els models experimentals. Els models utilitzats en els estudis esmentats no presenten regeneració hepàtica, com en el nostre cas. Com ja hem comentat abans, creiem que en el nostre model l'MMP2 participa dels efectes protectors del PC a través de la modulació de la regeneració hepàtica i, per tant, en models on aquesta és absent, l'MMP2 pot tenir un paper totalment diferent.

El paper de la JNK en la I/R i la regeneració hepàtica ha estat objecte de controvèrsia durant anys. Existeixen estudis que demostren que la JNK participa en la lesió de l'empelt hepàtic després d'un trasplantament de fetge (172-174). Alternativament, Lee *et al.* van mostrar que la inhibició de la JNK en



un model experimental d'I/R hepàtica incrementa la lesió hepàtica(290). En el nostre estudi, el PC va incrementar els nivells de JNK, fet que va estar associat amb una disminució del dany hepàtic en el grup ROLT+ activador JNK respecte del grup ROLT. Contràriament, vam observar que el dany hepàtic estava incrementat en el grup PC+ inhibidor JNK respecte el grup PC. Aquests resultats impliquen la JNK en els efectes protectors del PC en el ROLT. A més, els nostres resultats també van mostrar que la modulació de la JNK afecta l'activitat i els nivells de proteïna de l'MMP2. Aquest efecte és consistent amb resultats publicats per altres autors que indiquen que la JNK regula l'MMP2 (291, 292). Llavors, podem concloure que, en el nostre model, el PC induïx l'activació de la JNK, i que això es correlaciona amb un increment de l'MMP2.

Per altra banda, se sap que el TIMP2 juga un paper primordial en la regulació de l'MMP2 (293, 294). Quan el TIMP2 es troba present a altes concentracions, aquest actua d'inhibidor de l'MMP2 (167). Però, contràriament, quan el TIMP2 es presenta en baixes concentracions, aquest forma part del complex activador de l'MMP2 junt a l'MT1-MMP (153). Els nostres resultats mostren que en el ROLT, el TIMP2 promou l'activació de l'MMP2 degut al patró paral·lel que presenten aquestes dues proteïnes. A més, la JNK també juga un paper en la regulació a la alça del TIMP2, fet que es pot observar en els resultats obtinguts de la modulació de la JNK.

Adicionalment, també vam investigar el paper de l'uPA en el nostre model de ROLT. Els nostres experiments van mostrar que l'uPA no està implicada ni en els efectes protectors del PC ni en la lesió per I/R en el ROLT a 24 hores de reperfusió. Tot i això, no podem pas descartar la possibilitat que aquesta proteïna pugui ser regulada a l'alça a temps més primerencs i que després sigui regulada a la baixa cap a nivells basals abans de les 24 hores de reperfusió, temps al qual vam recollir les mostres, o al revés. Això estaria en consonància amb estudis previs que van mostrar un increment de l'activitat de l'uPA als 1-5 minuts després d'una hepatectomia en rates (186, 188).

Totes aquestes dades semblen indicar que en el nostre model de ROLT, el PC activa la síntesis de la JNK i conseqüentment la de l'MMP2 i el TIMP2 (Figura 5.2). Aquest podria ser un dels mecanismes pels quals el PC redueix la lesió hepàtica i incrementa la regeneració després d'un ROLT. Conseqüentment, tractaments adreçats a induir els nivells de JNK o d'MMP2

podrien millorar el pronòstic clínic del ROLT, reduint el percentatge de fallades primàries del fetge després d'un trasplantament.

En conclusió, en aquest estudi vam demostrar que l'MMP2 té un paper primordial en els efectes protectors del PC en el ROLT, ja que la inhibició d'aquesta proteïna redueix dramàticament la supervivència dels animals sotmesos a un ROLT. A més, també vam demostrar que l'MMP2 està regulada a l'alça per la JNK. Amb aquest estudi vam poder identificar una de les vies induïdes pel PC que comporten una reducció del dany hepàtic i un increment de la regeneració després d'un ROLT. Els resultats del present estudi obren noves possibilitats d'investigació de tractaments per a reduir la lesió per I/R i millorar la regeneració hepàtica després d'un ROLT, les majors limitacions en el trasplantament hepàtic de donant viu.

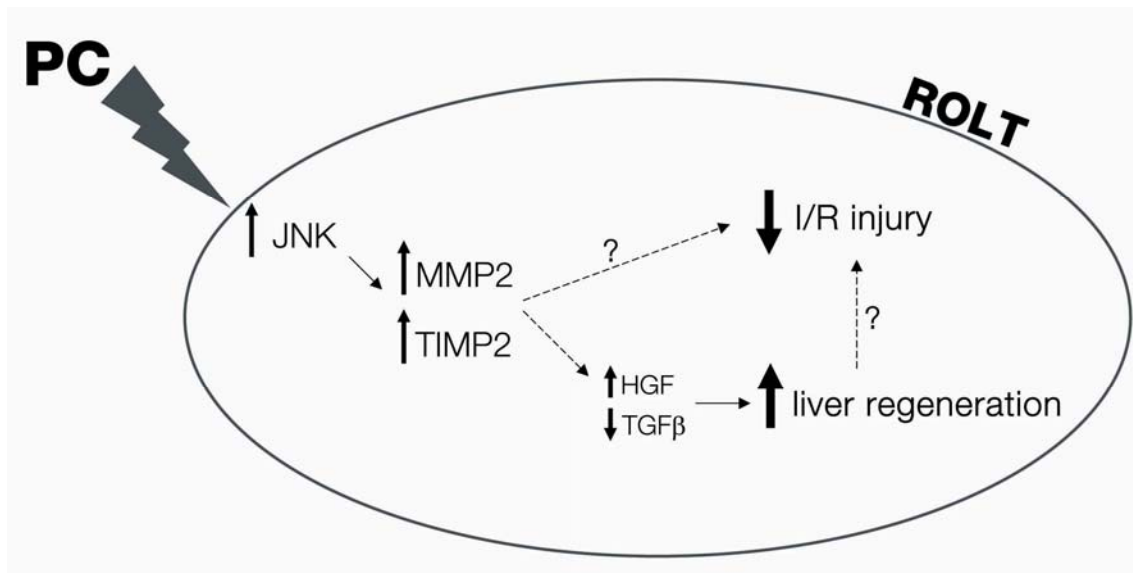


Figura 5.2. Mecanismes proposats dels efectes protectors del PC en el ROLT.

## 6.CONCLUSIONS



### 4.3 ESTUDI 1

- El fetge genera Ang II després de ser sotmès a un ROLT i això està associat a un increment de l'expressió de l'angiotensinogen i l'ACE.
- El efectes protectors del PC vers un ROLT no són deguts a canvis en els nivells d'Ang II ja que aquest no modifica l'expressió dels enzims ni dels precursors capaços de generar Ang II.
- Els bloquejadors de l'acció de l'Ang II redueixen la lesió hepàtica associada al ROLT, però no són capaços d'induir la regeneració hepàtica en el ROLT.
- La BK no juga cap paper en la lesió hepàtica associada al ROLT però l'antagonista del receptor de la BK és capaç d'induir la regeneració del fetge associada al ROLT.
- L'estratègia més adient per a aplicar a un ROLT per a reduir la lesió per I/R i incrementar la regeneració hepàtica és la combinació dels antagonistes dels receptors de l'Ang II i l'antagonista del receptor de la BK.

### 5.2 ESTUDI 2

- El PC incrementa l'expressió i l'activitat de l'MMP2, i els nivells del TIMP2 en el fetge quan aquest és aplicat abans d'un ROLT. A través d'aquest mecanisme, el PC protegeix el fetge davant la lesió per I/R i incrementa la regeneració hepàtica.
- L'administració d'un inhibidor de l'MMP2 junt amb l'aplicació del PC redueix la supervivència dels animals sotmesos a un trasplantament en un 65%, ja que n'inhibeix dràsticament la regeneració hepàtica i n'incrementa dràsticament la lesió per I/R.
- L'MMP9 no participa en els mecanismes protectors del PC en el ROLT.
- La JNK està implicada en els mecanismes protectors del PC en el ROLT ja que aquest incrementa els nivells de la JNK en fetges sotmesos a un ROLT, i això està associat a una disminució del dany hepàtic i un increment de la regeneració del fetge. A més, la JNK és

capaç d'incrementar l'activitat i els nivells de l'MMP2 i els nivells del TIMP2 en els fetges preconditionats i sotmesos a un ROLT.

- L'uPA no juga cap paper en els efectes protectors del PC en el ROLT a les 24 hores de reperfusió.

## 5.2 CONCLUSIONS GENERALS

- El Sistema RAS i la BK participen, respectivament, en la lesió per I/R i la regeneració hepàtica en el ROLT.
- L'MMP2, a través de la JNK i el TIMP2, formen part dels mecanismes protectors del PC en el ROLT.
- Per tant, ambdues poden ser considerades noves dianes terapèutiques en el trasplantament de fetge de donant viu.

## 7.BIBLIOGRAFIA





1. Fawcett D, (ed). Tratado de histología. 12a edició ed. Madrid: Ed. McGraw-Hill Interamericana, 1997.
2. Boyer Za, (ed). Hepatology, a textbook of liver disease. 4a edició ed. Philadelphia: Ed. Saunders, 2003.
3. Dooley SaJ, (ed). Diseases of the liver and biliary system. 11a ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2002.
4. Schneeberger EE, Walters DV, Olver RE. Development of intercellular junctions in the pulmonary epithelium of the foetal lamb. *J Cell Sci* 1978;32:307-324.
5. West RCaJ, (ed). The Lung. New York: Scientific Foundations, Raven Press, 1991.
6. Thompson et Thompson AB RR, Ramberger DJ, Sisson JH, Spurzem JR, Teschler H, Rennard SI. Immunological functions of the pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 1995;8:22.
7. Rennard SI BJ, Robbins RA, (ed). Biology of airway epithelial cells. New York: Scientific Foundations, Raven Press, 1991.
8. Arias B, Fausto, Jakoby, Schacter, Sharitz, (ed). The liver biology and pathobiology. 3a ed. New Yrok: Raven Press, 1994.
9. LC Ginns AC, PJ Morris, (ed). Transplantation. Oxford, 1999.
10. Menger MD, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol* 1992;263(6 Pt 2):H1892-1900.

11. Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery* 1993;14(3):165-175.
12. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81(5):637-647.
13. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992;53(5):957-978.
14. Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995;108(1):252-275.
15. Fornander J, Bergmark J, Jagenburg R, Hasselgren PO. Evaluation of an in vitro method for the study of hepatic protein synthesis in liver ischemia. *Eur Surg Res* 1985;17(2):91-100.
16. Marubayashi S, Takenaka M, Dohi K, Ezaki H, Kawasaki T. Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. *Transplantation* 1980;30(4):294-296.
17. Jennische E. Possible influence of glutathione on postischemic liver injury. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A* 1984;92(1):55-64.
18. Hasselgren PO, Hellman A, Jennische E, Nordstrom G. Failure of an increased dose of ATP-MgCl<sub>2</sub> to improve protein synthesis and transmembrane potential in the postischemic liver. *J Surg Res* 1984;37(5):409-414.
19. Hasselgren PO, Jennische E, Fornander J, Hellman A. No beneficial effect of ATP-MgCl<sub>2</sub> on impaired transmembrane potential and protein synthesis in liver ischemia. *Acta Chir Scand* 1982;148(7):601-607.
20. Trump BF, Goldblatt PJ, Stowell RE. Studies of necrosis in vitro of mouse hepatic parenchymal cells. Ultrastructural alterations in endoplasmic

reticulum, Golgi apparatus, plasma membrane, and lipid droplets. *Lab Invest* 1965;14(11):2000-2028.

21. Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 1969;244(14):3855-3863.

22. Peralta C, Bulbena O, Xaus C, Prats N, Cutrin JC, Poli G et al. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation* 2002;73(8):1203-1211.

23. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986;250(6 Pt 1):G749-753.

24. Gonzalez-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 1993;91(2):456-464.

25. 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):G355-362.

26. Cutrin JC, 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.

27. Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR. Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver. *J Clin Invest* 1988;81(4):1240-1246.

28. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic Res Commun* 1991;15(5):277-284.
29. Jaeschke H. Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem Biol Interact* 1991;79(2):115-136.
30. Rymsa B, Wang JF, de Groot H. O<sub>2</sub><sup>-</sup> release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 1991;261(4 Pt 1):G602-607.
31. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994;145(6):1421-1431.
32. Marzi I, Takei Y, Rucker M, Kawano S, Fusamoto H, Walcher F et al. Endothelin-1 is involved in hepatic sinusoidal vasoconstriction after ischemia and reperfusion. *Transpl Int* 1994;7 Suppl 1:S503-506.
33. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990;4(15):3355-3359.
34. Yadav SS, Howell DN, Gao W, Steeber DA, Harland RC, Clavien PA. L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol* 1998;275(6 Pt 1):G1341-1352.
35. Cywes R, Packham MA, Tietze L, Sanabria JR, Harvey PR, Phillips MJ et al. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology* 1993;18(3):635-647.
36. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181(2):160-166.

37. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukoc Biol* 1992;52(4):377-382.
38. Bilzer M, Lauterburg BH. Oxidant stress and potentiation of ischemia/reperfusion injury to the perfused rat liver by human polymorphonuclear leukocytes. *J Hepatol* 1994;20(4):473-477.
39. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000;32(2):169-173.
40. Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I, Zhang JX. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* 1997;8(2):80-85.
41. Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Farhood A, Jaeschke H. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. *Shock* 1995;4(4):282-288.
42. Nakamura S, Nishiyama R, Serizawa A, Yokoi Y, Suzuki S, Konno H et al. Hepatic release of endothelin-1 after warm ischemia. Reperfusion injury and its hemodynamic effect. *Transplantation* 1995;59(5):679-684.
43. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1996;270(5 Pt 1):G798-803.
44. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA et al. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996;23(3):506-514.
45. Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, Oshima A, Shito M, Kawachi S et al. Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 1997;64(10):1398-1403.

46. Quinta memoria de resultados del Registro Español de Transplante de Órganos y Tejidos. In., 1984-2001.
47. Bzeizi KI, Jalan R, Plevris JN, Hayes PC. Primary graft dysfunction after liver transplantation: from pathogenesis to prevention. *Liver Transpl Surg* 1997;3(2):137-148.
48. Bismuth H, Castaing D, Ericzon BG, Otte JB, Rolles K, Ringe B et al. Hepatic transplantation in Europe. First Report of the European Liver Transplant Registry. *Lancet* 1987;2(8560):674-676.
49. V Cuervas-Mons JdC-O, (ed). Introducción al transplante de órganos y tejidos. 2a ed.: Arán Ediciones, 1999.
50. Neuberger J. Developments in liver transplantation. *Gut* 2004;53(5):759-768.
51. Grande L, Matus D, Rimola A, Manyalic M, Cabrer C, Garcia-Valdecasas JC et al. Expanded liver donor age over 60 years for hepatic transplantation. *Clin Transpl* 1998:297-301.
52. Grande L, Matus D, Manyalic M, Cabrer C, Rodriguez-Montalvo C, Rimola A et al. Effect of donor age on graft outcome after liver transplantation. *Transplant Proc* 1999;31(6):2482-2483.
53. Alexander JW, Zola JC. Expanding the donor pool: use of marginal donors for solid organ transplantation. *Clin Transplant* 1996;10(1 Pt 1):1-19.
54. Melendez HV, Heaton ND. Understanding "marginal" liver grafts. *Transplantation* 1999;68(4):469-471.
55. Pattle RE. Surface Lining of Lung Alveoli. *Physiol Rev* 1965;45:48-79.
56. King RJ. Pulmonary surfactant. *J Appl Physiol* 1982;53(1):1-8.

57. Terzakis JA, Sommers SC, Andersson B. Neurosecretory appearing cells of human segmental bronchi. *Lab Invest* 1972;26(1):127-132.
58. Ward PA, Hunninghake GW. Lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(4 Pt 2):S123-129.
59. Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2001;345(7):517-525.
60. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(2 Pt 1):646-664.
61. Sorokin SP, Hoyt RF, Jr., Pearsall AD. Comparative biology of small granule cells and neuroepithelial bodies in the respiratory system. Short review. *Am Rev Respir Dis* 1983;128(2 Pt 2):S26-31.
62. Tateishi R. Distribution of argyrophil cells in adult human lungs. *Arch Pathol* 1973;96(3):198-202.
63. Fonseca C, Abraham D, Black CM. Lung fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* 1999;21(4):453-474.
64. Hay SFaD, (ed). *The airway Epithelium: Physiology, Pathology and Pharmacology*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991.
65. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150(4):967-972.
66. Johnston ID, Prescott RJ, Chalmers JC, Rudd RM. British Thoracic Society study of cryptogenic fibrosing alveolitis: current presentation and initial management. *Fibrosing Alveolitis Subcommittee of the Research Committee of the British Thoracic Society*. *Thorax* 1997;52(1):38-44.

67. Malago M, Rogiers X, Broelsch CE. Reduced-size hepatic allografts. *Annu Rev Med* 1995;46:507-512.
68. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis. *Transplantation* 1993;55(4):807-813.
69. Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP, Hertl M. Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1994;20(4 Pt 1):829-838.
70. Starzl TE, Demetris AJ. Liver transplantation: a 31-year perspective. Part I. *Curr Probl Surg* 1990;27(2):49-116.
71. Bismuth H, Houssin D. Reduced-sized orthotopic liver graft in hepatic transplantation in children. *Surgery* 1984;95(3):367-370.
72. Broelsch CE NP, Burdelski M, Bojar H. Orthotope Lebertransplantations von Lebersegmenten bei Kleinkindern mit Gallengangsatresieen. *Langenbecks Arch Chir Suppl II Verh Dtsch Ges Chir* 1984(362):4.
73. Emond JC, Whittington PF, Thistlethwaite JR, Alonso EM, Broelsch CE. Reduced-size orthotopic liver transplantation: use in the management of children with chronic liver disease. *Hepatology* 1989;10(5):867-872.
74. de Ville de Goyet J, Hausleithner V, Reding R, Lerut J, Janssen M, Otte JB. Impact of innovative techniques on the waiting list and results in pediatric liver transplantation. *Transplantation* 1993;56(5):1130-1136.
75. Pilchmayer R RB, Gubernatis G, Hauss J, Bunzendahl H. Transplantation einer Spenderleber auf zwei Empfänger (splitting-transplantation) eine neue Methode in der Weiterentwicklung der



---

lebersegment-transplantation. Langenbecks Arch Chir Suppl II Verh Dtsch Ges Chir 1988(373):3.

76. Busuttil RW, Goss JA. Split liver transplantation. Ann Surg 1999;229(3):313-321.

77. Sauer IM, Pascher A, Steinmuller T, Settmacher U, Muller AR, Bechstein WO et al. Split liver and living donation liver transplantation: the Berlin experience. Transplant Proc 2001;33(1-2):1459-1460.

78. de Ville de Goyet J, Otte, J.B. The European Split Liver Registry.

79. Broelsch CE, Whittington PF, Emond JC, Heffron TG, Thistlethwaite JR, Stevens L et al. Liver transplantation in children from living related donors. Surgical techniques and results. Ann Surg 1991;214(4):428-437; discussion 437-429.

80. Broelsch CE, Emond JC, Thistlethwaite JR, Whittington PF, Zucker AR, Baker AL et al. Liver transplantation, including the concept of reduced-size liver transplants in children. Ann Surg 1988;208(4):410-420.

81. Otte JB, de Ville de Goyet J, Reding R, Van Obbergh L, Veyckemans F, Carlier MA et al. 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.

82. Tanaka K, Uemoto S, Tokunaga Y, Fujita S, Sano K, Nishizawa T et al. Surgical techniques and innovations in living related liver transplantation. Ann Surg 1993;217(1):82-91.

83. Ozawa K, Uemoto S, Tanaka K, Kumada K, Yamaoka Y, Kobayashi N 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.

84. Marcos A, Fisher RA, Ham JM, Shiffman ML, Sanyal AJ, Luketic VA et al. Right lobe living donor liver transplantation. *Transplantation* 1999;68(6):798-803.
85. Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003;120(1):117-130.
86. Olthoff KM. Hepatic regeneration in living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2003;9(10 Suppl 2):S35-41.
87. Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg* 2003;197(4):634-659.
88. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276(5309):60-66.
89. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl):19-31.
90. Malik R, Selden C, Hodgson H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13(6):425-431.
91. Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(4):1441-1446.
92. Uchiyama H, Yanaga K, Nishizaki T, Soejima Y, Yoshizumi T, Sugimachi K. Effects of deletion variant of hepatocyte growth factor on reduced-size liver transplantation in rats. *Transplantation* 1999;68(1):39-44.
93. Burr AW, Toole K, Chapman C, Hines JE, Burt AD. Anti-hepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration. *J Pathol* 1998;185(3):298-302.

94. Khalil N. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* 1999;1(15):1255-1263.
95. Russell WE, Coffey RJ, Jr., Ouellette AJ, Moses HL. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(14):5126-5130.
96. Enami Y, Kato H, Murakami M, Fujioka T, Aoki T, Niiya T et al. Anti-transforming growth factor-beta1 antibody transiently enhances DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8(3):250-258.
97. Harvey PR, Iu S, McKeown CM, Petrunka CN, Ilson RG, Strasberg SM. Adenine nucleotide tissue concentrations and liver allograft viability after cold preservation and warm ischemia. *Transplantation* 1988;45(6):1016-1020.
98. Maruyama H, Harada A, Kurokawa T, Kobayashi H, Nonami T, Nakao A et al. Duration of liver ischemia and hepatic regeneration after hepatectomy in rats. *J Surg Res* 1995;58(3):290-294.
99. Portugal V, Garcia-Alonso I, Barcelo P, Mendez J. Effect of allopurinol, folinic acid, SOD and cyclosporine A on ischemic liver regeneration. *Eur Surg Res* 1995;27(2):69-76.
100. Foschi D, Castoldi L, Lesma A, Musazzi M, Benevento A, Trabucchi E. Effects of ischaemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur J Surg* 1993;159(8):393-398.
101. Metzger J, Lauterburg BH. Effect of allopurinol on oxidant stress and hepatic function following ischemia and reperfusion in the rat. *Liver* 1988;8(6):344-349.

102. Metzger J, Dore SP, Lauterburg BH. Oxidant stress during reperfusion of ischemic liver: no evidence for a role of xanthine oxidase. *Hepatology* 1988;8(3):580-584.
103. Jaeschke H. Vascular oxidant stress and hepatic ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Res Commun* 1991;12-13 Pt 2:737-743.
104. Imamura H, Sutto F, Brault A, Huet PM. Role of Kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology* 1995;109(1):189-197.
105. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18(8):891-902.
106. Harris CM, Massey V. The oxidative half-reaction of xanthine dehydrogenase with NAD; reaction kinetics and steady-state mechanism. *J Biol Chem* 1997;272(45):28335-28341.
107. Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA. Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;139(2):213-226.
108. Ghezzi P, Dinarello CA, Bianchi M, Rosandich ME, Repine JE, White CW. Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human mononuclear cells. *Cytokine* 1991;3(3):189-194.
109. Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 1992;16(5):1236-1240.
110. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ, Smith CW. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 1993;17(5):915-923.

- 
111. Hisama N, Yamaguchi Y, Ishiko T, Miyanari N, Ichiguchi O, Goto M et al. Kupffer cell production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia/reperfusion injury in rats. *Hepatology* 1996;24(5):1193-1198.
112. Martinez-Mier G, Toledo-Pereyra LH, McDuffie JE, Warner RL, Ward PA. Neutrophil depletion and chemokine response after liver ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 2001;14(2):99-107.
113. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320(6):365-376.
114. Thornton AJ, Strieter RM, Lindley I, Baggiolini M, Kunkel SL. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J Immunol* 1990;144(7):2609-2613.
115. Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, Shimazu M, Shirasugi N, Endo M et al. 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.
116. Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 2002;89(9):1089-1095.
117. Boulton R, Woodman A, Calnan D, Selden C, Tam F, Hodgson H. Nonparenchymal cells from regenerating rat liver generate interleukin-1alpha and -1beta: a mechanism of negative regulation of hepatocyte proliferation. *Hepatology* 1997;26(1):49-58.
118. Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;114(2):344-351.

119. Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, Frangos JA, Mennone A, Groszmann RJ et al. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest* 1997;100(11):2923-2930.
120. Liu P, Yin K, Nagele R, Wong PY. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxynitrite generation, but augments neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;284(3):1139-1146.
121. 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(2):346-352.
122. Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P et al. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1998;66(2):152-157.
123. Pannen BH, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998;27(3):755-764.
124. Jaeschke H, Schini VB, Farhood A. Role of nitric oxide in the oxidant stress during ischemia/reperfusion injury of the liver. *Life Sci* 1992;50(23):1797-1804.
125. Koepfel TA, Thies JC, Schemmer P, Trauner M, Gebhard MM, Otto G et al. 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.
126. Pabla R, Buda AJ, Flynn DM, Blesse SA, Shin AM, Curtis MJ et al. Nitric oxide attenuates neutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1996;78(1):65-72.

127. Naito Y, Yoshikawa T, Matsuyama K, Yagi N, Arai M, Nakamura Y et al. Neutrophils, lipid peroxidation, and nitric oxide in gastric reperfusion injury in rats. *Free Radic Biol Med* 1998;24(3):494-502.
128. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(4):1620-1624.
129. Liu P, Hock CE, Nagele R, Wong PY. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 2):H2327-2336.
130. Szabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 1996;6(2):79-88.
131. Rai RM, Lee FY, Rosen A, Yang SQ, Lin HZ, Koteish A et al. Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(23):13829-13834.
132. de Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ, Chiu AT, Drew M et al. Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension* 1995;25(5):924-927.
133. Gavras I, Gavras H. Angiotensin II as a cardiovascular risk factor. *J Hum Hypertens* 2002;16 Suppl 2:S2-6.
134. Hughes AD. AT(1)-signalling in vascular smooth muscle. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2000;1(2):125-130.
135. Luft FC, Mervaala E, Muller DN, Gross V, Schmidt F, Park JK et al. Hypertension-induced end-organ damage : A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension* 1999;33(1 Pt 2):212-218.

136. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(3):645-651.
137. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Blanco J, Egido J. Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors. *Am J Pathol* 2001;158(5):1743-1756.
138. Harrison DG, Cai H, Landmesser U, Griendling KK. Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2003;4(2):51-61.
139. Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 1987;79(1):1-6.
140. Ekker M, Tronik D, Rougeon F. Extra-renal transcription of the renin genes in multiple tissues of mice and rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(13):5155-5158.
141. Zimmerman BG, Dunham EW. Tissue renin-angiotensin system: a site of drug action? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:53-69.
142. Casillas-Ramirez A, Amine-Zaouali M, Massip-Salcedo M, Padrissa-Altes S, Bintanel-Morcillo M, Ramalho F et al. Inhibition of angiotensin II action protects rat steatotic livers against ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 2008;36(4):1256-1266.
143. 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(3):439-451.



144. Ramalho FS, Ramalho LN, Castro-e-Silva Junior O, Zucoloto S, Correa FM. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on liver regeneration in rats. *Hepatogastroenterology* 2002;49(47):1347-1351.
145. Yayama K, Sugiyama K, Miyagi R, Okamoto H. Angiotensin-converting enzyme inhibitor enhances liver regeneration following partial hepatectomy: involvement of bradykinin B2 and angiotensin AT1 receptors. *Biol Pharm Bull* 2007;30(3):591-594.
146. Kouyoumdjian M, Nagaoka MR, Borges DR. Kallikrein-kinin system in hepatic experimental models. *Peptides* 2005;26(8):1301-1307.
147. Hall JM. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol Ther* 1992;56(2):131-190.
148. Girolami JP, Ouardani M, Bascands JL, Pecher C, Bompard G, Leung-Tack J. Comparison of B1 and B2 receptor activation on intracellular calcium, cell proliferation, and extracellular collagen secretion in mesangial cells from normal and diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73(7):848-853.
149. Talwar HS, Fisher GJ, Voorhees JJ. Bradykinin induces phosphoinositide turnover, 1,2-diglyceride formation, and growth in cultured adult human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1990;95(6):705-710.
150. Goldstein RH, Wall M. Activation of protein formation and cell division by bradykinin and des-Arg9-bradykinin. *J Biol Chem* 1984;259(14):9263-9268.
151. Dendorfer A, Folkers V, Klinger M, Wolfrum S, Dominiak P. Inhibition of kinin breakdown prolongs retention and action of bradykinin in a myocardial B2 receptor compartment. *Br J Pharmacol* 2003;138(2):310-316.

152. Freise H, Palmes D, Spiegel HU. Inhibition of angiotensin-converting enzyme reduces rat liver reperfusion injury via bradykinin-2-receptor. *J Surg Res* 2006;134(2):231-237.
153. Viappiani S, Sariahmetoglu M, Schulz R. The role of matrix metalloproteinase inhibitors in ischemia-reperfusion injury in the liver. *Curr Pharm Des* 2006;12(23):2923-2934.
154. Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem* 1994;269(41):25742-25746.
155. Karsdal MA, Larsen L, Engsig MT, Lou H, Ferreras M, Lochter A et al. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277(46):44061-44067.
156. Schonbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* 1998;161(7):3340-3346.
157. Chen CF, Leu FJ, Chen HI, Wang D. Oxygen radicals and matrix metalloproteinases mediate reperfusion liver injury. *Transplant Proc* 2005;37(10):4547-4549.
158. Cursio R, Mari B, Louis K, Rostagno P, Saint-Paul MC, Giudicelli J et al. Rat liver injury after normothermic ischemia is prevented by a phosphinic matrix metalloproteinase inhibitor. *FASEB J* 2002;16(1):93-95.
159. Shirahane K, Yamaguchi K, Koga K, Watanabe M, Kuroki S, Tanaka M. Hepatic ischemia/reperfusion injury is prevented by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817. *Surgery* 2006;139(5):653-664.

160. Kuyvenhoven JP, Molenaar IQ, Verspaget HW, Veldman MG, Palareti G, Legnani C et al. Plasma MMP-2 and MMP-9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 during human orthotopic liver transplantation. The effect of aprotinin and the relation to ischemia/reperfusion injury. *Thromb Haemost* 2004;91(3):506-513.
161. Kuyvenhoven JP, Verspaget HW, Gao Q, Ringers J, Smit VT, Lamers CB et al. Assessment of serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 after human liver transplantation: increased serum MMP-9 level in acute rejection. *Transplantation* 2004;77(11):1646-1652.
162. Rudolph KL, Trautwein C, Kubicka S, Rakemann T, Bahr MJ, Sedlacek N et al. Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 1999;30(5):1159-1166.
163. Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Michalopoulos GK. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology* 2000;31(1):75-82.
164. Fuke H, Saitou Y, Nakano T, Uemoto S, Shiraki K. Matrix metalloproteinase, hepatocyte growth factor, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase during human liver regeneration. *Liver Int* 2006;26(3):380-381.
165. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92(8):827-839.
166. Bode W, Maskos K. Structural studies on MMPs and TIMPs. *Methods Mol Biol* 2001;151:45-77.
167. Kinoshita T, Sato H, Okada A, Ohuchi E, Imai K, Okada Y et al. TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix

metalloproteinase immobilized on agarose beads. *J Biol Chem* 1998;273(26):16098-16103.

168. Tamura DY, Moore EE, Johnson JL, Zallen G, Aiboshi J, Silliman CC. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates intercellular adhesion molecule-1 up-regulation on human pulmonary microvascular endothelial cells. *Surgery* 1998;124(2):403-407; discussion 408.

169. Bendinelli P, Piccoletti R, Maroni P, Bernelli-Zazzera A. The MAP kinase cascades are activated during post-ischemic liver reperfusion. *FEBS Lett* 1996;398(2-3):193-197.

170. 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.

171. Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 1996;274(5290):1194-1197.

172. Uehara T, Xi Peng X, Bennett B, Satoh Y, Friedman G, Currin R et al. c-Jun N-terminal kinase mediates hepatic injury after rat liver transplantation. *Transplantation* 2004;78(3):324-332.

173. Tang LM, Wang YP, Wang K, Pu LY, Zhang F, Li XC et al. Exogenous biliverdin ameliorates ischemia-reperfusion injury in small-for-size rat liver grafts. *Transplant Proc* 2007;39(5):1338-1344.

174. 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.

175. Lehmann TG, Wheeler MD, Froh M, Schwabe RF, Bunzendahl H, Samulski RJ et al. Effects of three superoxide dismutase genes delivered with

---

an adenovirus on graft function after transplantation of fatty livers in the rat. *Transplantation* 2003;76(1):28-37.

176. Ilesalnieks I, Rentsch M, Lengyel E, Mirwald T, Jauch K, Beham A. JNK and p38MAPK are activated during graft reperfusion and not during cold storage in rat liver transplantation. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):931-932.

177. Bradham CA, Stachlewitz RF, Gao W, Qian T, Jayadev S, Jenkins G et al. Reperfusion after liver transplantation in rats differentially activates the mitogen-activated protein kinases. *Hepatology* 1997;25(5):1128-1135.

178. Tsung A, Stang MT, Ikeda A, Critchlow ND, Izuishi K, Nakao A et al. The transcription factor interferon regulatory factor-1 mediates liver damage during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290(6):G1261-1268.

179. Diehl AM. Effect of ethanol on tumor necrosis factor signaling during liver regeneration. *Clin Biochem* 1999;32(7):571-578.

180. Thevananther S, Sun H, Li D, Arjunan V, Awad SS, Wyllie S et al. Extracellular ATP activates c-jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes. *Hepatology* 2004;39(2):393-402.

181. Zhong Z, Schwabe RF, Kai Y, He L, Yang L, Bunzendahl H et al. Liver regeneration is suppressed in small-for-size liver grafts after transplantation: involvement of c-Jun N-terminal kinase, cyclin D1, and defective energy supply. *Transplantation* 2006;82(2):241-250.

182. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001;20(19):2390-2400.

183. Bakiri L, Lallemand D, Bossy-Wetzel E, Yaniv M. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J* 2000;19(9):2056-2068.

184. Leyland H, Gentry J, Arthur MJ, Benyon RC. The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996;24(5):1172-1178.
185. Li WY, Chong SS, Huang EY, Tuan TL. Plasminogen activator/plasmin system: a major player in wound healing? *Wound Repair Regen* 2003;11(4):239-247.
186. Mars WM, Liu ML, Kitson RP, Goldfarb RH, Gabauer MK, Michalopoulos GK. Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. *Hepatology* 1995;21(6):1695-1701.
187. Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W et al. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J* 1992;11(13):4825-4833.
188. Nagy P, Bisgaard HC, Santoni-Rugiu E, Thorgeirsson SS. In vivo infusion of growth factors enhances the mitogenic response of rat hepatic ductal (oval) cells after administration of 2-acetylaminofluorene. *Hepatology* 1996;23(1):71-79.
189. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74(5):1124-1136.
190. 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.
191. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 1999;29(1):126-132.

192. Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S et al. Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery* 1999;126(5):945-954.
193. Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, Korthuis RJ. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock* 1997;8(2):86-94.
194. Ricciardi R, Meyers WC, Schaffer BK, Kim RD, Shah SA, Wheeler SM et al. Protein kinase C inhibition abrogates hepatic ischemic preconditioning responses. *J Surg Res* 2001;97(2):144-149.
195. Speechly-Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM. Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res* 1994;75(3):586-590.
196. Ricciardi R, Schaffer BK, Kim RD, Shah SA, Donohue SE, Wheeler SM et al. Protective effects of ischemic preconditioning on the cold-preserved liver are tyrosine kinase dependent. *Transplantation* 2001;72(3):406-412.
197. Carini R, Grazia De Cesaris M, Splendore R, Albano E. Stimulation of p38 MAP kinase reduces acidosis and Na(+) overload in preconditioned hepatocytes. *FEBS Lett* 2001;491(3):180-183.
198. 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.
199. Funaki H, Shimizu K, Harada S, Tsuyama H, Fushida S, Tani T et al. Essential role for nuclear factor kappaB in ischemic preconditioning for ischemia-reperfusion injury of the mouse liver. *Transplantation* 2002;74(4):551-556.

200. Ricciardi R, Shah SA, Wheeler SM, Quarfordt SH, Callery MP, Meyers WC et al. Regulation of NFkappaB in hepatic ischemic preconditioning. *J Am Coll Surg* 2002;195(3):319-326.
201. Gullo CA, Teoh G. Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Immunol Lett* 2004;94(1-2):1-10.
202. Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol* 1998;16(9):833-838.
203. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti MP et al. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001;33(1):131-139.
204. Carini R, Grazia De Cesaris M, Splendore R, Domenicotti C, Nitti MP, Pronzato MA et al. Signal pathway responsible for hepatocyte preconditioning by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2003;34(8):1047-1055.
205. Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T et al. Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 1996;128(3):251-258.
206. Schlossberg H, Zhang Y, Dudus L, Engelhardt JF. Expression of c-fos and c-jun during hepatocellular remodeling following ischemia/reperfusion in mouse liver. *Hepatology* 1996;23(6):1546-1555.
207. Ishii S, Abe T, Saito T, Tsuchiya T, Kanno H, Miyazawa M et al. Effects of preconditioning on ischemia/reperfusion injury of hepatocytes determined by immediate early gene transcription. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8(5):461-468.



208. Saito T, Ishii S, Abe T, Tsuchiya T, Kanno H, Miyazawa M et al. Effect of preconditioning in the liver against ischemia/reperfusion injury, protection of sinusoidal cells and alterations of gene transcription. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):849.
209. Sindram D, Rudiger HA, Upadhyya AG, Strasberg SM, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism. *J Hepatol* 2002;36(1):78-84.
210. Xiao JS, Cai FG, Niu Y, Zhang Y, Xu XL, Ye QF. Preconditioning effects on expression of proto-oncogenes c-fos and c-jun after hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005;4(2):197-202.
211. Teoh N, Leclercq I, Pena AD, Farrell G. Low-dose TNF-alpha protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: implications for preconditioning. *Hepatology* 2003;37(1):118-128.
212. Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-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.
213. Gong JP, Tu B, Wang W, Peng Y, Li SB, Yan LN. Protective effect of nitric oxide induced by ischemic preconditioning on reperfusion injury of rat liver graft. *World J Gastroenterol* 2004;10(1):73-76.
214. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. 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.
215. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-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.

216. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. 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.

217. Peralta C, Rull R, Rimola A, Deulofeu R, Rosello-Catafau J, Gelpi E et al. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001;71(4):529-536.

218. Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Hotter G. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 1998;28(3):768-773.

219. Peralta C, Bartrons R, Riera L, Manzano A, Xaus C, Gelpi E et al. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279(1):G163-171.

220. Peralta C, Bartrons R, Serafin A, Blazquez C, Guzman 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(6):1164-1173.

221. Howell JG, Zibari GB, Brown MF, Burney DL, Sawaya DE, Olinde JG et al. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. *Transplantation* 2000;69(2):300-303.

222. Koti RS, Yang W, Dashwood MR, Davidson BR, Seifalian AM. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transpl* 2002;8(12):1182-1191.

223. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284(1):G15-26.
224. 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.
225. Sawaya DE, Jr., Brown M, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger DN et al. 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.
226. Zapletal C, Maksan SM, Lehmann T, Guenther L, Fallsehr C, Mehrabi A et al. Ischemic preconditioning improves liver microcirculation after ischemia/reperfusion. *Transplant Proc* 1999;31(8):3260-3262.
227. 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.
228. Cutrn JC, Perrelli MG, 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.
229. Peralta C, Perales JC, Bartrons R, Mitchell C, Gilgenkrantz H, Xaus C et al. 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.
230. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-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.

231. Peralta C, Fernandez L, Panes J, Prats N, Sans M, Pique JM et al. 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.
232. Serafin A, Rosello-Catafau J, Prats N, Gelpi E, Rodes J, Peralta C. Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion. *Hepatology* 2004;39(3):688-698.
233. Terajima H, Enders G, Thiaener A, Hammer C, Kondo T, Thiery J et al. Impact of hyperthermic preconditioning on postischemic hepatic microcirculatory disturbances in an isolated perfusion model of the rat liver. *Hepatology* 2000;31(2):407-415.
234. Matsumoto K, Honda K, Kobayashi N. Protective effect of heat preconditioning of rat liver graft resulting in improved transplant survival. *Transplantation* 2001;71(7):862-868.
235. Ito K, Ozasa H, Sanada K, Horikawa S. Doxorubicin preconditioning: a protection against rat hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2000;31(2):416-419.
236. Gerbes AL, Vollmar AM, Kiemer AK, Bilzer M. The guanylate cyclase-coupled natriuretic peptide receptor: a new target for prevention of cold ischemia-reperfusion damage of the rat liver. *Hepatology* 1998;28(5):1309-1317.
237. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 1993;342(8866):276-277.
238. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993;88(3):1264-1272.

239. Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart* 1997;77(4):314-318.
240. Chen S, Li G, Long L. [Clinical research of ischemic preconditioning on lung protection]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1999;24(4):357-359.
241. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* 2002;106(23):2881-2883.
242. Yang Y, Chen SX, Zhang WX. [Effect of ischemic preconditioning on human lung cell apoptosis in vivo and the expression of regulating gene bcl-2]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2002;27(1):43-45.
243. Sitzer M, Foerch C, Neumann-Haefelin T, Steinmetz H, Misselwitz B, Kugler C et al. Transient ischaemic attack preceding anterior circulation infarction is independently associated with favourable outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75(4):659-660.
244. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 2000;232(2):155-162.
245. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003;238(6):843-850; discussion 851-842.
246. Nuzzo G, Giuliani F, Vellone M, De Cosmo G, Ardito F, Murazio M et al. Pedicle clamping with ischemic preconditioning in liver resection. *Liver Transpl* 2004;10(2 Suppl 1):S53-57.

247. Li SQ, Liang LJ, Huang JF, 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.
248. Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 1979;28(1):47-50.
249. Xia R, Emond JC. Orthotopic partial liver transplantation in the rat: a model of 70% hepatectomy and reduced size liver transplantation. *Transplantation* 1993;56(4):1041-1043.
250. Omura T, Ascher NL, Emond JC. Fifty-percent partial liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1996;62(2):292-293.
251. 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(9):1408-1420.
252. Takei Y, Gao WS, Hijioka T, Savier E, Lindert KA, Lemasters JJ et al. Increase in survival of liver grafts after rinsing with warm Ringer's solution due to improvement of hepatic microcirculation. *Transplantation* 1991;52(2):225-230.
253. Fernandez L, Heredia N, Grande L, Gomez G, Rimola A, Marco A et al. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology* 2002;36(3):562-572.
254. Guo L, Richardson KS, Tucker LM, Doll MA, Hein DW, Arteel GE. Role of the renin-angiotensin system in hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *Hepatology* 2004;40(3):583-589.

255. Siu MK, Cheng CY. Interactions of proteases, protease inhibitors, and the beta1 integrin/laminin gamma3 protein complex in the regulation of ectoplasmic specialization dynamics in the rat testis. *Biol Reprod* 2004;70(4):945-964.
256. Massip-Salcedo M, Casillas-Ramirez A, Franco-Gou R, Bartrons R, Ben Mosbah I, Serafin A et al. Heat shock proteins and mitogen-activated protein kinases in steatotic livers undergoing ischemia-reperfusion: some answers. *Am J Pathol* 2006;168(5):1474-1485.
257. Justicia C, Panes J, Sole S, Cervera A, Deulofeu R, Chamorro A et al. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23(12):1430-1440.
258. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 2001;25(4):402-408.
259. Selzner N, Selzner M, Tian Y, Kadry Z, Clavien PA. Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: A TNF-alpha/IL-6-dependent mechanism. *Hepatology* 2002;36(4 Pt 1):812-818.
260. Selzner M, Camargo CA, Clavien PA. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6. *Hepatology* 1999;30(2):469-475.
261. Camargo CA, Jr., Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 1997;26(6):1513-1520.

262. Serafin A, Rosello-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(2):587-601.
263. Masson GM, Kashii C, Matsunaga M, Page IH. Hypertensive Vascular Disease Produced by Homologous Renin. *Science* 1964;145:178-180.
264. Gavras H, Lever AF, Brown JJ, Macadam RF, Robertson JL. Acute renal failure, tubular necrosis, and myocardial infarction induced in the rabbit by intravenous angiotensin II. *Lancet* 1971;2(7714):19-22.
265. Brunner HR, Laragh JH, Baer L, Newton MA, Goodwin FT, Krakoff LR et al. Essential hypertension: renin and aldosterone, heart attack and stroke. *N Engl J Med* 1972;286(9):441-449.
266. Volpe M, Camargo MJ, Mueller FB, Campbell WG, Jr., Sealey JE, Pecker MS et al. Relation of plasma renin to end organ damage and to protection of K<sup>+</sup> feeding in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1990;15(3):318-326.
267. Masuko H, Jin MB, Horiuchi H, Suzuki T, Taniguchi M, Shimamura T et al. Protective effect of angiotensin II type I receptor antagonist, CV-11974, on ischemia and reperfusion injury of the liver. *Transplantation* 2001;71(8):1034-1039.
268. Anthuber M, Farkas S, Rihl M, Menger MD, Schildberg FW, Jauch KW et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition by enalapril: a novel approach to reduce ischemia/reperfusion damage after experimental liver transplantation. *Hepatology* 1997;25(3):648-651.
269. Hinoi T, Tomohiro Y, Kajiwara S, Matsuo S, Fujimoto Y, Yamamoto S et al. Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, improves coronary microcirculation and insulin resistance among essential hypertensive patients without left ventricular hypertrophy. *Hypertens Res* 2008;31(4):615-622.



270. Xiao XH, Allen DG. The role of endogenous angiotensin II in ischaemia, reperfusion and preconditioning of the isolated rat heart. *Pflugers Arch* 2003;445(6):643-650.
271. Diaz RJ, Wilson GJ. Selective blockade of AT1 angiotensin II receptors abolishes ischemic preconditioning in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(1):129-139.
272. Randall MD, Gardiner SM, Bennett T. Enhanced cardiac preconditioning in the isolated heart of the transgenic ((mREN-2) 27) hypertensive rat. *Cardiovasc Res* 1997;33(2):400-409.
273. Nakano N, Moriguchi A, Morishita R, Kida I, Tomita N, Matsumoto K et al. Role of angiotensin II in the regulation of a novel vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), in experimental hypertensive rats. *Hypertension* 1997;30(6):1448-1454.
274. Yo Y, Morishita R, Yamamoto K, Tomita N, Kida I, Hayashi S et al. Actions of hepatocyte growth factor as a local modulator in the kidney: potential role in pathogenesis of renal disease. *Kidney Int* 1998;53(1):50-58.
275. Franco-Gou R, Rosello-Catafau J, Casillas-Ramirez A, Massip-Salcedo M, Rimola A, Calvo N et al. How ischaemic preconditioning protects small liver grafts. *J Pathol* 2006;208(1):62-73.
276. Nakamura T, Tomita Y, Hirai R, Yamaoka K, Kaji K, Ichihara A. Inhibitory effect of transforming growth factor-beta on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;133(3):1042-1050.
277. McMahon JB, Richards WL, del Campo AA, Song MK, Thorgeirsson SS. Differential effects of transforming growth factor-beta on proliferation of normal and malignant rat liver epithelial cells in culture. *Cancer Res* 1986;46(9):4665-4671.

278. Fausto N, Mead JE, Gruppuso PA, Braun L. TGF-beta in liver development, regeneration, and carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1990;593:231-242.

279. Rutherford JD, Pfeffer MA, Moye LA, Davis BR, Flaker GC, Kowey PR et al. Effects of captopril on ischemic events after myocardial infarction. Results of the Survival and Ventricular Enlargement trial. SAVE Investigators. *Circulation* 1994;90(4):1731-1738.

280. ISIS-4: a randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet* 1995;345(8951):669-685.

281. Moore C, Shen XD, Gao F, Busuttill RW, Coito AJ. Fibronectin-alpha4beta1 integrin interactions regulate metalloproteinase-9 expression in steatotic liver ischemia and reperfusion injury. *Am J Pathol* 2007;170(2):567-577.

282. Defamie V, Laurens M, Patrono D, Devel L, Brault A, Saint-Paul MC et al. Matrix metalloproteinase inhibition protects rat livers from prolonged cold ischemia-warm reperfusion injury. *Hepatology* 2008;47(1):177-185.

283. Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J Biol Chem* 2002;277(24):21352-21360.

284. Mohammed FF, Pennington CJ, Kassiri Z, Rubin JS, Soloway PD, Ruther U et al. Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration. *Hepatology* 2005;41(4):857-867.

285. Padrissa-Altes S, Franco-Gou R, Boillot O, Serafin A, Rimola A, Arroyo V et al. Effect of angiotensin II and bradykinin inhibition in rat reduced-size liver transplantation. *Liver Transpl* 2009;15(3):313-320.
286. Dahm F, Georgiev P, Clavien PA. Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical implications. *Am J Transplant* 2005;5(11):2605-2610.
287. Jiang WW, Kong LB, Li GQ, Wang XH. Expression of iNOS in early injury in a rat model of small-for-size liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009;8(2):146-151.
288. Yao AH, Yang Y, Li XC, Pu LY, Zhong JW, Liu XZ et al. Hepatic Regenerative Response in Small-Sized Liver Isografts in the Rat. *J Surg Res* 2009.
289. Tian Y, Graf R, Jochum W, Clavien PA. Arterialized partial orthotopic liver transplantation in the mouse: a new model and evaluation of the critical liver mass. *Liver Transpl* 2003;9(8):789-795.
290. Lee KH, Kim SE, Lee YS. SP600125, a selective JNK inhibitor, aggravates hepatic ischemia-reperfusion injury. *Exp Mol Med* 2006;38(4):408-416.
291. Sampieri CL, Nuttall RK, Young DA, Goldspink D, Clark IM, Edwards DR. Activation of p38 and JNK MAPK pathways abrogates requirement for new protein synthesis for phorbol ester mediated induction of select MMP and TIMP genes. *Matrix Biol* 2008;27(2):128-138.
292. Yu X, Lin SG, Huang XR, Bacher M, Leng L, Bucala R et al. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression in macrophages via the MEK-ERK MAP kinase pathway. *J Interferon Cytokine Res* 2007;27(2):103-109.

293. Okamoto T, Akaike T, Nagano T, Miyajima S, Suga M, Ando M et al. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1997;342(2):261-274.

294. Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, Schade van Westrum S et al. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem* 1998;273(2):871-880.

## 8. ANNEXOS



**ANNEX 1**

A continuació s'adjunta la llista d'articles originats directa o indirectament de la present tesi:

- Padrissa-Altés S, Franco-Gou R, Boillot O, Serafín A, Rimola A, Arroyo V, Rodés J, Peralta C, Roselló-Catafau J. Effect of angiotensin II and bradykinin inhibition in rat reduced-size liver transplantation. *Liver Transpl.* 2009 Mar;15(3):313-20. PubMed PMID: 19242996.
- Padrissa-Altés S, Zaouali MA, Franco-Gou R, Batrons R, Boillot O, Rimola A, Arroyo V, Rodés J, Peralta C, Roselló-Catafau J. Matrix Metalloproteinase 2 in reduced-size liver transplantation: Beyond the matrix. *Am J Transpl.* In press.
- Ben Mosbah I, Ben Abdennebi H, Zaouali MA, Padrissa-Altés S, Peralta C, Roselló-Catafau J. Trimetazidine and liver preservation against ischaemia-reperfusion injury. *Arch Med Sci.* 2007; 3A, September / 2007.
- Massip-Salcedo M, Zaouali MA, Padrissa-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 Feb;47(2):461-72.
- Casillas-Ramirez A, Amine-Zaouali M, Massip-Salcedo M, Padrissa-Altés S, Bintanel-Morcillo M, Ramalho F, Serafín 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 Apr;36(4):1256-66.
- Casillas-Ramírez A, Zaouali A, Padrissa-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 Mar 12.

- Zaouali MA, Ben Abdennebi H, Padrissa-Altés S, Mahfoudh-Boussaid A, Roselló-Catafau J. Pharmacological strategies against cold ischemia reperfusion injury. *Expert Opin Pharmacother* 2010. 11(4):1-19.



## ANNEX 2



# Effect of Angiotensin II and Bradykinin Inhibition in Rat Reduced-Size Liver Transplantation

Susagna Padrissa-Altés,<sup>\*1\*</sup> Rosa Franco-Gou,<sup>\*1\*</sup> Olivier Boillot,<sup>2</sup> Anna Serafín,<sup>3</sup> Antoni Rimola,<sup>4,5,6</sup> Vicente Arroyo,<sup>4,6</sup> Joan Rodés,<sup>4,6</sup> Carmen Peralta,<sup>4,5</sup> and Joan Roselló-Catafau<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>Experimental Hepatic Ischemia-Reperfusion Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Unit of Hepatic Transplantation, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France; <sup>3</sup>Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas Esther Koplowitz, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Instituto de Salud Carlos III, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Unitat de Transplantament de Fetge i Viabilitat de l'Empelt, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain; and <sup>6</sup>Liver Unit, Hospital Clinic Universitari, Barcelona, Spain

This study examined whether angiotensin II (Ang II) blockers [Ang II type I receptor antagonist, Ang II type II receptor antagonist, and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor] could reduce hepatic injury and improve regeneration in reduced-size orthotopic liver transplantation (ROLT) and whether the beneficial effects of ischemic preconditioning (PC) in ROLT could be explained by changes in Ang II. We show that small liver grafts generated Ang II after ROLT and that this was associated with increased angiotensinogen and ACE messenger RNA expression. Furthermore, inhibition of Ang II did not contribute to PC-induced protection in ROLT. All Ang II blockers reduced hepatic injury, but none of them promoted liver regeneration. Bradykinin (BK) receptor antagonist improved liver regeneration but did not reduce hepatic injury in ROLT. Finally, the combination of Ang II blockers and BK receptor antagonists in ROLT reduced hepatic injury and improved liver regeneration. In conclusion, treatments with either Ang II blockers or BK receptor antagonists cannot, on their own, improve the outcome of ROLT. Although Ang II blockers can reduce hepatic ischemia-reperfusion injury and BK receptor antagonists can promote liver regeneration, neither confers both benefits at the same time. Consequently, it may be of clinical interest to apply both treatments simultaneously. *Liver Transpl* 15:313-320, 2009. © 2009 AASLD.

Received June 30, 2008; accepted October 4, 2008.

Living-related liver transplantation has developed rapidly in recent years in order to alleviate the mortality resulting from the scarcity of suitable deceased donors.<sup>1-3</sup> The main limitation of living-related liver transplantation is graft size disparity because reduced-size liver grafts must regenerate rapidly to ensure normal function and patient survival.<sup>4-6</sup> Ischemia-reperfusion

(I/R), which is inevitable in liver transplantation, reduces liver regeneration after hepatectomy.<sup>7-10</sup> Little is known about the mechanisms underlying the dysfunction and failure of reduced-size liver grafts.<sup>11</sup>

Angiotensin II (Ang II), which is produced via angiotensin converting enzyme (ACE) from angiotensin I, is the main effector of the renin-angiotensin system. It

**Abbreviations:** ACE, angiotensin converting enzyme; ALT, alanine aminotransferase; Ang II, angiotensin II; AST, aspartate aminotransferase; AT1R, angiotensin II type I receptor; AT2R, angiotensin II type II receptor; BK, bradykinin; HGF, hepatocyte growth factor; I/R, ischemia-reperfusion; mRNA, messenger RNA; PC, preconditioning; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PCR, polymerase chain reaction; ROLT, reduced-size orthotopic liver transplantation; TGF $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ .

This work was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia (Madrid, Spain) through project grant SAF 2005-00385 (as an FPI fellowship to Susagna Padrissa-Altés), by the Ministerio de Sanidad y Consumo (Madrid, Spain) through PIO60021 PJ08/1988 grants, and by the Generalitat de Catalunya (Barcelona, Spain) through the 2005 SGR/00781 project. The Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

\*These authors contributed equally to this study.

Address reprint requests to Joan Roselló-Catafau, Experimental Hepatic Ischemia-Reperfusion Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Rosellón 161, 7th Floor, 08036 Barcelona, Spain. Telephone: +34-933638333; FAX: +34-933638301; E-mail: jrccam@iibb.csic.es

DOI 10.1002/lt.21693

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

exerts its biological action through its receptor subtypes: Ang II type I receptor (AT1R) and Ang II type II receptor (AT2R).<sup>12</sup> Previous studies reported that ACE inhibitors or AT1R antagonists protect against warm hepatic I/R injury<sup>12,13</sup> and that ACE inhibitors show beneficial effects on injury in liver transplantation from non-reduced-size grafts,<sup>14</sup> thus suggesting a detrimental role of Ang II in hepatic I/R. ACE inhibitors enhance liver regeneration after partial hepatectomy.<sup>15,16</sup> These observations suggest that Ang II blockers might exert their beneficial effects in situations that require both I/R and liver regeneration, such as reduced-size liver transplantation. ACE inhibitors not only inhibit Ang II generation but also increase bradykinin (BK) levels.<sup>17</sup> For instance, the beneficial effects of ACE inhibitors on I/R injury were attributed to BK in an experimental model of I/R without partial hepatectomy,<sup>17</sup> and ACE inhibitors increased liver regeneration after partial hepatectomy through activation of BK2 receptors.<sup>16</sup> We therefore hypothesized that BK is responsible for the potentially beneficial effects of ACE inhibitors in surgical situations that require both I/R and hepatectomy. Ischemic preconditioning (PC), that is, a short period of ischemia followed by a brief period of reperfusion before a sustained ischemic insult, protected the liver against I/R injury and improved hepatic regeneration in an experimental model of reduced-size liver transplantation,<sup>18</sup> but the mechanisms of protection are not well established. A recent study by our group indicated a differential effect of PC on Ang II in an experimental model of warm ischemia, depending on the liver type.<sup>19</sup>

The aims of the present study were to evaluate the effect of Ang II blockers on hepatic I/R injury and liver regeneration in reduced-size liver transplantation and to determine the effect of PC on Ang II. This could contribute to the development of pharmacological treatments based on modulating Ang II action to improve the quality of the reduced-size liver grafts.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental Animals

Male Sprague-Dawley rats (200-250 g) were anesthetized with isoflurane. Research procedures complied with European Union regulations for animal experiments (EU guideline 86/609/EEC).

### Experimental Design

*Protocol 1. Effect of Ang II Blockers on Hepatic I/R Injury and Liver Regeneration in Reduced-Size Orthotopic Liver Transplantation (ROLT) 24 Hours After Transplantation*

1. Sham (n = 6): Silk ligatures in the right suprarenal vein and hepatic artery.
2. ROLT (n = 12, 6 transplants): The liver was reduced by removal of the left lateral lobe and the 2 caudate lobes and was preserved with cold University of Wisconsin solution for 1 hour. ROLT was performed

according to Kamada's cuff technique.<sup>7</sup> Animals were killed 24 hours after transplantation for sample collection.

3. PC (n = 12, 6 transplants): To induce PC, the blood flow of the donor liver was interrupted by placing a clamp at the portal vein and hepatic artery for 10 minutes, and this was followed by reflow for 10 minutes. Livers then underwent ROLT, as described in group 2.<sup>7</sup>
4. ROLT + AT1R antagonist (n = 12, 6 transplants): This was performed just as for group 2, but an AT1R antagonist (losartan) was orally administered (5 mg/kg) 24 hours and 1 hour before the surgical procedure to both the donor and the recipient, respectively.<sup>13</sup>
5. ROLT + AT2R antagonist (n = 12, 6 transplants): This was performed just as for group 2, but an AT2R antagonist (PD123319) was intravenously administered (30 mg/kg) to the donor 25 minutes before excision and to the recipient just after the transplant.<sup>19</sup>
6. ROLT + ACE inhibitor (n = 12, 6 transplants): This was performed just as for group 2, but an ACE inhibitor (captopril) was orally administered (100 mg/kg) 24 hours and 1 hour before the surgical procedure to both the donor and the recipient.<sup>13</sup>

### *Protocol 2. Role of BK in the Effects of Ang II Blockers on Hepatic I/R Injury and Liver Regeneration in ROLT 24 Hours After Transplantation*

7. ROLT + ACE inhibitor + BK receptor antagonist (n = 12, 6 transplants): This was performed just as for group 2, but an ACE inhibitor (captopril) was orally administered (100 mg/kg) 24 hours and 1 hour before the surgical procedure to both the donor and the recipient,<sup>13</sup> and a BK2 receptor antagonist (HOE140) was subcutaneously administered (0.5 mg/kg) 1 hour before and during the surgical procedure to the recipient alone.<sup>19</sup>
8. ROLT + BK receptor antagonist (n = 12, 6 transplants): This was performed just as for group 2, but a BK2 receptor antagonist (HOE140) was subcutaneously administered (0.5 mg/kg) 1 hour before and during the surgical procedure to the recipient alone.<sup>19</sup>
9. ROLT + AT1R antagonist + AT2R antagonist + BK receptor antagonist (n = 12, 6 transplants): This was performed just as for group 4, but an AT2R antagonist (PD123319) was intravenously administered (30 mg/kg) to the donor 25 minutes before excision and to the recipient just after the transplant,<sup>19</sup> and a BK2 receptor antagonist (HOE140) was subcutaneously administered (0.5 mg/kg) 1 hour before and during the surgical procedure to the recipient alone.<sup>19</sup>

Control experiments using the vehicle (saline solution) were carried out for each drug.

## Sample Collection and Processing

All samples were collected 24 hours after completion of the surgical procedure. Samples for biochemical and molecular biology testing were frozen with dry ice, and samples for histological studies were placed in paraformaldehyde.

## Biochemical Determinations

Ang II, BK, transaminase, hepatocyte growth factor (HGF), and transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ; total TGF $\beta$  and active TGF $\beta$ ) levels were measured with the same protocol described elsewhere.<sup>7,18,19</sup> Note that TGF $\beta$  is stored in the cells in the latent form, which consists of the mature TGF $\beta$ , the TGF $\beta$  binding protein, and the latency-associated peptide. When required, the latent form is processed, and the mature TGF $\beta$  is released. The mature TGF $\beta$  alone is called active TGF $\beta$ . Therefore, when we mention total TGF $\beta$ , we are referring to the latent and active forms, and when we mention active TGF $\beta$ , we are referring to the mature form alone.<sup>20</sup>

## Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) for Angiotensinogen and ACE Messenger RNA (mRNA)

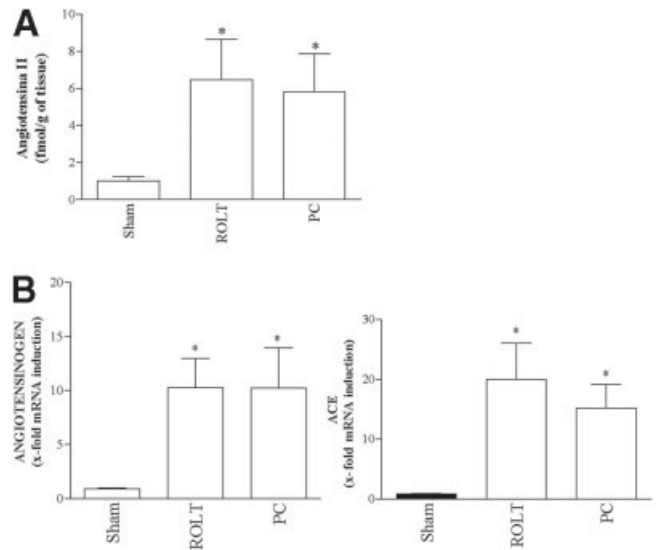
Quantitative real-time PCR analysis was performed with premade Assays-on-Demand TaqMan probes (Rn00593114\_m1 for angiotensinogen, Rn00561094\_m1 for ACE, and Rn00667869\_m1 for  $\beta$ -actin; Applied Biosystems). The TaqMan gene expression assay was performed according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems).

## Histology and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Labeling Index

To quantify the severity of hepatic injury, hematoxylin and eosin-stained sections were evaluated by a point-counting method on an ordinal scale.<sup>7</sup> Hepatic proliferation was assessed in liver biopsies with immunohistochemistry as previously described.<sup>7</sup> Data are expressed as the percentage of mitotic hepatocytes and PCNA-stained hepatocytes (brown nuclei) per total number of hepatocytes in 30 high-power fields. PCNA-positive hepatocytes are those with brown-stained nuclei, and those that have blue-stained nuclei are PCNA-negative hepatocytes.

## Statistics

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error. Statistical comparison was performed by variance analysis, and this was followed by the Student-Newman-Keuls test.  $P < 0.05$  was considered significant.



**Figure 1. Activation of RAS in ROLT 24 hours after transplantation.** (A) Angiotensin II levels and (B) angiotensinogen and ACE mRNA expression were measured in livers from the experimental groups shown in the graph ( $n = 12$  for each group, 6 transplants). All subjects in all groups were included in each measurement. PCR fluorescent signals for angiotensinogen and ACE were standardized to PCR fluorescent signals obtained from an endogenous reference ( $\beta$ -actin). Comparative and relative quantifications of angiotensinogen and ACE gene products normalized to  $\beta$ -actin and a control sham group were calculated with the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. \* $P < 0.05$  versus sham; +  $P < 0.05$  versus ROLT. Abbreviations: ACE, angiotensin converting enzyme; mRNA, messenger RNA; PC, preconditioning; PCR, polymerase chain reaction; ROLT, reduced-size orthotopic liver transplantation.

## RESULTS

### Effect of Ang II Blockers on Hepatic I/R Injury and Liver Regeneration in ROLT 24 Hours After Transplantation

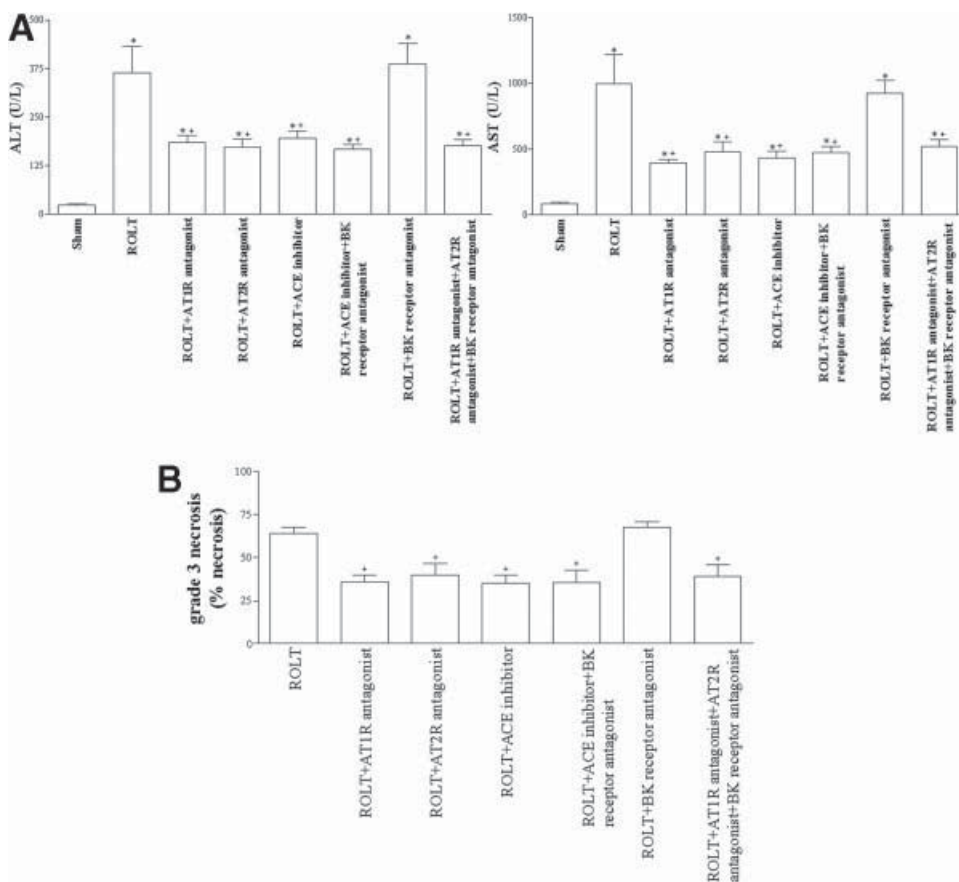
#### *Ang II, Angiotensinogen, and ACE Inhibitors in ROLT 24 Hours After Transplantation*

ROLT increased Ang II levels in the liver in comparison with the sham group (Fig. 1A). This increase in hepatic Ang II levels may be due to an increase in angiotensinogen and/or ACE mRNA expression (Fig. 1B). PC did not modify Ang II, angiotensinogen, or ACE levels in comparison with the ROLT group (Fig. 1A,B).

#### *Hepatic Injury and Liver Regeneration in ROLT 24 Hours After Reperfusion*

All Ang II blockers protected against hepatic injury. As shown in Fig. 2, ROLT + AT1R antagonist, ROLT + AT2R antagonist, and ROLT + ACE inhibitor reduced transaminase levels (Fig. 2A) and grade 3 necrosis (Fig. 2B) in comparison with the ROLT group.

None of these Ang II blockers had beneficial effects on liver regeneration. As shown in Fig. 3A, ROLT + AT1R antagonist, ROLT + AT2R antagonist, and ROLT + ACE inhibitor did not significantly affect the PCNA proliferation index in the liver in comparison with the ROLT



**Figure 2. Angiotensin II and BK in hepatic injury associated with ROLT 24 hours after transplantation. (A) Transaminases (ALT and AST) and (B) grade 3 necrosis were analyzed in plasma and livers, respectively, from the experimental groups shown in the graph (n = 12 for each group, 6 transplants). All subjects of all groups were included in each measurement. \*P < 0.05 versus sham; + P < 0.05 versus ROLT; °P < 0.05 versus ROLT + ACE inhibitor. Abbreviations: ACE, angiotensin converting enzyme; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; AT1R, angiotensin II type I receptor; AT2R, angiotensin II type II receptor; BK, bradykinin; ROLT, reduced-size orthotopic liver transplantation.**

group. It is well known that hepatocyte proliferation is controlled by both growth-promoting and growth-inhibiting factors, such as HGF and TGF $\beta$ , respectively.<sup>21,22</sup> As the PCNA results show, ROLT + AT1R antagonist, ROLT + AT2R antagonist, and ROLT + ACE inhibitor resulted in HGF and active TGF $\beta$  levels that were similar to those of the ROLT group (Fig. 3B). Total hepatic TGF $\beta$  (latent + active) levels were similar in all groups (data not shown).

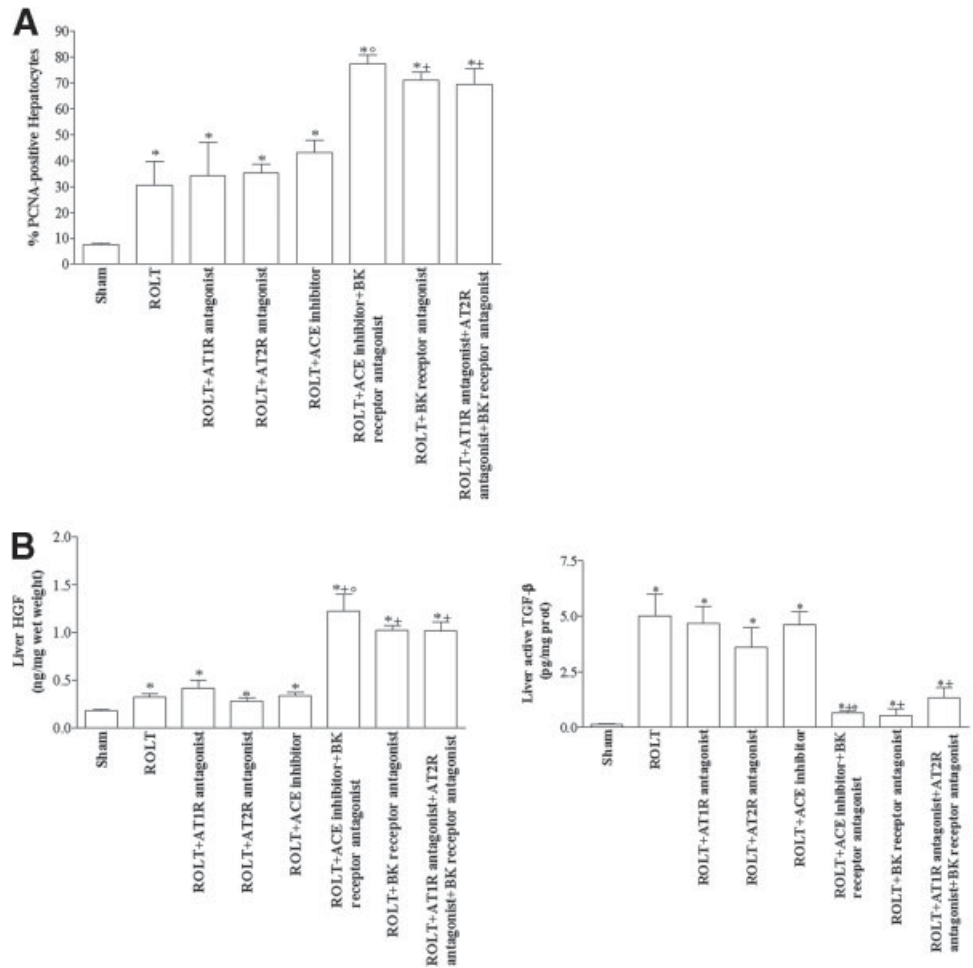
### Role of BK in the Beneficial Effects of ACE Inhibitors on Liver I/R Injury and Hepatic Regeneration in ROLT 24 Hours After Transplantation

Investigations were carried out to determine whether the beneficial effects of the ACE inhibitor on hepatic injury were due to the reduction in Ang II generation or increased BK levels. As expected, ROLT + ACE inhibitor and ROLT + ACE inhibitor + BK receptor antagonist increased BK levels in comparison with the ROLT group, whereas BK levels in the other treatments were unmodified (Fig. 4). As shown in Fig. 2, ROLT + ACE inhibitor + BK receptor antagonist resulted in hepatic injury parameters that were similar to those of the ROLT + ACE inhibitor group. Moreover, the histological study of the liver in the ROLT group revealed multifocal areas of coagulative necrosis randomly distributed throughout the hepatic parenchyma (Fig. 5A). In con-

trast, fewer and smaller areas of hepatocyte necrosis were observed in the ROLT + ACE inhibitor and ROLT + ACE inhibitor + BK receptor antagonist groups (Fig. 5B,C, respectively). However, ROLT + ACE inhibitor + BK receptor antagonist increased the proliferation index (Fig. 3) and the number of PCNA-positive hepatocytes (Figs. 5E,F) in comparison with the ROLT + ACE inhibitor group. This was associated with increased HGF levels and reduced TGF $\beta$  levels (Fig. 3). These results indicate that BK does not play a role in hepatic injury but is involved in liver regeneration. Moreover, ROLT + BK receptor antagonist resulted in parameters of hepatic injury that were similar to those of the ROLT group (Fig. 2) but improved liver regeneration. In other words, ROLT + BK receptor antagonist increased the PCNA index and HGF levels and reduced TGF $\beta$  levels in comparison with the ROLT group (Fig. 3). Finally, as we have previously shown, Ang II receptor antagonists improved only hepatic injury, but ROLT + AT1R antagonist + AT2R antagonist + BK receptor antagonist resulted in both a reduction of hepatic injury and an improvement of liver regeneration (Figs. 2 and 3).

### DISCUSSION

Ang II is believed to be involved in the pathogenesis of end-organ damage, including stroke, renal disease, and myocardial infarction, in both clinical and experimental situations.<sup>23-26</sup> Studies of the heart have indicated that



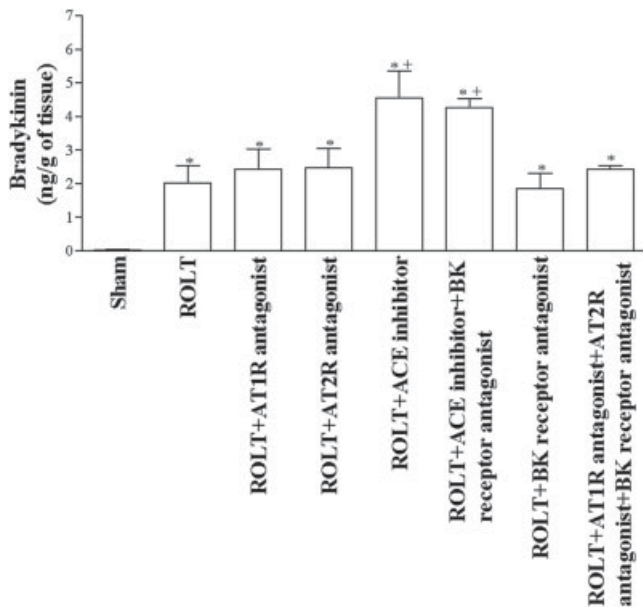
**Figure 3. Angiotensin II and BK in hepatic regeneration in ROLT 24 hours after transplantation. (A) The percentage of PCNA-positive hepatocytes and (B) HGF and active TGFβ levels were analyzed in livers from the experimental groups shown in the graph (n = 12 for each group, 6 transplants). All subjects in all groups were included in each measurement. \*P < 0.05 versus sham; + P < 0.05 versus ROLT; °P < 0.05 versus ROLT + ACE inhibitor. Abbreviations: ACE, angiotensin converting enzyme; AT1R, angiotensin II type I receptor; AT2R, angiotensin II type II receptor; BK, bradykinin; HGF, hepatocyte growth factor; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; ROLT, reduced-size orthotopic liver transplantation; TGFβ, transforming growth factor β.**

AT1R and AT2R generate opposite effects,<sup>27</sup> but this does not appear to occur in the liver. In fact, the beneficial effects of AT1R and AT2R on hepatic I/R injury have been reported in models of warm I/R and liver transplantation of non-reduced-size grafts.<sup>12-14</sup> Here we show Ang II generation in ROLT, which was associated with increased angiotensinogen and ACE mRNA expression. In addition, our results indicated that the use of Ang II blockers, such as AT1R antagonists, AT2R antagonists, and ACE inhibitors, could be a promising strategy for reducing hepatic injury associated with ROLT. The current study strongly suggests that Ang II blockers reduce hepatic injury. Further studies will be required to elucidate the mechanisms by which Ang II blockers improve hepatic injury after ROLT. One of the mechanisms through which Ang II blockers diminish hepatic injury after ROLT may be alteration of the hepatic microcirculation. Indeed, we know from the literature that the inhibition of AT1R improves hepatic microcirculation in a model of warm I/R in dogs.<sup>12</sup> Moreover, in a model of human hypertension, Ang II blockers ameliorated cardiac microcirculation.<sup>28</sup>

Different results have been reported for the effect of PC on Ang II.<sup>19,29-31</sup> Some studies of the heart indicate that PC inhibits the biological actions of Ang II,<sup>29</sup> whereas others studies show that Ang II contributes to

the benefits of PC.<sup>30,31</sup> A recent study by our group indicated a differential effect of PC on Ang II in an experimental model of warm ischemia, depending on the liver type: PC reduced Ang II generation in steatotic livers but not in nonsteatotic ones.<sup>19</sup> Previous studies by our group demonstrated that PC exerted beneficial effects on I/R injury and liver regeneration in ROLT.<sup>7</sup> Our results in the present study indicated that PC did not modify the expression of enzymes or precursors capable of generating Ang II. However, the lack of changes of expression of the RAS components does not rule out posttranscriptional regulation. However, what we have seen in the present study is that the beneficial effects of PC are not due to differences in Ang II generation.

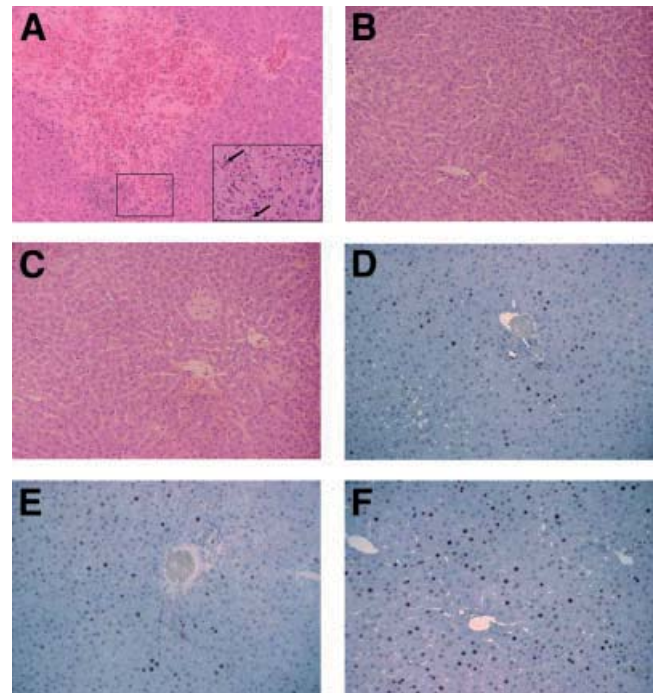
The beneficial effects of ACE inhibitors on liver regeneration after partial hepatectomy have been described previously.<sup>15,16</sup> Studies have reported that ACE inhibitors increase renal HGF mRNA and cardiac HGF concentrations in experimentally hypertensive rats<sup>32</sup> and that Ang II down-regulates HGF production in mesangial cells in a cultured model.<sup>33</sup> HGF and TGFβ are the most common markers of liver regeneration used in models of rat liver regeneration.<sup>18</sup> HGF is the most potent of liver mitogens.<sup>34</sup> On the other hand, TGFβ inhibits hepatocellular DNA synthesis both in cul-



**Figure 4. BK levels in ROLT 24 hours after transplantation. BK levels were analyzed in livers from the experimental groups shown in the graph (n = 12 for each group, 6 transplants). All subjects in all groups were included in each measurement. \*P < 0.05 versus sham; + P < 0.05 versus ROLT; °P < 0.05 versus ROLT + ACE inhibitor. Abbreviations: ACE, angiotensin converting enzyme; AT1R, angiotensin II type I receptor; AT2R, angiotensin II type II receptor; BK, bradykinin; ROLT, reduced-size orthotopic liver transplantation.**

ture<sup>35,36</sup> and in vivo.<sup>37</sup> It has been suggested that TGFβ may be the principal counter regulator of hepatocyte proliferation during regeneration.<sup>38</sup> Our results indicated that neither ACE inhibitors nor other Ang II blockers were capable of inducing hepatic regeneration in ROLT; ACE inhibitors did not modify either the PCNA or growth factor (HGF and TGFβ) results observed in the ROLT group without any treatment.

Here we have shown that BK does not play a role in hepatic injury associated with ROLT because ROLT + BK receptor antagonist did not reduce hepatic injury. It did, however, improve liver regeneration in comparison with the results recorded for the ROLT group. This improvement correlates with the increase in PCNA-positive hepatocytes, the increase in HGF levels, and the decrease in TGFβ levels observed in this group in comparison with the ROLT group without any treatment. On the other hand, all Ang II blockers had beneficial effects on hepatic injury but not on liver regeneration. ROLT + ACE inhibitor, ROLT + AT1R antagonist, and ROLT + AT2R antagonist all reduced the biochemical and histological parameters of hepatic injury but did not affect the hepatic regeneration parameters. Thus, the concomitant inhibition of BK and Ang II action could help to reduce hepatic injury and promote liver regeneration in ROLT because our results indicated that the combination of Ang II blockers and BK receptor antagonists had beneficial effects on both. In terms of good clinical outcomes, treatment with either Ang II blockers or BK2 receptors antagonists alone cannot



**Figure 5. Histological analysis of the liver. (A-C) Histological lesions and (D-F) immunocytochemical staining of proliferating cell nuclear antigen-positive hepatocytes. (A) ROLT: extensive and multifocal areas of coagulative necrosis of hepatocytes with hemorrhage and neutrophil infiltration. (B) ROLT + ACE inhibitor and (C) ROLT + ACE inhibitor + BK receptor antagonist: focal and small areas of hepatocyte necrosis with neutrophil infiltration [hematoxylin and eosin; original magnification, ×240 (original magnification, ×720, for the inset in part A)]. (D) ROLT and (E) ROLT + ACE inhibitor: lower positive cell number versus (F) ROLT + ACE inhibitor + BK receptor antagonist (original magnification, ×500). Abbreviations: ACE, angiotensin converting enzyme; BK, bradykinin; ROLT, reduced-size orthotopic liver transplantation.**

sufficiently improve the outcome of reduced-size liver transplantation because although Ang II blockers can reduce hepatic I/R injury and BK receptor antagonists can promote liver regeneration, neither one does both at the same time. Consequently, it may be of clinical interest to administer both the Ang II blockers and the BK receptor antagonists together.

ACE inhibitors are widely used in clinical practice.<sup>39,40</sup> However, hepatotoxicity and cholestatic liver diseases have been reported under ACE inhibition.<sup>41,42</sup> Taking these observations into account, along with the fact that AT1R antagonists and AT2R antagonists were as effective as ACE inhibitors in terms of hepatic injury, we propose that the most suitable strategy to be applied in ROLT to reduce hepatic injury and increase liver regeneration is the combination of Ang II receptor antagonists together with BK receptor antagonists.

#### ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Robin Rycroft at the Language Advisory Service of the University of Barcelona for revising the English text. The authors thank Emma Puig-Oriol and Llorenç Quintó (Epidemiology and Biostatistics



Unit, University of Barcelona) for their help with the statistical analyses. Carmen Peralta participates in the Programa de Esatabilització d'Investigadors de la Direcció d'Estratègia i Coordinació del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya.

## REFERENCES

- Uchiyama H, Yanaga K, Nishizaki T, Soejima Y, Yoshizumi T, Sugimachi K. Effects of deletion variant of hepatocyte growth factor on reduced-size liver transplantation in rats. *Transplantation* 1999;68:39-44.
- Malagó M, Rogiers X, Broelsch CE. Reduced-size hepatic allografts. *Annu Rev Med* 1995;46:507-512.
- Tojimbara T, Fuchinoue S, Nakajima I, Koike T, Abe M, Tsugita T, et al. Analysis of postoperative liver function of donors in living-related liver transplantation: comparison of the type of donor hepatectomy. *Transplantation* 1998;66:1035-1039.
- Kawasaki S, Makuuchi M, Matsunami H, Hashikura Y, Ikegami T, Nakazawa Y, et al. Living related liver transplantation in adults. *Ann Surg* 1998;227:269-274.
- Schiano TD, Kim-Schluger L, Gondolesi G, Miller CM. Adult living donor liver transplantation: the hepatologist's perspective. *Hepatology* 2001;33:3-9.
- Olthoff KM. Hepatic regeneration in living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2003;9:S35-S41.
- 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.
- Portugal V, García-Alonso I, Barceló P, Méndez J. Effect of allopurinol, folic acid, SOD and cyclosporine A on ischemic liver regeneration. *Eur Surg Res* 1995;27:69-76.
- Selzner M, Camargo CA, Clavien PA. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6. *Hepatology* 1999;30:469-475.
- Foschi D, Castoldi L, Lesma A, Musazzi M, Benevento A, Trabucchi E. Effects of ischaemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur J Surg* 1993;159:393-398.
- Man K, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Fung PC, Liang TB, et al. Graft injury in relation to graft size in right lobe live donor liver transplantation: a study of hepatic sinusoidal injury in correlation with portal hemodynamics and intragraft gene expression. *Ann Surg* 2003;237:256-264.
- Masuko H, Jin MB, Horiuchi H, Suzuki T, Taniguchi M, Shimamura T, et al. Protective effect of angiotensin II type I receptor antagonist, CV-11974, on ischemia and reperfusion injury of the liver. *Transplantation* 2001;71:1034-1039.
- Guo L, Richardson KS, Tucker LM, Doll MA, Hein DW, Arteel GE. Role of the renin-angiotensin system in hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *Hepatology* 2004;40:583-589.
- Anthuber M, Farkas S, Rihl M, Menger MD, Schildberg FW, Jauch KW, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition by enalapril: a novel approach to reduce ischemia/reperfusion damage after experimental liver transplantation. *Hepatology* 1997;25:648-651.
- Ramalho FS, Ramalho LN, Castro-e-Silva Júnior O, Zucoloto S, Corrêa FM. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on liver regeneration in rats. *Hepato-gastroenterology* 2002;49:1347-1351.
- Yayama K, Sugiyama K, Miyagi R, Okamoto H. Angiotensin-converting enzyme inhibitor enhances liver regeneration following partial hepatectomy: involvement of bradykinin B2 and angiotensin AT1 receptors. *Biol Pharm Bull* 2007;30:591-594.
- Freise H, Palmes D, Spiegel HU. Inhibition of angiotensin-converting enzyme reduces rat liver reperfusion injury via bradykinin-2-receptor. *J Surg Res* 2006;134:231-237.
- Franco-Gou R, Roselló-Catafau J, Casillas-Ramirez A, Massip-Salcedo M, Rimola A, Calvo N, et al. How ischaemic preconditioning protects small liver grafts. *J Pathol* 2006;208:62-73.
- Casillas-Ramirez A, Amine-Zaouali M, Massip-Salcedo M, Padriusa-Altés S, Bintanel-Morcillo M, Ramalho F, et al. Inhibition of angiotensin II action protects rat steatotic livers against ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 2008;36:1256-1266.
- Roth-Eichhorn S, Kühl K, Gressner AM. Subcellular localization of (latent) transforming growth factor beta and the latent TGF-beta binding protein in rat hepatocytes and hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998;28:1588-1596.
- Masson S, Daveau M, Hiron M, Lyoumi S, Lebreton JP, Ténière P, et al. Differential regenerative response and expression of growth factors following hepatectomy of variable extent in rats. *Liver* 1999;19:312-317.
- Enami Y, Kato H, Murakami M, Fujioka T, Aoki T, Niiya T, et al. Anti-transforming growth factor-beta1 antibody transiently enhances DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:250-258.
- Masson GM, Casi C, Matsunaga M, Page IH. Hypertensive vascular disease produced by homologous renin. *Science* 1964;145:178-180.
- Gavras H, Lever AF, Brown JJ, Macadam RF, Robertson JI. Acute renal failure, tubular necrosis, and myocardial infarction induced in the rabbit by intravenous angiotensin II. *Lancet* 1971;2:19-22.
- Brunner HR, Laragh JH, Baer L, Newton MA, Goodwin FT, Krakoff LR, et al. Essential hypertension: renin and aldosterone, heart attack and stroke. *N Engl J Med* 1972;286:441-449.
- Volpe M, Camargo MJ, Mueller FB, Campbell WG Jr, Sealey JE, Pecker MS, et al. Relation of plasma renin to end organ damage and to protection of K + feeding in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1990;15:318-326.
- Yang Z, Bove CM, French BA, Epstein FH, Berr SS, DiMaria JM, et al. Angiotensin II type 2 receptor overexpression preserves left ventricular function after myocardial infarction. *Circulation* 2002;2:106-111.
- Hinoi T, Tomohiro Y, Kajiwara S, Matsuo S, Fujimoto Y, Yamamoto S, et al. Telmisartan, an angiotensin II type I receptor blocker, improves coronary microcirculation and insulin resistance among essential hypertensive patients without left ventricular hypertrophy. *Hypertens Res* 2008;31:615-622.
- Xiao XH, Allen DG. The role of endogenous angiotensin II in ischaemia, reperfusion and preconditioning of the isolated rat heart. *Pflugers Arch* 2003;445:643-650.
- Diaz RJ, Wilson GJ. Selective blockade of AT1 angiotensin II receptors abolishes ischemic preconditioning in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:129-139.
- Randall MD, Gardiner SM, Bennett T. Enhanced cardiac preconditioning in the isolated heart of the transgenic ((mREN-2) 27) hypertensive rat. *Cardiovasc Res* 1997;33:400-409.
- Nakano N, Moriguchi A, Morishita R, Kida I, Tomita N, Matsumoto K, et al. Role of angiotensin II in the regulation of a novel vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), in experimental hypertensive rats. *Hypertension* 1997;30:1448-1454.
- Yo Y, Morishita R, Yamamoto K, Tomita N, Kida I, Hayashi S, et al. Actions of hepatocyte growth factor as a local modulator in the kidney: potential role in pathogenesis of renal disease. *Kidney Int* 1998;53:50-58.
- Fausto N, Laird AD, Webber EM. Liver regeneration. 2.

- Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995;9:1527-1536.
35. Nakamura A, Tomita Y, Hirai R, Yamaoka K, Kaji K, Ichihara A. Inhibitory effect of transforming growth factor-B on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;133:1042-1050.
  36. McMahon JB, Richards WL, del Campo AA, Song MH, Thorgeirsson SS. Differential effects of transforming growth factor-B on proliferation of normal and malignant rat epithelial cells in culture. *Cancer Res* 1986;46:4665-4671.
  37. Russell WE, Coffey RJ, Quellette AJ, Moses HL. Type/3 transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5126-5130.
  38. Fausto N, Mead JE, Gruppuso PA, Braun L. TGF- $\beta$ 3 in liver development, regeneration and carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1990;593:231-242.
  39. ISIS-4: a randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet* 1995;345:669-685.
  40. Rutherford JD, Pfeffer MA, Moyé LA, Davis BR, Flaker GC, Kowey PR, et al. Effects of captopril on ischemic events after myocardial infarction. Results of the Survival and Ventricular Enlargement trial. SAVE Investigators. *Circulation* 1994;90:1731-1738.
  41. Jeserich M, Ihling C, Allgaier HP, Berg PA, Heilmann C. Acute liver failure due to enalapril. *Herz* 2000;25:689-693.
  42. Romero-Gómez M, Miralles EJ, García Díaz E, Robles A, Suárez E, Castro M. Hepatotoxicity induced by fosinopril. *J Hepatol* 2001;35:309-310.

## ANNEX 3





AJT	ajjt_3092	Dispatch: March 5, 2010	CE: AFL
Journal	MSP No.	No. of pages: 11	PE: Catherine

American Journal of Transplantation 2010; 10: 1–11  
Wiley Periodicals Inc.

© 2010 The Authors  
Journal compilation © 2010 The American Society of  
Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons

doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03092.x

# Matrix Metalloproteinase 2 in Reduced-Size Liver Transplantation: Beyond the Matrix

S. Padrissa-Altés<sup>a,†</sup>, M. A. Zaouali<sup>a,†</sup>,  
R. Franco-Gou<sup>a</sup>, R. Bartrons<sup>b</sup>, O. Boillot<sup>c</sup>,  
A. Rimola<sup>d,e</sup>, V. Arroyo<sup>d,e</sup>, J. Rodés<sup>d,e</sup>,  
C. Peralta<sup>d,e</sup> and J. Roselló-Catafau<sup>a,d,e,\*</sup>

<sup>a</sup>Experimental Hepatic Ischemia-Reperfusion Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain

<sup>b</sup>Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Ciències Fisiològiques, Campus de Bellvitge, IDIBELL-Universitat de Barcelona, L'Hospitalet, Spain

<sup>c</sup>Unit of Hepatic Transplantation, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France

<sup>d</sup>Unitat de Transplantament de fetge i viabilitat de l'empelt, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain

<sup>e</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas Esther Koplowitz, CIBER-EHD, Instituto de Salud Carlos III, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain

\*Corresponding author: Dr. J. Roselló-Catafau,  
joan.rosello@iibb.csic.es

†S. Padrissa-Altés and MA Zaouali contributed equally to this study.

**We studied the contribution of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) to the beneficial effects of preconditioning (PC) in reduced-size orthotopic liver transplantation (ROLT). We also examined the role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and whether it regulates MMP2 in these conditions. Animals were subjected to ROLT with or without PC and pharmacological modulation, and liver tissue samples were then analyzed. We found that MMP2, but not MMP9, is involved in the beneficial effects of PC in ROLT. MMP2 reduced hepatic injury and enhanced liver regeneration. Moreover, inhibition of MMP2 in PC reduced animal survival after transplantation. JNK inhibition in the PC group decreased hepatic injury and enhanced liver regeneration. Furthermore, JNK upregulated MMP2 in PC. In addition, we showed that Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 2 (TIMP2) was also upregulated in PC and that JNK modulation also altered its levels in ROLT and PC. Our results open up new possibilities for therapeutic treatments to reduce I/R injury and increase liver regeneration after ROLT, which are the main limitations in living-donor transplantation.**

**Key words:** Ischemic preconditioning, liver transplantation, liver regeneration, matrix metalloproteinase, MAP kinase, TIMP

**Received 13 October 2009, revised 28 January 2010 and accepted for publication 12 February 2010**

## Introduction

Shortage of donor organs hinders the widespread application of liver transplantation in patients with end-stage liver disease (1–3), although living-related liver transplantation has attenuated this deficit (1,4,5). The main limitation of this approach is graft size disparity, since reduced-size liver grafts must regenerate rapidly to ensure normal function and patient survival (6–8). In addition, ischemia-reperfusion (I/R), which is inevitable in liver transplantation, reduces liver regeneration after hepatectomy (9,10). Little is known about the mechanisms underlying the dysfunction and failure of reduced-size liver grafts (11).

Matrix metalloproteinases (MMP) constitute a family of zinc-dependent enzymes with more than 25 members. Several studies reported the role of MMPs in different physiological and pathological conditions in regards to their ability to hydrolyze extracellular matrix (ECM) proteins. However, new functions of MMPs have been discovered as a result of their proteolytic action on non-ECM proteins (12). Here we focus on MMP-2 and MMP-9, which are members of the gelatinase class in the MMP family (12). Previous studies implicated MMP2 and MMP9 in the effects of liver transplantation in humans (13,14). Several studies in rat showed an increase in MMP2 and MMP9 expression and activity in models of experimental hepatic I/R (15–18). Furthermore, Shirahane et al. reported that an MMP inhibitor decreased liver injury after I/R (19). Studies in models of liver regeneration in rat have shown activation of MMPs after hepatectomy (20,21). Moreover, a study on human liver regeneration by Fuke et al. implicated MMPs in liver regeneration after hepatectomy (22).

Ischemic preconditioning (PC), a short period of ischemia followed by a brief period of reperfusion before a sustained ischemic insult, improves hepatic regeneration and reduces liver injury in experimental models of reduced-size liver transplantation (23,24). Only two studies, in brain and heart, implicate MMPs in the beneficial effects of PC

## 1 **Padrissa-Altés et al.**

2 (25,26). However, the role of MMPs in PC in the liver is  
3 unknown. We hypothesize that MMPs participate in PC in  
4 ROLT.

5  
6 c-Jun N-terminal kinase (JNK) is a stress-activated protein  
7 kinase of the MAPK family (27). It is rapidly activated in  
8 response to physical stresses such as hypoxia, ultraviolet  
9 radiation and changes in pH, as well as inflammatory medi-  
10 ators and pathogen-derived antigens (28). JNK-dependent  
11 phosphorylation of the transcription factor c-Jun/AP-1 pro-  
12 motes *de novo* gene expression (29). JNK is activated after  
13 liver transplantation in the rat (29–35). Moreover, JNK is in-  
14 duced during liver regeneration (36–39). Specifically, Zhong  
15 et al. report defective liver regeneration after ROLT, associ-  
16 ated with JNK inhibition (39). Furthermore, JNK is involved  
17 in the regulation of MMPs in cell culture (40,41).

18  
19 Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) are  
20 one of the major regulators of MMP activity. TIMPs are a  
21 family of four distinct proteins (TIMP-1, 2, 3 and 4). They  
22 are specific endogenous inhibitors of MMP activity char-  
23 acterized by their very high affinity binding to MMPs (42).  
24 TIMP2 specifically inhibits MT1-MMP (43) and has a dual  
25 action on MMP2. A small amount of TIMP2 mediates MT1-  
26 MMP-induced proteolytic activation of MMP2 (44), while  
27 higher concentrations inhibit MMP2 activity (45). In a study  
28 of liver transplantation, TIMP2 levels in plasma significantly  
29 decreased after orthotopic liver transplantation (13). In ad-  
30 dition, TIMP2 was upregulated in the recovery phase after  
31 I/R when tissue regeneration takes place (16). However,  
32 no study on ROLT has examined the role of this protein to  
33 date.

34  
35 Finally, Urokinase plasminogen activator (uPA) is a glyco-  
36 protein responsible for the conversion of plasminogen to  
37 plasmin (46). Plasmin plays an important role in the activa-  
38 tion of different MMPs and TGF- $\beta$  (47). In addition, previous  
39 studies showed that uPA can activate hepatocyte growth  
40 factor (HGF) (48,49). Recent reports showed that uPA ac-  
41 tivity increases within 1–5 min after partial hepatectomy in  
42 rats (48,50).

43  
44 Here we examined: (a) the role of MMP2 and MMP9 in the  
45 beneficial effects of PC in ROLT; (b) the role of JNK in the  
46 beneficial effects of PC in ROLT; (c) whether MMP2 is regu-  
47 lated by JNK in our conditions; and (d) whether TIMP2 and  
48 uPA are also involved in the beneficial effects of PC after  
49 ROLT. If PC was understood at the molecular level, it might  
50 be possible to develop new pharmacological treatments to  
51 improve the clinical outcome of ROLT.

## 54 **Material and Methods**

### 57 **Experimental animals**

58 Male Sprague-Dawley rats (200–250 g) were used as donors and recipients.  
59 All animals were anesthetized with isoflurane. Research procedures com-

plied with European Union regulations for animal experiments (EU guideline 86/609/EEC).

### **Experimental design**

*Protocol 1. Role of MMPs in the benefits of PC in hepatic I/R injury and liver regeneration in ROLT.*

- (1) Sham (n = 6): silk ligatures in the right suprarenal vein, and hepatic artery.
- (2) Reduced-size orthotopic liver transplantation (ROLT) (n = 6): liver was reduced by removing the left lateral lobe and the two caudate lobes and preserved with cold University of Wisconsin (UW) solution for 1h. ROLT was performed according to Kamada's cuff technique without arterialization (23). The anhepatic phase duration was of 16–20 min. Animals were killed after 24 h of reperfusion for sample collection.
- (3) Ischemic PC (n = 6): To induce PC, the hepatic inflow to the median and left lobes was occluded with microvascular clamps for 10 min, followed by a reflow for 10 min. Livers then underwent ROLT, as described in group 2 (23).
- (4) PC+MMP2 Inhibitor (n = 6): Like group 3 but with MMP2 Inhibitor I (Calbiochem, Germany) administered (2  $\mu$ g/kg i. v.) to the donor 25 min before excision and to the recipient just after transplant (51).

*Protocol 2. Role of JNK in the upregulation of MMP2 in the mechanisms of PC in ROLT.*

- (5) PC+ JNK Inhibitor (n = 6): Like group 3 but with JNK Inhibitor, SP600125 (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), administered (6 mg/kg s. c.) to the donor 1 h before transplantation and to the recipient just after transplantation (52).
- (6) ROLT+ JNK Activator (n = 6): Like group 2 but with JNK Activator, Anisomycin (Sigma-Aldrich), administered (0.1 mg/kg i. p.) to the donor 24 h before transplantation and to the recipient just after transplantation (52).
- (7) ROLT + NO (n = 6): like group 2 but with spermine NONOate (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), administered (10 mg/kg i. v.) 5 min before the livers were flushed with UW solution (23).
- (8) PC+ NAME (n = 6): Like group 3 but with a NO synthesis inhibitor, N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (NAME) (Sigma Chemical, St. Louis, MO), administered 10 mM when the liver grafts were recovered, and 20 mg/kg i. v. just after reperfusion (23).

### **Sample collection and processing**

All samples were collected 24 h after completion of the surgical procedure. Samples for biochemical and molecular biology testing were frozen with dry ice and samples for histological studies were immersed in paraformaldehyde.

### **Biochemical determinations**

*Transaminase assay.* Hepatic injury was evaluated by measurement of transaminase in plasma using a commercial kit from Boehringer Mannheim (Munich, Germany) (23,24).

*Assay for HGF.* Hepatic HGF levels were measured by the enzyme-linked immunosorbent technique (B-Bridge International, Inc., Mountain View, CA) (23).

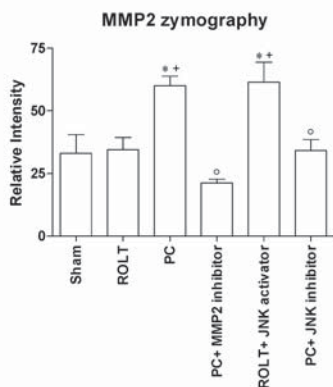
*Assay for TGF $\beta$ .* Hepatic total and active TGF $\beta$  levels were measured as previously described with a commercial kit from BLKine (BLK Diagnostics, Barcelona, España) (23,24).

### **Zymography**

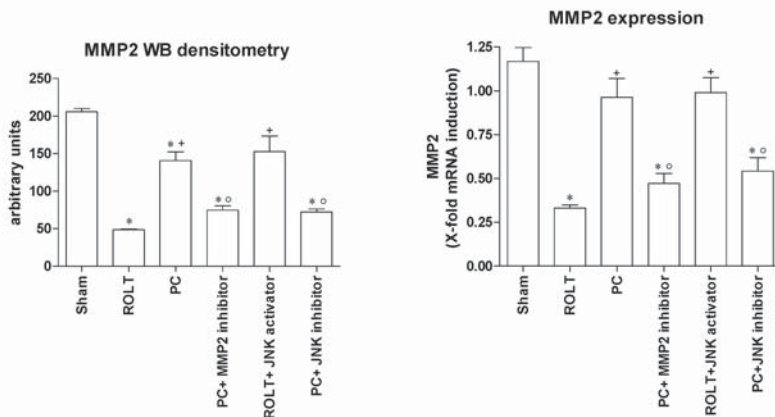
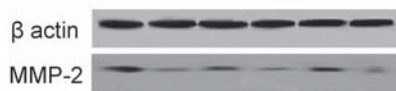
Frozen tissue samples were homogenized with lysis buffer and centrifuged as described elsewhere (53). Supernatants were used for extraction of

Matrix Metalloproteinase 2 in ROLT

A MMP2 protein activity



B MMP2 protein and mRNA levels



**Figure 1: Matrix metalloproteinase 2 in the benefits of PC in ROLT.** MMP2 protein activity levels (A) and MMP2 protein and mRNA expression levels (B) were measured in liver from the experimental groups shown in the graph (n = 6 for each group). (A) Zymograms with the use of gelatin as a substrate were performed with the use of the liver tissue 24 h after transplantation of all experimental groups in the graph Gelatinase A and B serve as standards. (B) Representative immunoblot analysis and densitometric analysis for protein levels. PCR fluorescent signals for MMP2 were standardized to PCR fluorescent signals obtained from an endogenous reference ( $\beta$ -Actin). Comparative and relative quantifications of MMP2 gene products normalized to  $\beta$ -Actin and control Sham group were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. \*p < 0.05 versus Sham; +p < 0.05 versus ROLT; <sup>o</sup>p < 0.05 versus PC.

gelatinolytic activity with gelatin sepharose (Gelatin-Sepharose 4B, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), as described elsewhere (53). Extracted liver samples were used to perform gelatin zymography using gelatinase zymography standards (Chemicon, Billerica, MA), as described elsewhere (16,53).

**Western blotting of MMP2, TIMP2, uPA and  $\beta$ -actin** Realized as previously described (52) using the following antibodies: MMP2 (Chemicon), TIMP2 (Abcam, UK), uPA (Santa Cruz Technology), and  $\beta$ -Actin(Sigma).

**Quantitative real-time PCR for MMP2, MMP9, TIMP2 and uPA messenger RNA**

Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis was performed using premade Assays-on-Demand TaqMan probes (Rn02532334\_s1 for MMP2, Rn00579162\_m1 for MMP9, Rn00573232\_m1 for TIMP2, Rn00695755\_m1 for uPA, and Rn00667869\_ml for  $\beta$ -actin)(Applied Biosystems). The TaqMan gene expression assay was performed according to the manufacturer’s protocol (Applied Biosystems).

**Histology and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) labeling index**

To quantify the severity of hepatic injury, hematoxylin and eosin-stained sections were evaluated by a point-counting method on an ordinal scale (23).

Hepatic proliferation was assessed in liver biopsies by immunohistochemistry as previously described (23). Data are expressed as the percentage of mitotic hepatocytes and PCNA-stained hepatocytes (brown nuclei) per total number of hepatocytes in 30 high-power fields. Hepatocytes with brown-stained nuclei are PCNA-positive, and those with blue-stained nuclei are PCNA-negative.

**Statistics**

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error. Statistical comparison was performed by variance analysis, followed by the Student–Newman–Keuls test. p < 0.05 was considered significant.

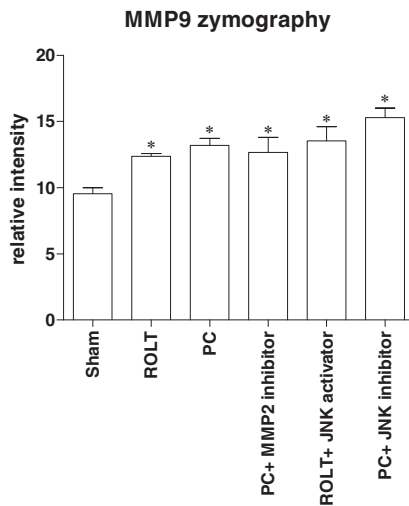
**Results**

**MMPs in the benefits of PC in ROLT**

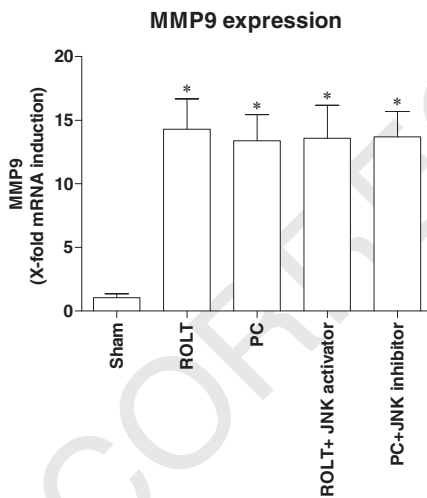
PC increased MMP2 protein activity when compared to the ROLT group (Figure 1A). Sham and ROLT group showed similar activity levels of MMP2 (Figure 1A). Moreover, MMP2 protein levels and mRNA expression was higher in the PC group than in the ROLT group (Figure 1B). However, in this case, MMP2 protein levels

1 **Padrissa-Altés et al.**

2 **A MMP9 protein activity**



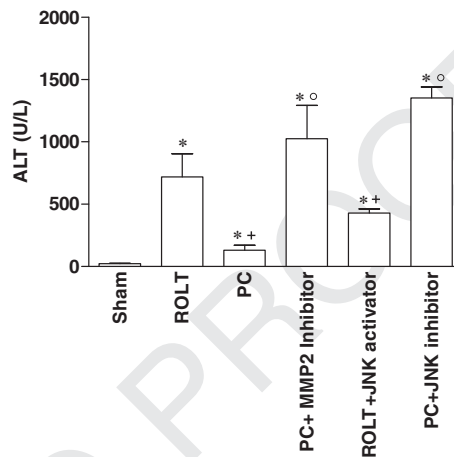
4 **B MMP9 mRNA levels**



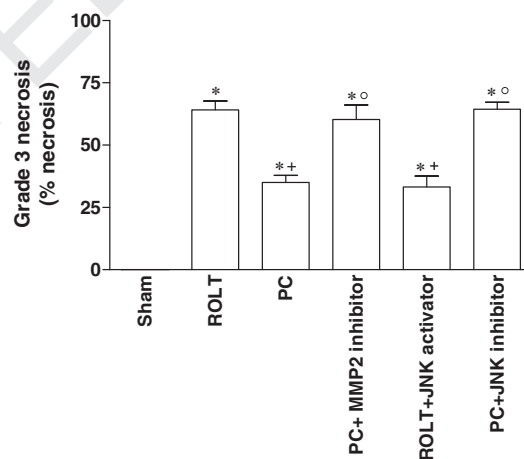
6 **Figure 2: Matrix metalloproteinase 9 in the benefits of PC in ROLT.** MMP9 protein activity levels (A) and MMP9 mRNA expression levels (B) were measured in liver from the experimental groups shown in the graph (n = 6 for each group). (A) Zymograms with the use of gelatin as a substrate were performed with the use of the liver tissue 24 h after transplantation of all experimental groups in the graph Gelatinase A and B serve as standards. (B) PCR fluorescent signals for MMP9 were standardized to PCR fluorescent signals obtained from an endogenous reference ( $\beta$ -Actin). Comparative and relative quantifications of MMP9 gene products normalized to  $\beta$ -Actin and control Sham group were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. \*p < 0.05 versus Sham; +p < 0.05 versus ROLT, °p < 0.05 versus PC.

7 and mRNA expression in the ROLT group was lower than in the Sham group (Figure 1B). All groups showed similar activity levels of MMP-9 protein (Figure 2A). In contrast, MMP9 mRNA expression was higher in the ROLT and PC groups than in the Sham group (Figure 2B).

8 **A Transaminase levels**



9 **B Grade 3 necrosis levels**



10 **Figure 3: MMP2 and JNK in hepatic injury associated with ROLT 24 h after transplant.** Transaminase (A) and grade 3 of necrosis (B) were analyzed in plasma and liver, respectively, from the experimental groups shown in the graph (n = 6 for each group). \*p < 0.05 versus Sham; +p < 0.05 versus ROLT; °p < 0.05 versus PC.

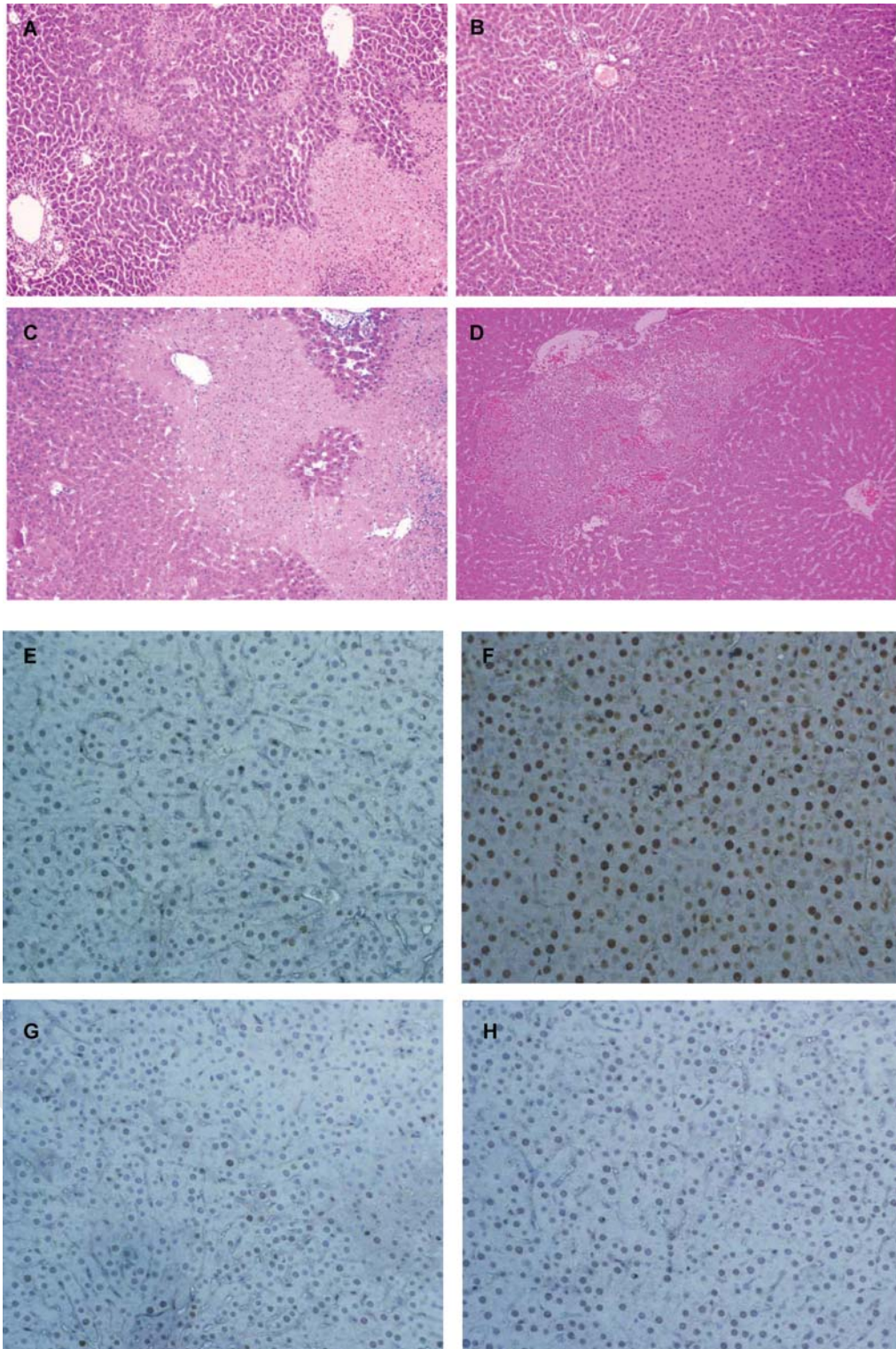
11 The use of an MMP2 inhibitor increased liver injury in PC (PC+ MMP2 inhibitor group) when compared to the PC group. As shown in Figure 3, PC+ MMP2 inhibitor resulted in ALT levels (Figure 3A) and grade 3 necrosis (Figure 3B) similar to those of the ROLT group. This can also be observed in Figure 4, as revealed by histological analysis.

12 MMP2 inhibitor reduced liver regeneration when administered to the PC group. As shown in Figures 4 and 5, PC+ MMP2 inhibitor reduced PCNA proliferation index levels when compared to the PC group (Figures 4 and 5A). It is well known that hepatocyte proliferation is controlled by both growth-promoting and growth-inhibiting factors, such



1

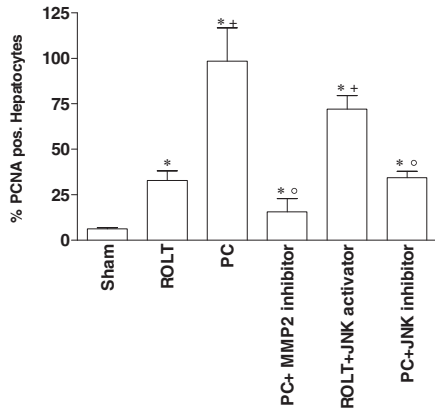
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59



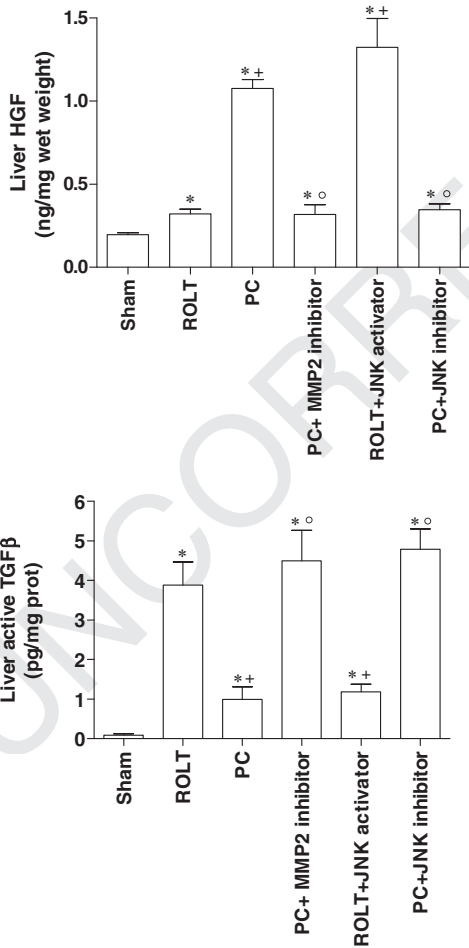
**Figure 4: Histological analysis of the liver.** Histological lesions (A–D) and immunocytochemical staining of PCNA-positive hepatocytes (E–H). (A) ROLT; (C) PC+ MMP2 inhibitor; (D) PC+ JNK inhibitor: extensive and multifocal areas of coagulative necrosis of hepatocytes with hemorrhage and neutrophil infiltration; (B) PC: focal and small areas of hepatocyte necrosis with neutrophil infiltration. (E) ROLT; (G) PC +MMP2 inhibitor; (H) PC+ JNK inhibitor: lower positive cells number than (F) PC. (For hematoxylin and eosin staining: Original magnification  $\times 240$ , for PCNA staining: Original magnification  $\times 500$ ).

1 **Padrissa-Altés et al.**

2 **A Percentage of PCNA-positive hepatocytes**

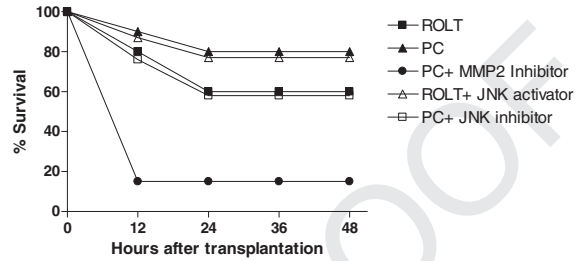


3 **B HGF and TGFβ levels**



4 **Figure 5: MMP2 and JNK in hepatic regeneration in ROLT 24 h after transplant.** PCNA (%) positive hepatocytes (A) and HGF and active TGFβ levels (B) were analyzed in livers from the experimental groups shown in the graph (n = 6 for each group). \*p < 0.05 versus Sham; +p < 0.05 versus ROLT; °p < 0.05 versus PC.

5 **Survival of recipients at 2 days after transplantation**



6 **Figure 6: Survival of recipients at 2 days after transplantation.**

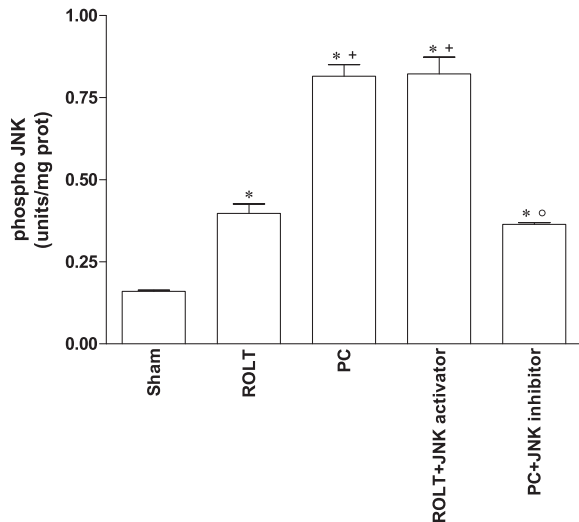
7 Recipients that underwent ROLT (■), recipients that underwent PC prior to ROLT (▲), recipients received an MMP2 inhibitor dose before PC and ROLT (●), recipients that received an JNK activator prior to ROLT (Δ), and recipients that received an JNK inhibitor prior PC and ROLT (□).

8 as the HGF and transforming growth factor (TGFβ), respectively (54,55). Similar to PCNA, PC+ MMP2 inhibitor resulted in HGF levels and TGFβ levels (Figure 5B) similar to those of the ROLT group. Total hepatic TGFβ (latent + active) levels were similar in all groups (data not shown). In addition, the percentage of survival in the PC+ MMP2 inhibitor group 24 h after transplantation was approximately 15% (Figure 6). On the other hand, the percentages of survival of the ROLT and PC group at the same time point were 60% and 80%, respectively (Figure 6).

9 **Regulation of MMP2 in PC after ROLT**

10 **Role of JNK in the upregulation of MMP2 in PC after ROLT** ROLT group showed higher JNK levels than the Sham group (Figure 7). In addition, PC group had higher

11 **JNK protein levels**



12 **Figure 7: JNK levels in ROLT 24 h after transplant.** JNK levels were analyzed in livers from the experimental groups shown in the graph (n = 6 for each group). \*p < 0.05 versus Sham; +p < 0.05 versus ROLT; °p < 0.05 versus PC.

## Matrix Metalloproteinase 2 in ROLT

JNK levels than the ROLT group (Figure 7). Considering previous studies that reported JNK to be involved in the regulation of MMPs in cell culture (40,41), investigations were carried out to determine if this was the case for our model. As shown in Figure 1A, ROLT+JNK activator group showed similar MMP2 activity levels to the PC group. Also, PC+JNK inhibitor gave similar MMP2 activity levels to the ROLT group (Figure 1A). Equivalently, MMP2 protein and mRNA expression levels showed the same pattern (Figure 1B). As to hepatic injury, ROLT+JNK activator group showed ALT levels (Figure 3A) and grade 3 necrosis (Figure 3B) similar to the PC group, while PC+JNK inhibitor group showed ALT levels (Figure 3A) and grade 3 necrosis (Figure 3B) similar to those of the ROLT group. This can also be observed in Figure 4 by histological analysis. Liver regeneration studies revealed that ROLT+JNK activator group and PC group had similar levels of hepatic regeneration, as indicated by the PCNA proliferation index (Figure 5A), and HGF and TGF $\beta$  (Figure 5B) levels. PC+JNK inhibitor group showed similar liver regeneration levels to those of the ROLT group, as illustrated by the experiments described above (Figures 4 and 5). JNK levels were also measured for ROLT+ JNK activator and PC+ JNK inhibitor to check that they respectively activated and inhibited JNK. PC+ JNK inhibitor resulted in reduced JNK levels when compared to the PC group and ROLT+ JNK activator resulted in JNK levels similar to those of the PC group (Figure 7). Survival of animals in groups ROLT+ JNK activator and PC+ JNK inhibitor gave similar percentage to those of the PC and ROLT groups, respectively (Figure 6).

**Role of TIMP2 and uPA in the upregulation of MMP2 in PC after ROLT** ROLT reduced TIMP2 levels when compared to the Sham group but PC increased its levels when compared to the ROLT group (Figure 8A). In addition, PC+ MMP2 inhibitor showed TIMP2 protein and mRNA levels similar to those of the ROLT group (Figure 8A). Moreover, ROLT+ JNK activator showed similar TIMP2 protein and mRNA levels to those of the PC group (Figure 8A). Also, PC+ JNK inhibitor resulted in similar TIMP2 protein and mRNA levels to those of the ROLT group (Figure 8A). Regarding uPA, all groups showed similar active uPA protein and uPA mRNA expression levels (Figure 8B).

## Discussion

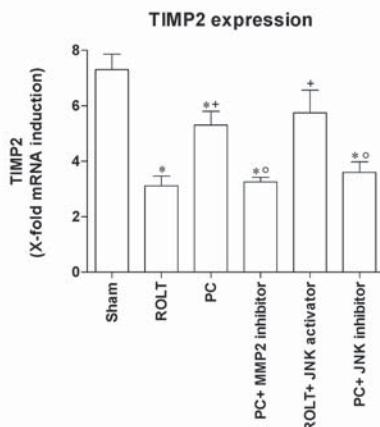
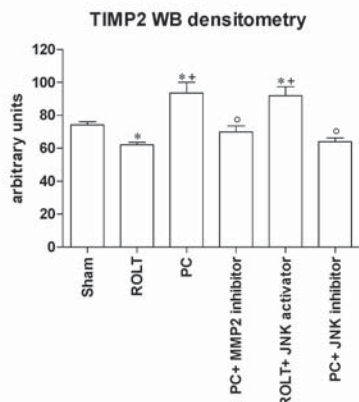
MMPs are involved in the I/R process. Several experimental studies of I/R in the rat have reported that MMPs are upregulated after I/R (15–17,19). In particular, Shirahane et al. demonstrated that MMP inhibition reduced hepatic injury after ischemia-reperfusion (19). MMPs participate in liver regeneration by remodeling the ECM (21). Moreover, Kim et al. showed MMPs were activated after hepatectomy in the rat (21). However, there are no data on the role of MMPs in situations that require both I/R and liver regeneration, such as ROLT. Nor are data available on the role of MMPs in the beneficial effects of PC in ROLT. In

this study, we show for the first time that the benefits of PC in ROLT are partly due to an increase in MMP2 levels. In our conditions, PC resulted in MMP2 mRNA and protein activity upregulation. MMP2 mRNA expression in the ROLT group was much lower than in the Sham group. However, when PC was applied prior to ROLT (PC group), MMP2 mRNA expression was restored to the Sham levels. In our model ROLT repressed MMP2 expression, but PC reversed this repression and restored MMP2 mRNA expression to the Sham level. Hence, MMP2 protein can again be synthesized at the normal rate. The same effect was observed in the modulated groups (ROLT+ JNK activator and PC+ JNK inhibitor). Previous studies reported that MMP2 is expressed latently in control livers (16,56). Taking this into account and the fact that ROLT downregulates MMP2 to lower levels than those of the Sham group, it is not surprising that the liver undergoes severe injury in ROLT. Furthermore, inhibition of MMP2 in preconditioned livers entailed a reduction of the benefits of PC in ROLT to the extent that survival of the animals administered with MMP2 inhibitor was dramatically reduced. That is to say, there was a 65% reduction in the survival rate of these animals. Animals from the group in which inhibition of MMP2 was performed prior to PC (PC+ MMP2 inhibitor) showed a significant reduction in liver regeneration and a significant increase in hepatic injury. In contrast to MMP2, MMP9 produced no significant changes in any group, except for the Sham group, which showed significantly lower mRNA expression levels. It is clear that ROLT can upregulate MMP9 expression when compared to the Sham group but PC had no effect on it. As the objectives of this study were the mechanisms of PC, we did not examine this effect, but it could be the object of future studies. Even though previous studies showed that MMP9 has an active role in liver transplantation (13), this protein does not seem to be relevant in our model. This discrepancy may be due to differences between experimental models, namely the presence or absence of liver regeneration.

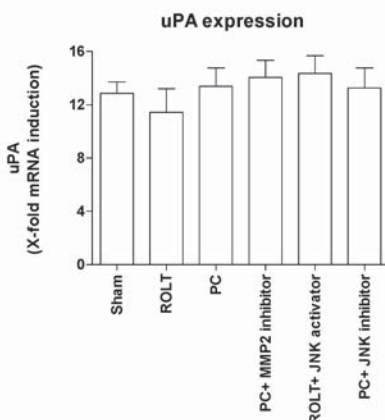
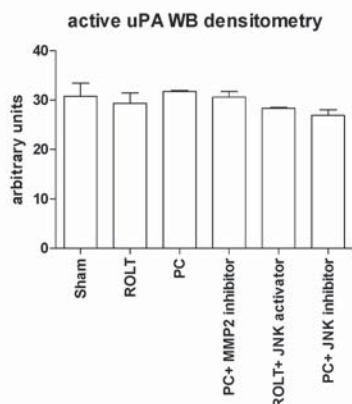
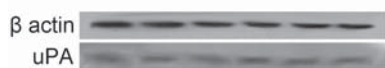
In addition, it is widely known that MMPs are able to degrade the ECM (12). On the other hand, previous studies have shown MMPs to be able to directly process TGF $\beta$  (12,57) and to release HGF from the ECM (58). On the basis of these actions, we believe that MMP2 may be one of the final effectors of PC. In other words, we think that MMP2 may be involved in the disruption of the ECM, which is an essential phase prior to regeneration. Also, MMP2 could interact with, and thus modulate growth factors like TGF $\beta$ , which are known to be the main regulators of liver regeneration (59). Finally, we believe that the protective effects of MMP2 on the liver after ROLT are basically a consequence of MMP2 action on liver regeneration. In cases when the liver is too small as in the Small-for-Size Syndrome (60), or when the liver is unable to regenerate properly, as in our study, the organ does not grow large enough to fulfil its function (61). In this case, transaminase levels are increased, reflecting a severe liver injury (62–64) as is the case in our study.

1 **Padrissa-Altés et al.**

2 **A TIMP2 in PC after ROLT**



44 **B uPA in PC after ROLT**



**Figure 8: TIMP2 and uPA in the benefits of PC in ROLT.** TIMP2 protein and mRNA expression levels (A) uPA protein and mRNA expression levels (B) were measured in liver from the experimental groups shown in the graph (n = 6 for each group). Protein levels represented with representative immunoblot analysis and densitometric analysis. PCR fluorescent signals for TIMP2 and uPA were standardized to PCR fluorescent signals obtained from an endogenous reference ( $\beta$ -Actin) and control Sham group were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. \*p < 0.05 versus Sham; +p < 0.05 versus ROLT; °p < 0.05 versus PC.

Nonetheless, we cannot rule out the possibility that MMP2 may also be able to modulate a pathway that may directly decrease liver injury.

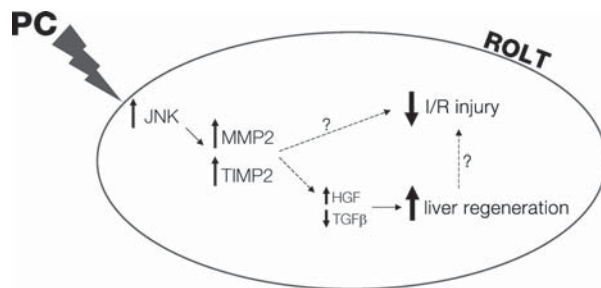
We believe that the discrepancy between our results on the role of MMP2 in liver transplantation and the results from other studies (13,16) is mainly due to the fact that our model involves liver regeneration. We believe that MMP2 is essential for the liver to regenerate, so when this protein is inhibited the liver fails to regenerate and liver injury is increased as a consequence.

Conflicting results have been reported on the role of JNK in models of hepatic I/R and liver regeneration. Several studies implicate JNK in graft injury after liver transplantation (29–31). In addition, Lee et al. showed that inhibition of

JNK in an experimental model of I/R increased hepatic injury (65). In our hands, PC increased JNK levels, which was associated with decreased hepatic injury in the ROLT+ JNK activator group. The opposite effect was observed in the PC+ JNK inhibitor group. These data implicate JNK in the beneficial effects of PC in ROLT. Furthermore, our data obtained by gelatin zymography showed that modulation of JNK affected MMP2 activity levels, which is consistent with other studies that reported JNK regulates MMPs (40,41). We conclude that, in our model, PC induces JNK activation, which correlates with an increase in MMP2.

Regarding MMP2 regulation, it is known that TIMP2 plays a role in MMP2 activation (44,66). When TIMP2 is present at very high levels this acts as an MMP2 inhibitor (45). Our results show that in our model of ROLT, TIMP2 promotes

## Matrix Metalloproteinase 2 in ROLT



**Figure 9: Diagram of suggested mechanisms by which preconditioning modulates hepatic injury and liver regeneration in ROLT 24 h after transplantation.**

MMP2 activation as seen by the parallel pattern between both proteins. Moreover, JNK also plays a role in the up-regulation of TIMP2, as seen by our results of modulation of JNK.

Additionally, we also investigated the role of uPA in our model of ROLT. Our results showed no implication of uPA in the protective effects of PC or in hepatic I/R injury after ROLT in our model of study at 24 h. Nonetheless, we cannot rule out the possibility that this protein could be upregulated earlier in time and then down regulated back to its basal levels before the time point of 24 h at which we collected the samples. This would be consistent with previous studies that showed uPA to increase its activity within 1 to 5 min after partial hepatectomy in rats (48,50).

All of these data indicate that in our model of ROLT, PC activates JNK synthesis and thus MMP2 and TIMP2 (Figure 9). This may be one of the mechanisms by which PC reduces hepatic injury and increases liver regeneration after ROLT. Consequently, treatments aimed to induce JNK or MMP2 could improve the clinical outcome of ROLT, by reducing the percentage of primary liver failure after liver transplantation.

In conclusion, here we have shown that MMP2 plays a major role in the benefits of PC in ROLT, as the inhibition of this protein dramatically reduces animal survival. Moreover, we have also shown that MMP2 is upregulated by JNK. We have identified a part of one of the pathways that may be involved in the mechanisms of PC, which reduces hepatic injury and improves liver regeneration after ROLT. The results of the present study open new possibilities for therapeutic treatments to reduce I/R injury and increase liver regeneration after ROLT, which are the main limitations in living-donor transplantation.

## Acknowledgments

We are grateful to Robin Rycroft at the Language Advisory Service of the University of Barcelona for revising the English text. The authors thank Emma Puig-Oriol and Llorenç Quintó (Epidemiology and Biostatistics Unit,

University of Barcelona), for their help in the statistical analyses. We also thank Anna Planagumà, Abraham Martín and Anna Planas for their help in zymography. Carmen Peralta participates in the Programa d'Estabilització d'Investigadors de la Direcció d'Estratègia i Coordinació del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya. Susagna Padrissa-Altés is in receipt of an FPI fellowship from *Ministerio de Educación y Ciencia* (project SAF2005-00385) and Mohammed Amine Zaouali is in receipt of a fellowship from Societat Catalana de Trasplantament.

This study was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia (project grant SAF 2005–00385) (Madrid, Spain), Ministerio de Sanidad y Consumo (projects grant PIO81988) (Madrid, Spain) and the Generalitat de Catalunya (2005 SGR/00781 project) (Barcelona, Spain). CIBER-EHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

## References

1. Uchiyama H, Yanaga K, Nishizaki T, Soejima Y, Yoshizumi T, Sugimachi K. Effects of deletion variant of hepatocyte growth factor on reduced-size liver transplantation in rats. *Transplantation* 1999; 68: 39–44.
2. Selzner N, Selzner M, Tian Y, Kadry Z, Clavien PA. Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: A TNF-alpha/IL-6-dependent mechanism. *Hepatology* 2002; 36(4 Pt 1): 812–818.
3. Samstein B, Emond J. Liver transplants from living related donors. *Annu Rev Med* 2001; 52: 147–160.
4. Tojimbara T, Fuchinoue S, Nakajima I et al. Analysis of postoperative liver function of donors in living-related liver transplantation: Comparison of the type of donor hepatectomy. *Transplantation* 1998; 66: 1035–1039.
5. Malago M, Rogiers X, Broelsch CE. Reduced-size hepatic allografts. *Annu Rev Med* 1995; 46: 507–512.
6. Kawasaki S, Makuuchi M, Matsunami H et al. Living related liver transplantation in adults. *Ann Surg* 1998; 227: 269–274.
7. Schiano TD, Kim-Schluger L, Gondolesi G, Miller CM. Adult living donor liver transplantation: The hepatologist's perspective. *Hepatology* 2001; 33: 3–9.
8. Olthoff KM. Hepatic regeneration in living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; 9(Suppl 2): S35–S41.
9. Selzner M, Camargo CA, Clavien PA. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: Protective effects of interleukin-6. *Hepatology* 1999; 30: 469–475.
10. Foschi D, Castoldi L, Lesma A, Musazzi M, Benevento A, Trabucchi E. Effects of ischaemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur J Surg* 1993; 159: 393–398.
11. Man K, Fan ST, Lo CM et al. Graft injury in relation to graft size in right lobe live donor liver transplantation: A study of hepatic sinusoidal injury in correlation with portal hemodynamics and intragraft gene expression. *Ann Surg* 2003; 237: 256–264.
12. Viappiani S, Sariahmetoglu M, Schulz R. The role of matrix metalloproteinase inhibitors in ischemia-reperfusion injury in the liver. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2923–2934.
13. Kuyvenhoven JP, Molenaar IQ, Verspaget HW et al. Plasma MMP-2 and MMP-9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 during human orthotopic liver transplantation. The effect of aprotinin and the relation to ischemia/reperfusion injury. *Thromb Haemost* 2004; 91: 506–513.
14. Kuyvenhoven JP, Verspaget HW, Gao Q et al. Assessment of serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 after human liver transplantation: increased serum MMP-9 level in acute rejection. *Transplantation* 2004; 77: 1646–1652.

1 **Padrissa-Altés et al.**

- 2 15. Chen CF, Leu FJ, Chen HI, Wang D. Oxygen radicals and matrix metalloproteinases mediate reperfusion liver injury. *Transplant Proc* 2005; 37: 4547–4549.
- 3 16. Cursio R, Mari B, Louis K et al. Rat liver injury after normothermic ischemia is prevented by a phosphinic matrix metalloproteinase inhibitor. *FASEB J* 2002; 16: 93–95.
- 4 17. Moore C, Shen XD, Gao F, Busuttill RW, Coito AJ. Fibronectin-alpha4beta1 integrin interactions regulate metalloproteinase-9 expression in steatotic liver ischemia and reperfusion injury. *Am J Pathol* 2007; 170: 567–577.
- 5 18. Khandoga A, Kessler JS, Hanschen M et al. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil and T cell recruitment and migration in the posts ischemic liver. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 1295–1305.
- 6 19. Shirahane K, Yamaguchi K, Koga K, Watanabe M, Kuroki S, Tanaka M. Hepatic ischemia/reperfusion injury is prevented by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817. *Surgery* 2006; 139: 653–664.
- 7 20. Rudolph KL, Trautwein C, Kubicka S et al. Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 1999; 30: 1159–1166.
- 8 21. Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Michalopoulos GK. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology* 2000; 31: 75–82.
- 9 22. Fuke H, Saitou Y, Nakano T, Uemoto S, Shiraki K. Matrix metalloproteinase, hepatocyte growth factor, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase during human liver regeneration. *Liver Int* 2006; 26: 380–381.
- 10 23. 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.
- 11 24. Franco-Gou R, Rosello-Catafau J, Casillas-Ramirez A et al. How ischaemic preconditioning protects small liver grafts. *J Pathol* 2006; 208: 62–73.
- 12 25. Zhang FY, Chen XC, Ren HM, Bao WM. Effects of ischemic preconditioning on blood-brain barrier permeability and MMP-9 expression of ischemic brain. *Neurol Res* 2006; 28: 21–24.
- 13 26. Lalu MM, Csonka C, Giricz Z, Csont T, Schulz R, Ferdinandy P. Preconditioning decreases ischemia/reperfusion-induced release and activation of matrix metalloproteinase-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 937–941.
- 14 27. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410: 37–40.
- 15 28. Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 1996; 274: 1194–1197.
- 16 29. Uehara T, Xi Peng X, Bennett B et al. c-Jun N-terminal kinase mediates hepatic injury after rat liver transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 324–332.
- 17 30. 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: 1527–1532.
- 18 31. Tang LM, Wang YP, Wang K et al. Exogenous biliverdin ameliorates ischemia-reperfusion injury in small-for-size rat liver grafts. *Transplant Proc* 2007; 39: 1338–1344.
- 19 32. Lehmann TG, Wheeler MD, Froh M et al. Effects of three superoxide dismutase genes delivered with an adenovirus on graft function after transplantation of fatty livers in the rat. *Transplantation* 2003; 76: 28–37.
- 20 33. Iesalnieks I, Rentsch M, Lengyel E, Mirwald T, Jauch K, Beham A. JNK and p38MAPK are activated during graft reperfusion and not during cold storage in rat liver transplantation. *Transplant Proc* 2001; 33: 931–932.
- 21 34. Bradham CA, Stachlewitz RF, Gao W et al. Reperfusion after liver transplantation in rats differentially activates the mitogen-activated protein kinases. *Hepatology* 1997; 25: 1128–1135.
- 22 35. Tsung A, Stang MT, Ikeda A et al. The transcription factor interferon regulatory factor-1 mediates liver damage during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G1261–1268.
- 23 36. Diehl AM. Effect of ethanol on tumor necrosis factor signaling during liver regeneration. *Clin Biochem* 1999; 32: 571–578.
- 24 37. Thevananther S, Sun H, Li D et al. Extracellular ATP activates c-jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes. *Hepatology* 2004; 39: 393–402.
- 25 38. Papa S, Zazzeroni F, Fu YX et al. Gadd45beta promotes hepatocyte survival during liver regeneration in mice by modulating JNK signaling. *J Clin Invest* 2008; 118: 1911–1923.
- 26 39. Zhong Z, Schwabe RF, Kai Y et al. Liver regeneration is suppressed in small-for-size liver grafts after transplantation: involvement of c-Jun N-terminal kinase, cyclin D1, and defective energy supply. *Transplantation* 2006; 82: 241–250.
- 27 40. Sampieri CL, Nuttall RK, Young DA, Goldspink D, Clark IM, Edwards DR. Activation of p38 and JNK MAPK pathways abrogates requirement for new protein synthesis for phorbol ester mediated induction of select MMP and TIMP genes. *Matrix Biol* 2008; 27: 128–138.
- 28 41. Yu X, Lin SG, Huang XR et al. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression in macrophages via the MEK-ERK MAP kinase pathway. *J Interferon Cytokine Res* 2007; 27: 103–109.
- 29 42. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827–839.
- 30 43. Bode W, Maskos K. Structural studies on MMPs and TIMPs. *Methods Mol Biol* 2001; 151: 45–77.
- 31 44. Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ et al. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase “receptor” regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem* 1998; 273: 871–880.
- 32 45. Kinoshita T, Sato H, Okada A et al. TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *J Biol Chem* 1998; 273: 16098–16103.
- 33 46. Leyland H, Gentry J, Arthur MJ, Benyon RC. The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996; 24: 1172–1178.
- 34 47. Li WY, Chong SS, Huang EY, Tuan TL. Plasminogen activator/plasmin system: A major player in wound healing? *Wound Repair Regen* 2003; 11: 239–247.
- 35 48. Mars WM, Liu ML, Kitson RP, Goldfarb RH, Gabauer MK, Michalopoulos GK. Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. *Hepatology* 1995; 21: 1695–1701.
- 36 49. Naldini L, Tamagnone L, Vigna E et al. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J* 1992; 11: 4825–4833.
- 37 50. Nagy P, Bisgaard HC, Santoni-Rugiu E, Thorgeirsson SS. In vivo infusion of growth factors enhances the mitogenic response of rat hepatic ductal (oval) cells after administration of 2-acetylaminofluorene. *Hepatology* 1996; 23: 71–79.
- 38 51. Siu MK, Cheng CY. Interactions of proteases, protease inhibitors, and the beta1 integrin/laminin gamma3 protein complex in the regulation of ectoplasmic specialization dynamics in the rat testis. *Biol Reprod* 2004; 70: 945–964.

**Matrix Metalloproteinase 2 in ROLT**

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59
52. Massip-Salcedo M, Casillas-Ramirez A, Franco-Gou R et al. Heat shock proteins and mitogen-activated protein kinases in steatotic livers undergoing ischemia-reperfusion: Some answers. *Am J Pathol* 2006; 168: 1474–1485.
53. Justicia C, Panes J, Sole S et al. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 1430–1440.
54. Masson S, Daveau M, Hiron M et al. Differential regenerative response and expression of growth factors following hepatectomy of variable extent in rats. *Liver* 1999; 19: 312–317.
55. Enami Y, Kato H, Murakami M et al. Anti-transforming growth factor-beta1 antibody transiently enhances DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 250–258.
56. Defamie V, Laurens M, Patrono D et al. Matrix metalloproteinase inhibition protects rat livers from prolonged cold ischemia-warm reperfusion injury. *Hepatology* 2008; 47: 177–185.
57. Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonevald LF. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J Biol Chem* 2002; 277: 21352–21360.
58. Mohammed FF, Pennington CJ, Kassiri Z et al. Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration. *Hepatology* 2005; 41: 857–867.
59. Padrisa-Altes S, Franco-Gou R, Boillot O et al. Effect of angiotensin II and bradykinin inhibition in rat reduced-size liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15: 313–320.
60. Dahm F, Georgiev P, Clavien PA. Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: Definition, mechanisms of disease and clinical implications. *Am J Transplant* 2005; 5: 2605–2610.
61. Hill MJ, Hughes M, Jie T et al. Graft weight/recipient weight ratio: How well does it predict outcome after partial liver transplants? *Liver Transpl* 2009; 15: 1056–1062.
62. Jiang WW, Kong LB, Li GQ, Wang XH. Expression of iNOS in early injury in a rat model of small-for-size liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 146–151.
63. Yao AH, Yang Y, Li XC et al. Hepatic regenerative response in small-sized liver isografts in the rat. *J Surg Res* 2009.
64. Tian Y, Graf R, Jochum W, Clavien PA. Arterialized partial orthotopic liver transplantation in the mouse: A new model and evaluation of the critical liver mass. *Liver Transpl* 2003; 9: 789–795.
65. Lee KH, Kim SE, Lee YS. SP600125, a selective JNK inhibitor, aggravates hepatic ischemia-reperfusion injury. *Exp Mol Med* 2006; 38: 408–416.
66. Okamoto T, Akaike T, Nagano T et al. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxydinitrite: A novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1997; 342: 261–274.

## Queries

- Q1** Author: Please give manufacturer information for this product Santa Cruz Technology: company name, town, state (if USA), and country.
- Q2** Author: Please give manufacturer information for this product Applied Biosystems: company name, town, state (if USA), and country.





