



Estrategias para proteger el injerto esteatósico en el trasplante hepático

Araní Casillas Ramírez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) 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.tdx.cat) 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.tdx.cat) 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.



Estrategias para proteger el injerto esteatósico en el trasplante hepático

Tesis Doctoral presentada por

Araní Casillas Ramírez

para optar al título de

DOCTORA EN BIOMEDICINA POR LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Director de Tesis:

Dra. Carmen Peralta Uroz

Tutor:

Dr. Ramon Bartrons Bach

2011

Material y Métodos

1. Animales de Experimentación

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

Las ratas de la cepa Zucker constituyen un modelo bien definido de obesidad inducida nutricionalmente.²⁵⁷ A diferencia de otros modelos experimentales de esteatosis hepática que utilizan la ingesta de alcohol o una dieta deficiente en los aminoácidos colina-metionina; la esteatosis hepática que se produce en este modelo experimental, no está asociada con inflamación hepática.⁸⁴ Las ratas Zucker presentan dos fenotipos diferentes: las ratas Zucker homocigotas (fa/fa) de fenotipo obeso (Ob), que carecen de receptores cerebrales de leptina y desarrollan obesidad desde las 8 semanas de edad debido al incremento en la ingesta de comida y a la disminución del gasto energético; y las ratas Zucker heterocigotas (fa/-), que tienen receptores cerebrales de leptina y mantienen un fenotipo delgado durante toda la vida (Ln)²⁵⁸ (**Figura 12**).

Para los diversos experimentos se utilizaron ratas Zucker Ob o Ln como donantes y como receptores se utilizaron siempre ratas Zucker Ln. Las ratas donantes Ob tenían unas 10-11 semanas de edad al realizarse la intervención y las Ln unas 12-13 semanas. Debido a que hígados con esteatosis moderada suelen ser descartados como injertos para trasplante en muchas ocasiones por su riesgo mayor de desarrollar FPI, se seleccionaron ratas Zucker Ob de 10-11 semanas atendiendo a que esta edad presentan hígados esteatóticos con infiltración grasa moderada. Esto fue confirmado a través de la tinción Red Oil O, que demostró que en las ratas Ob utilizadas en el modelo de trasplante ortotópico de hígado se observó infiltración grasa moderada (entre el 40-60%), de tipo macro y microvesicular en el citoplasma de los hepatocitos, mientras que los animales Ln no mostraron evidencia de esteatosis hepática (**Figura 13**). Se utilizaron ratas receptoras Ln de mayor edad para resolver el conflicto de espacio en la ubicación del nuevo hígado, ya que a igual edad las ratas Zucker Ob presentan hígados de mayor tamaño que las ratas Zucker Ln lo cual impedía su implantación en el receptor por la limitación del espacio abdominal.

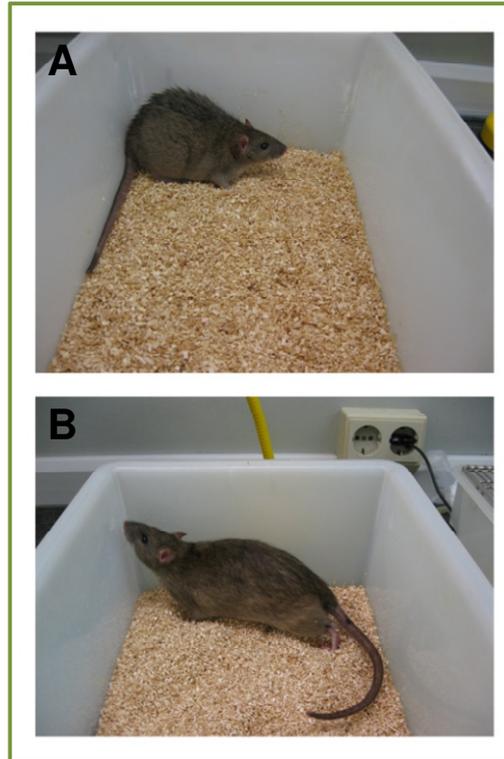


Figura 12. Animales de experimentación utilizados. A) Ratas Zucker Ob y B) Ratas Zucker Ln

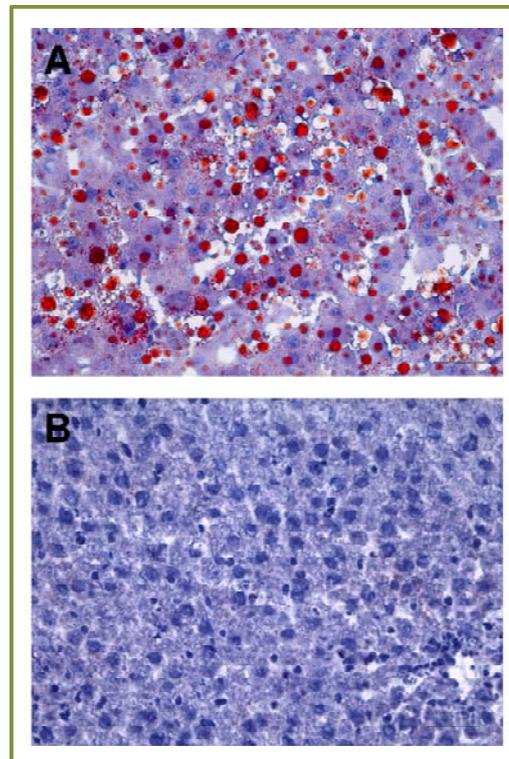


Figura 13. Diferencia de esteatosis entre las ratas Zucker Ob y Ln mediante la tinción Red Oil. Las ratas Zucker Ob (A) mostraron infiltración grasa en los hepatocitos. Las ratas Zucker Ln (B) no mostraron evidencia de esteatosis. Barra = 50 μ m.

2. Modelo Experimental

2.1 Trasplante hepático ortotópico

Anestesia

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

Procedimiento quirúrgico del trasplante hepático ortotópico

El trasplante ortotópico de hígado se realizó según la técnica del doble “cuff” descrita por Kamada y colaboradores,²⁵⁹ sin reconstrucción de la arteria hepática. La técnica quirúrgica consta de 3 etapas: cirugía del donante, cirugía del banco y cirugía del receptor.

Cirugía del donante

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

Se administraron 300 unidades de heparina por vía intravenosa. Una vez preparado el órgano para su extracción se canuló la aorta y se comenzó la perfusión del injerto; se ocluyó la aorta torácica, previa apertura del diafragma, se seccionó la vena cava inferior suprahepática por encima del diafragma y se comenzó la perfusión del injerto con 50 ml de solución UW. Una vez perfundido el hígado, se procedió a la extracción del hígado donante y se colocó en un baño con solución UW a 4°C (**Figura 14**).

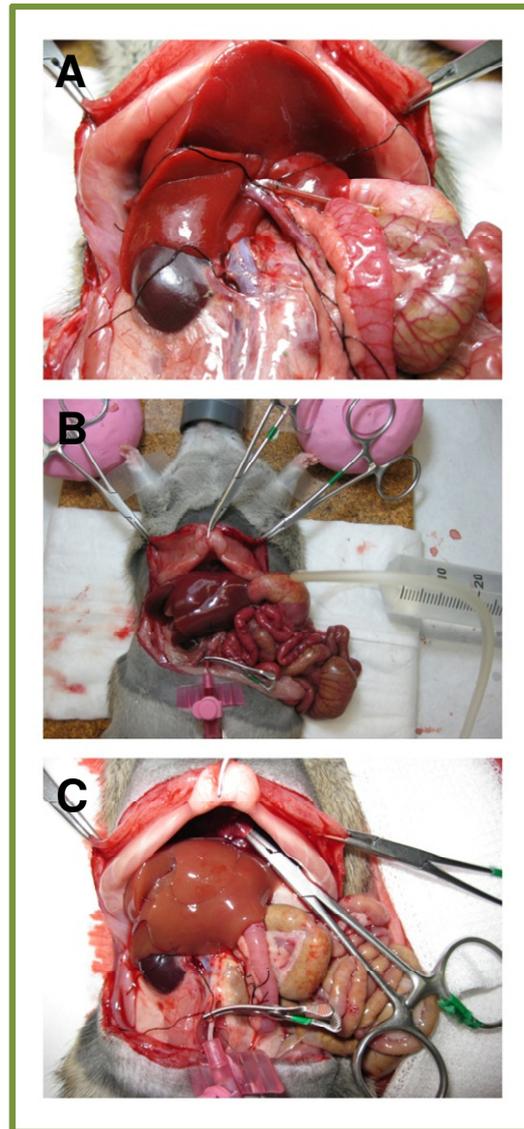


Figura 14. Cirugía del donante en el modelo experimental de trasplante hepático ortotópico. A) Arteria y vena renal derecha ligadas, y conducto biliar canulado. B) Aorta canulada para comenzar la perfusión del injerto hepático. C) Hígado perfundido con solución UW.

Cirugía del banco

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

Las anastomosis de las venas porta y vena cava inferior infrahepática se realizan en el receptor mediante la técnica del doble cuff. Para ello, durante en el banco se colocaron en ambas venas unas estructuras tubulares de polietileno llamadas cuffs. La colocación de estas estructuras permite que en el momento del implante se introduzca cada cuff dentro de las venas porta y cava inferior

infrahepática, evitando realizar una sutura continua y disminuyendo por lo tanto la duración de la intervención, lo cual es muy importante para la supervivencia del receptor (**Figura 15**).

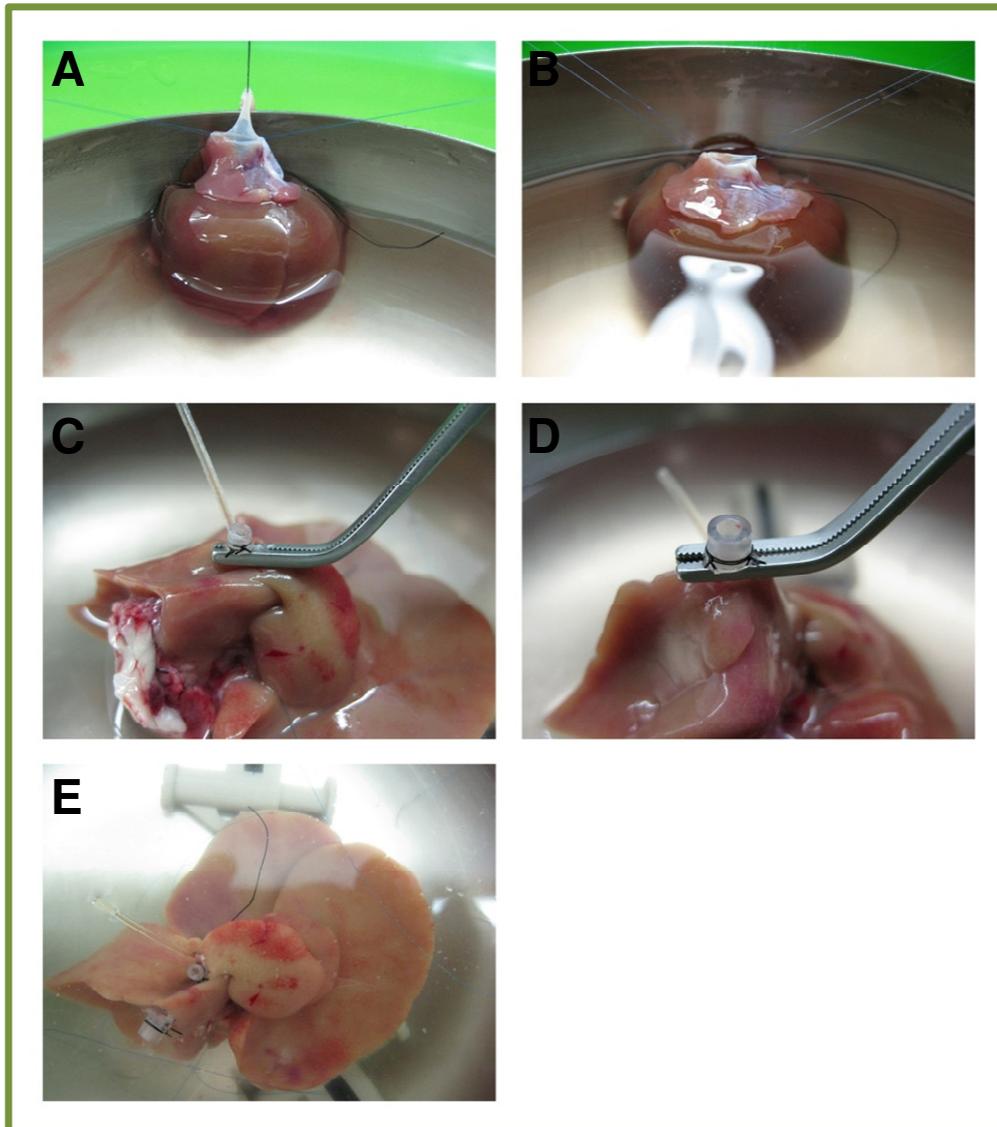


Figura 15. Cirugía del banco en el modelo experimental de trasplante hepático ortotópico. A) Vena cava inferior suprahepática. B) Vena cava inferior suprahepática preparada para anastomosis en el receptor. C) Colocación del cuff en la vena porta. D) Colocación del cuff en la vena cava inferior infrahepática. E) Injerto hepático preservado en solución UW fría y preparado para ser implantado en el receptor.

Cirugía del receptor

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

A continuación se procedió a implantar el hígado del donante, previa perfusión con solución Lactato Ringer Hartmann para eliminar el exceso de ión potasio que contiene la solución de preservación UW. El implante del injerto comenzó con la sutura continua con Prolene 7/0 entre la vena cava inferior suprahepática del donante y la del receptor. La siguiente anastomosis que se realizó fue la de la vena porta, mediante la introducción del cuff colocado en la vena porta del injerto dentro de la vena porta del receptor; una vez introducida, se aseguró con una sutura de seda 6/0. Una vez realizadas estas dos primeras anastomosis se procedió a la reperfusión del injerto, mediante la liberación en primer lugar, del clamp microvascular que ocluía la vena porta e inmediatamente después se liberó la pinza Satinsky que ocluía la vena cava inferior suprahepática.

La anastomosis de la vena cava inferior infrahepática se realizó de forma similar a la vena porta, y posteriormente se liberó el clamp microvascular que ocluía la vena, reconstituyendo el flujo sanguíneo a este nivel. Después se realizó la anastomosis del conducto biliar y para terminar la intervención se cerró el plano muscular y después la piel con sutura continua con seda 2/0 (**Figura 16**).

2.2 PCI

El PCI se realizó en el hígado donante mediante la oclusión de la arteria hepática y la vena porta con un clamp microvascular durante 5 minutos. Posteriormente se liberó el clamp microvascular permitiendo la reperfusión del hígado durante 10 minutos (**Figura 17**). Tras estos 10 minutos de reperfusión se procedió a la perfusión del injerto con la solución UW. Los tiempos de isquemia y reperfusión del PCI fueron elegidos en base a un estudio realizado por nuestro grupo en el modelo de trasplante hepático en hígados grasos en el cual, el PCI realizado de esta forma tuvo un efecto protector frente a la lesión de I/R hepática.¹⁶⁰

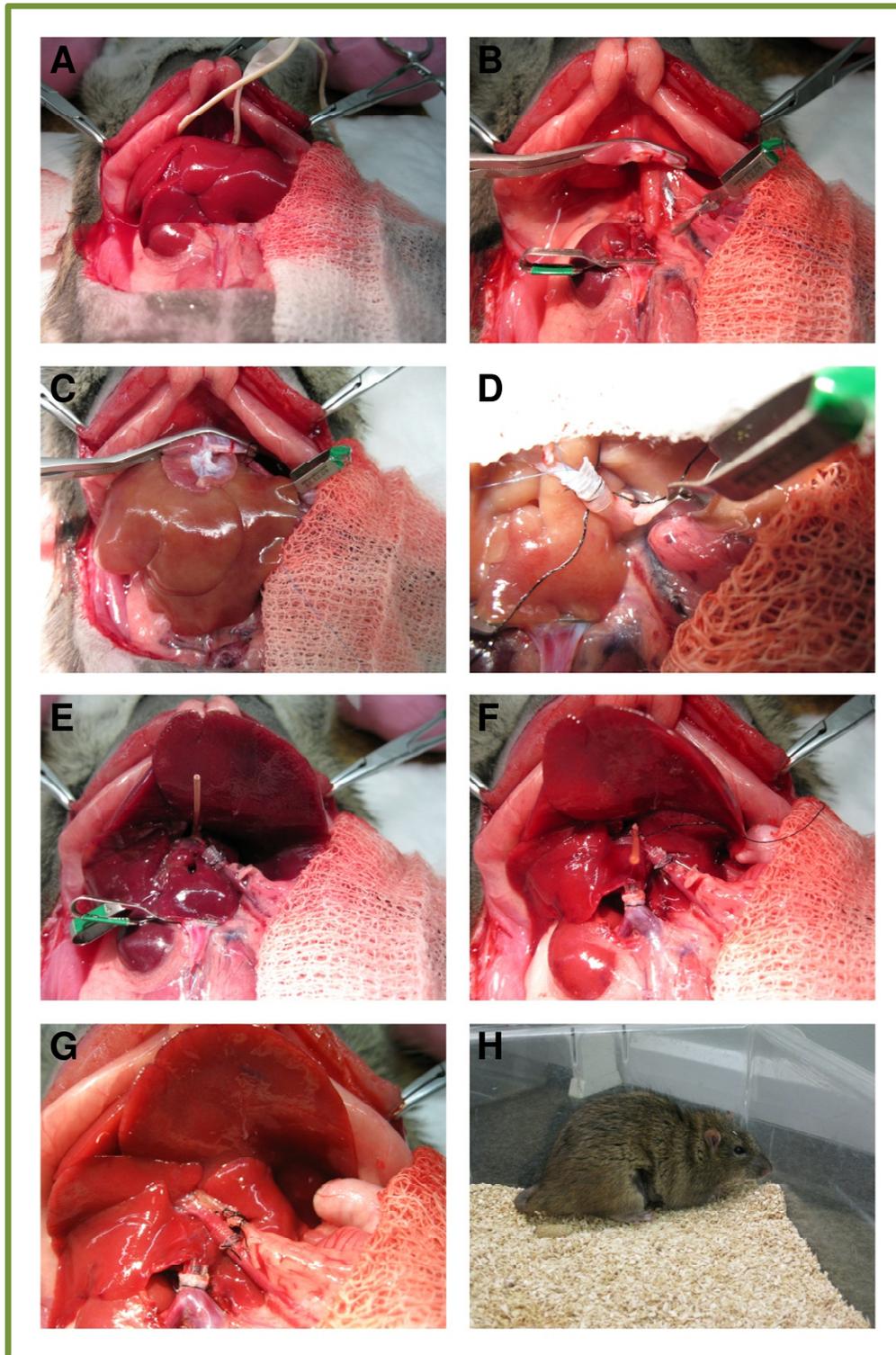


Figura 16. Cirugía del receptor en el modelo experimental de trasplante hepático ortotópico. A) Receptor preparado para el implante del injerto hepático. B) Fase anhepática. C) Anastomosis de la vena cava inferior suprahepática mediante sutura continua. D) Anastomosis de la vena porta mediante cuff. E) Reperusión del injerto hepático. F) Anastomosis de la vena cava inferior infrahepática a través de un cuff. G) Anastomosis del conducto biliar mediante el catéter colocado previamente en el donante. H) Rata receptora al finalizar el trasplante de hígado ortotópico.

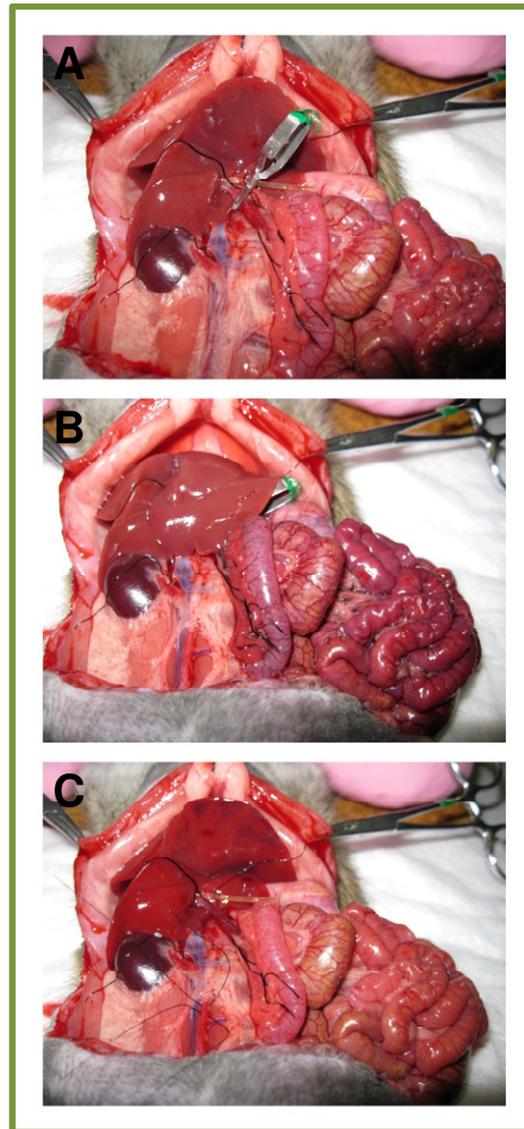


Figura 17. Precondicionamiento isquémico en el modelo experimental de trasplante hepático. A) Inicio del PCI: oclusión de la arteria hepática y la vena porta con un clamp microvascular. B) Periodo de 5 min de isquemia hepática. C) Liberación del clamp microvascular para permitir la reperfusión del hígado durante 10 minutos.

3. Diseño Experimental

3.1 Estudio 1

Papel del RAS en la lesión hepática por I/R asociada al trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos, así como en los efectos protectores del PCI.

En la **Tabla 2** se presenta un resumen del diseño experimental y las determinaciones analíticas realizadas en este Estudio. Los protocolos experimentales se describen en detalle a continuación.

Protocolo 1

Para evaluar el papel de la Ang II, el principal efector del RAS, en la lesión hepática por I/R asociada al trasplante de injertos esteatósicos y no esteatósicos, así como en los efectos protectores del PCI, se realizaron los siguientes grupos experimentales.

1. Sham (n=12, 6 Ln y 6 Ob): Los animales Ln y Ob se sometieron a anestesia, laparotomía transversal y se ligaron las venas suprarrenal derecha, la arteria hepática y la vena diafragmática.
2. Trasplante hepático (TH) (n=24 ratas, 12 trasplantes, en 6 trasplantes se utilizaron ratas Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron ratas Ln como donantes): Este grupo se dividió en dos subgrupos:
 - 1.1 Trasplante hepático con injerto esteatósico (n=12 ratas, 6 trasplantes, 6 ratas Ob donantes y 6 ratas Ln receptoras): Los hígados esteatósicos extraídos de ratas Zucker Ob (n=6 ratas) se perfundieron y se preservaron con solución de preservación fría UW durante 6 horas. El trasplante hepático ortotópico estándar utilizando ratas Zucker Ln como receptores (n=6 ratas), se realizó de acuerdo a la técnica de doble cuff sin reconstrucción de la arteria hepática de Kamada.²⁵⁹
 - 1.2 Trasplante hepático con injerto no esteatósico (n=12 ratas, 6 trasplantes, 6 ratas Ln donantes y 6 ratas Ln receptoras): Los hígados no esteatósicos extraídos de ratas Zucker Ln (n=6 ratas) se perfundieron y se preservaron con solución de preservación fría UW durante 6 horas. El trasplante hepático ortotópico estándar utilizando ratas Zucker Ln como receptores (n=6 ratas), se realizó de acuerdo a la técnica de doble cuff sin reconstrucción de la arteria hepática de Kamada.²⁵⁹

La duración de los períodos de isquemia fría y de reperfusión aplicados para la realización de esta tesis están basados en estudios anteriores en los que observó que 6 h de isquemia fría es suficiente para inducir lesión por I/R tanto en injertos esteatósicos como en no esteatósicos sometidos a trasplante y es un tiempo de isquemia fría que normalmente se utiliza en la práctica clínica. Las 4 h de reperfusión están dentro del margen de tiempo en el que se observan los máximos niveles en los parámetros de lesión hepática (Añadir los nuestros de trasplante, *Camargo y cols. 1997; Sun Z. y cols. 2003*).^{83,84,159,160,260-262}

3. Precondicionamiento Isquémico + Trasplante hepático (PCI+TH) (n=24 ratas, 12 trasplantes, en 6 de ellos se utilizaron ratas Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron

ratas Ln como donantes): Igual que el grupo 2, pero con PCI, inducido por 5 min de isquemia seguido de 10 min de reperfusión en el hígado de la rata donante previo a la perfusión del hígado con la solución UW. El tiempo de PCI utilizado ha demostrado ser eficaz frente al daño por I/R hepática en el modelo de trasplante hepático con injerto esteatósico.^{159,160}

4. Trasplante hepático + antagonista de los receptores de AT1 (TH+AT1R antagonista) (n=24 ratas, 12 trasplantes, en 6 de ellos se utilizaron ratas Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron ratas Ln como donantes): Igual que el grupo 2, pero con administración previa de losartán (Merck Sharp & Dohme, Whitehouse Station, NJ, USA), un antagonista de los receptores AT1, a dosis de 5 mg/kg por vía oral, 24 h y 1.5 h antes del procedimiento quirúrgico.^{215,217} El tratamiento farmacológico se realizó en donante y receptor.
5. Trasplante hepático + antagonista de los receptores AT2 (TH+AT2R antagonista) (n=24 ratas, 12 trasplantes, en 6 de ellos se utilizaron ratas Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron ratas Ln como donantes): Igual que el grupo 2, pero con administración previa de PD123319 (Tocris Cookson, Ellisville, MI, USA) un antagonista de los receptores AT2, a dosis de 30 mg/kg por vía intravenosa, 5 min antes del procedimiento quirúrgico.^{215,263} El tratamiento farmacológico se realizó en donante y receptor.

En todos los grupos experimentales descritos, se recogieron muestras de plasma e hígado después de 4 horas de reperfusión. En el grupo Sham, las muestras de hígado y tejido se tomaron 4 horas después de la laparotomía y ligadura de vasos sanguíneos. Para evaluar la lesión hepática se realizaron las siguientes determinaciones: transaminasas; estudio histológico del tejido hepático; muerte celular por apoptosis mediante determinación de los niveles hepáticos de Caspasa 3 y tinción Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin Nick-End Labeling (TUNEL) en cortes histológicos de hígado. Para evaluar la expresión del RAS se determinaron los niveles de angiotensinógeno, ACE, Ang I y Ang II en muestras de tejido hepático.

Protocolo 2

Para investigar la posible implicación de la Ang (1-7), un péptido biológicamente activo del RAS y generado a partir de la Ang II, en la lesión por I/R asociada al trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos, a los grupos 1 y 2 del Protocolo 1 se añadió el siguiente grupo experimental.

6. Trasplante hepático + antagonista del receptor Mas de la Ang (1-7) (TH+Ang(1-7)Mas antagonista) (n=24, 12 trasplantes, en 6 de ellos se utilizaron Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron Ln como donantes): Igual que el grupo 2, pero con administración previa de A-779 (Bachem, Bubendorf, Suiza), un antagonista del receptor Mas de la Ang(1-7), a dosis de 48 µg/kg por vía intravenosa, 5 min antes del procedimiento quirúrgico.²⁶⁴ El tratamiento farmacológico se realizó en donante y receptor.

Después de 4 horas de reperfusión, se recogieron muestras de plasma e hígado en este grupo experimental. Para evaluar la lesión hepática se realizó la determinación de transaminasas en

plasma, estudio histológico del tejido hepático y se evaluó la muerte celular por apoptosis a través de la determinación de los niveles hepáticos de Caspasa 3 y la tinción TUNEL en cortes histológicos de hígado. Se determinó también en muestras de tejido hepático los niveles de Ang (1-7) y de su enzima formadora, el ACE2.

Protocolo 3

Para evaluar el efecto de los antagonistas de los receptores de la Ang II y de la Ang (1-7) sobre la supervivencia de ratas Zucker sometidas a trasplante hepático, se realizaron los siguientes grupos experimentales.

7. Trasplante hepático (TH) (n=40, 20 trasplantes, en 10 de ellos se utilizaron Ob como donantes y en los otros 10 se utilizaron Ln como donantes): Este grupo se dividió en dos subgrupos:
 - 7.1 *Trasplante hepático con injerto esteatósico* (n=20 ratas, 10 trasplantes, 10 ratas Ob donantes y 10 ratas Ln receptoras): Receptores trasplantados con injertos hepáticos esteatósicos sin ningún tratamiento farmacológico. El procedimiento quirúrgico se realizó igual que en grupo 2.1.
 - 7.2 *Trasplante hepático con injerto no esteatósico* (n=20 ratas, 10 trasplantes, 10 ratas Ln donantes y 10 ratas Ln receptoras): Receptores trasplantados con injertos hepáticos no esteatósicos sin ningún tratamiento farmacológico. El procedimiento quirúrgico se realizó igual que en el grupo 2.2.
8. Trasplante hepático + antagonista de los receptores de AT1 (TH+AT1R antagonista) (n=20, 10 trasplantes en los que se utilizaron Ln como donantes): Receptores trasplantados con injertos hepáticos no esteatósicos tratados con el antagonista de los receptores AT1. El procedimiento quirúrgico se realizó igual que en el grupo 2.2, pero con administración previa de losartán (Merck Sharp & Dohme, Whitehouse Station, NJ, USA), un antagonista de los receptores AT1, a dosis de 5 mg/kg por vía oral, 24 h y 1.5 h antes del procedimiento quirúrgico.^{215,217} El tratamiento farmacológico se realizó en donante y receptor.
9. Trasplante hepático + antagonista de los receptores AT2 (TH+AT2R antagonista) (n=20, 10 trasplantes en los que se utilizaron Ln como donantes): Receptores trasplantados con injertos hepáticos no esteatósicos tratados con el antagonista de los receptores AT2. El procedimiento quirúrgico se realizó igual que en el grupo 2.2, pero con administración previa de PD123319 (Tocris Cookson, Ellisville, MI, USA), un antagonista de los receptores AT2, a dosis de 30 mg/kg por vía intravenosa, 5 min antes del procedimiento quirúrgico.^{215,263} El tratamiento farmacológico se realizó en donante y receptor.
10. Trasplante hepático + antagonista del receptor Mas de la Ang (1-7) (TH+Ang(1-7)Mas antagonista) (n=20, 10 trasplantes en los que se utilizaron Ob como donantes): Receptores trasplantados con injertos hepáticos esteatósicos tratados con el antagonista del receptor Mas de la Ang(1-7). El procedimiento quirúrgico se realizó igual que en el grupo 2.1, pero con administración previa de A-779 (Bachem, Bubendorf, Suiza), un antagonista del

receptor Mas de la Ang(1-7), a dosis de 48 µg/kg por vía intravenosa, 5 min antes del procedimiento quirúrgico.²⁶⁴ El tratamiento farmacológico se realizó en donante y receptor.

Tal como se ha descrito en otros estudios, la supervivencia de los receptores fue monitorizada durante 14 días después de la cirugía.

En los diferentes protocolos de este estudio, se utilizó solución salina fisiológica como vehículo para la administración de los fármacos losartán, PD123319 y A-779.

Protocolo 4

Para evaluar los posibles mecanismos de protección de las estrategias farmacológicas o quirúrgicas capaces de regular la Ang II en trasplante hepático se utilizaron los grupos experimentales 1, 2, 4 y 5 (Protocolo 1). Así pues, para evaluar el efecto de la modulación de la Ang II sobre las alteraciones microcirculatorias se estimó el flujo sanguíneo hepático y flujo portal durante la reperfusión. Para investigar una posible implicación del NO en los mecanismos de protección se determinaron los niveles de nitritos y nitratos, NOSc, NOSi en tejido hepático. De la misma manera, para evaluar la participación de las MAPK en tales mecanismos, se analizaron los niveles de p38 MAPK y ERK 1/2 en muestras de tejido hepático.

Por otro lado, para evaluar los posibles mecanismos de protección de las estrategias farmacológicas o quirúrgicas capaces de regular la Ang (1-7) en trasplante hepático, se utilizaron los grupos experimentales 1, 2 (Protocolo 1) y 6 (Protocolo 2). En estos grupos, para evaluar la implicación del NO se analizaron los niveles de nitratos y nitritos, NOSc y NOSi en muestras de hígado. De la misma forma, para investigar la participación del estrés oxidativo, se analizaron los niveles MDA y nitrotirosinas en muestras de tejido hepático.

Diseño Experimental del Estudio 1	
El RAS en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos	
Protocolo 1. Ang II en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos y en el efecto protector del PCI	
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>
1. Sham (n=12, 6 Ln and 6 Ob) 2. TH (12 trasplantes, 6 injertos Ob y 6 injertos Ln) 3. PCI+TH (12 trasplantes, 6 injertos Ob y 6 injertos Ln) 4. TH+AT1R antagonista (12 trasplantes, 6 injertos Ob y 6 injertos Ln) 5. TH+AT2R antagonista (12 trasplantes, 6 injertos Ob y 6 injertos Ln)	<u>Plasma:</u> Transaminasas <u>Hígado:</u> Estudio histológico, TUNEL, Caspasa-3, Angiotensinógeno, ACE, Ang I, Ang II.
Protocolo 2. Ang (1-7) en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos	
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>
Grupos 1 y 2 (Protocolo 1) 6. TH+Ang (1-7)Mas antagonista (12 trasplantes, 6 injertos Ob y 6 injertos Ln)	<u>Plasma:</u> Transaminasas <u>Hígado:</u> Estudio histológico, TUNEL, Caspasa-3, Ang (1-7), ACE2.
Protocolo 3. Efecto de los antagonistas de los receptores de la Ang II y de la Ang (1-7) sobre la supervivencia de receptores sometidos a trasplante hepático	
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Supervivencia en el receptor</i>
7. TH (20 trasplantes, 10 injertos Ob y 10 injertos Ln) 8. TH+AT1R antagonista (10 trasplantes, 10 injertos Ln) 9. TH+AT2R antagonista (10 trasplantes, 10 injertos Ln) 10. TH+Ang (1-7)Mas antagonista (10 trasplantes, 10 injertos Ob)	Monitorizar la supervivencia durante 14 días.
Protocolo 4. Mecanismos de protección de estrategias capaces de regular la Ang II o Ang (1-7) en injertos hepáticos esteatósicos y no esteatósicos	
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>
Grupos 1, 2, 4 y 5 (Protocolo 1) Grupos 1, 2 y 6 (Protocolos 1 y 2)	<u>Hígado:</u> Microcirculación hepática, Nitritos y nitratos, NOSc, NOSi, p38 MAPK, ERK 1/2. <u>Hígado:</u> Nitritos y nitratos, NOSc, NOSi, MDA, Nitrotirosinas.
Protocolo de administración de los fármacos utilizados	
Protocolo	Fármaco
	Dosis y tiempo de pre-tratamiento
Protocolo 1 y 3	AT1R antagonista Losartán 5 mg/kg vía oral, 24 h y 1.5 h antes del procedimiento quirúrgico en el donante y en el receptor. AT2R antagonista PD123319 30 mg/kg vía intravenosa, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante y en el receptor..
Protocolo 2 y 3	Ang (1-7)Mas antagonista A-779 48 µg/kg vía intravenosa, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante y en el receptor.

Tabla 2. Diseño experimental y determinaciones analíticas del Estudio 1.

3.2 Estudio 2

Papel del RBP4 en la lesión hepática por I/R asociada al trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos, así como en los efectos protectores del PCI

En la **Tabla 3** se presenta un resumen del diseño experimental y las determinaciones analíticas realizadas en este Estudio.

Protocolo 1

Para evaluar el papel del RBP4 en la lesión hepática por I/R asociada al trasplante de injertos esteatósicos y no esteatósicos, así como en los efectos protectores del PCI, se establecieron 3 protocolos con los siguientes grupos experimentales.

Protocolo 1A. Para evaluar los niveles de RBP4 en el trasplante hepático de hígados esteatósicos y no esteatósicos, se utilizaron los grupos experimentales 1 al 3 que se describieron previamente (Estudio 1, Protocolo 1). En muestras de tejido hepático obtenidas de estos grupos experimentales se determinó RBP4.

Protocolo 1B. Para realizar un estudio dosis-respuesta acerca del tratamiento farmacológico con RBP4 sobre el daño hepático inducido por I/R en el trasplante hepático de injertos esteatósicos, se realizaron los siguientes grupos experimentales.

11. Trasplante hepático + RBP4 (TH+RBP4) (n=12 ratas, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes, para cada una de las dosis evaluadas). Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de RBP4 recombinante (AdipoGen, Seúl, Corea) en el donante 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico, a las siguientes dosis: 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 µg/kg por vía intravenosa.

En los grupos experimentales descritos, se recogieron muestras de plasma e hígado después de 4 horas de reperusión. Se evaluó la lesión hepática a través de la determinación de transaminasas en plasma y del estudio histológico del tejido hepático.

Protocolo 1C. Para evaluar la lesión hepática tras la modulación farmacológica de RBP4 en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos, se realizaron los siguientes grupos experimentales.

12. Trasplante hepático + RBP4 (TH+RBP4) (n=24 ratas, 12 trasplantes, en 6 de ellos se utilizaron ratas Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron ratas Ln como donantes): Igual que el grupo 2, pero con administración previa de RBP4 recombinante (AdipoGen, Seúl, Corea) en el donante a dosis de 150 µg/kg por vía intravenosa, 30 min antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
13. Precondicionamiento Isquémico + Trasplante hepático + anticuerpo anti RBP4 (PCI+TH+anti-RBP4) (n= 12 ratas, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con PCI inducido por 5 min de isquemia seguido de

10 min de reperfusión en el hígado de la rata donante previo a la perfusión del hígado con la solución UW;^{159,160} y administración previa de un anticuerpo dirigido contra el RBP4 de rata (AdipoGen, Seúl, Corea), a dosis de 3000 µg/kg por vía intravenosa, 30 min antes del procedimiento quirúrgico en el donante.

En estos grupos experimentales, se recogieron muestras de plasma e hígado después de 4 horas de reperfusión. Se evaluó la lesión hepática a través de la determinación de transaminasas en plasma y del estudio histológico del hígado.

Protocolo 2

Para evaluar la posible relación entre PPAR γ y RBP4 en trasplante hepático, se establecieron 4 protocolos con los siguientes grupos experimentales.

Protocolo 2A. Para evaluar los niveles de PPAR γ en el trasplante hepático de hígados esteatósicos y no esteatósicos, se utilizaron los grupos experimentales 1 al 3 que se describieron previamente (Estudio 1, Protocolo 1). En estos grupos experimentales se determinó PPAR γ en muestras de tejido hepático.

Protocolo 2B. Para realizar un estudio dosis-respuesta basado en el efecto del tratamiento farmacológico con el antagonista del PPAR γ sobre el daño hepático en el trasplante hepático de injertos esteatósicos, se realizaron los siguientes grupos experimentales.

14. Trasplante hepático + antagonista del PPAR γ (TH+PPAR γ antagonista) (n=12 ratas, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes, para cada una de las dosis evaluadas). Igual que el grupo 2.1, pero con administración en el donante 1 h antes del procedimiento quirúrgico via intraperitoneal, de GW9662 (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza), un antagonista del PPAR γ a las siguientes dosis: 250, 500, 750, 1000, 1250 y 1500 µg/kg.

Al final del procedimiento quirúrgico se recogieron muestras de plasma e hígado después de 4 horas de reperfusión. Se evaluó la lesión hepática a través de la determinación de transaminasas en plasma y del estudio histológico del tejido hepático.

Protocolo 2C. Para evaluar el daño hepático tras la modulación farmacológica de PPAR γ en el trasplante hepático, se realizaron los siguientes grupos experimentales.

15. Trasplante hepático + antagonista del PPAR γ (TH+PPAR γ antagonista) (n=24 ratas, 12 trasplantes, en 6 de ellos se utilizaron ratas Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron ratas Ln como donantes): Igual que el grupo 2, pero con administración previa en el donante de GW9662 (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza), un antagonista del PPAR γ , a dosis de 1000 µg/kg por vía intraperitoneal, 1 hora antes del procedimiento quirúrgico.
16. Precondicionamiento Isquémico + Trasplante hepático + agonista del PPAR γ (PCI+TH+PPAR γ agonista) (n=12 ratas, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob

como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con PCI inducido por 5 min de isquemia seguido de 10 min de reperfusión en el hígado de la rata donante previo a la perfusión del hígado con la solución UW;^{159,160} y con administración previa en el donante de Rosiglitazona (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza), un agonista del PPAR γ , a dosis de 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por vía intraperitoneal, 1 hora antes del procedimiento quirúrgico.

Al final del procedimiento quirúrgico, se recogieron muestras de plasma e hígado después de 4 horas de reperfusión. Se evaluó la lesión hepática a través de la determinación de transaminasas en plasma y del estudio histológico del hígado.

Protocolo 2D. Para explicar los mecanismos de acción del RBP4 y PPAR γ en la lesión por I/R asociada al trasplante hepático, así como en el PCI, a los grupos experimentales 11 (Estudio 2, Protocolo 1B); 12 y 13 (Estudio 2, Protocolo 1C); y 15 y 16 (Estudio 2, Protocolo 2C) se añadieron los siguientes grupos experimentales.

17. Trasplante hepático + RBP4 + agonista del PPAR γ (TH+RBP4+PPAR γ agonista) (n=12 ratas, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de RBP4 recombinante (AdipoGen, Seúl, Corea), a dosis de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por vía intravenosa, 30 min antes del procedimiento quirúrgico en el donante; y con administración de Rosiglitazona (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza), un agonista del PPAR γ , a dosis de 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por vía intraperitoneal, 1 hora antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
18. Precondicionamiento Isquémico + Trasplante hepático + anticuerpo anti RBP4 + antagonista del PPAR γ (PCI+TH+anti-RBP4+PPAR γ antagonista) (n= 12 ratas, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con PCI inducido por 5 min de isquemia seguido de 10 min de reperfusión en el hígado de la rata donante previo a la perfusión del hígado con la solución UW;^{159,160} administración previa de un anticuerpo dirigido contra el RBP4 de rata (AdipoGen, Seúl, Corea), a dosis de 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por vía intravenosa, 30 min antes del procedimiento quirúrgico en el donante; y administración de GW9662 (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza), un antagonista del PPAR γ , a dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por vía intraperitoneal, 1 hora antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
19. Trasplante hepático + RBP4 + antagonista del PPAR γ (TH+RBP4+PPAR γ ant) (n=12 ratas, 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron ratas Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de RBP4 recombinante (AdipoGen, Seúl, Corea), a dosis de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por vía intravenosa, 30 min antes del procedimiento quirúrgico en el donante; y con administración de GW9662 (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza), un antagonista del PPAR γ , a dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por vía intraperitoneal, 1 hora antes del procedimiento quirúrgico en el donante.

Después de 4 horas de reperfusión, se recogieron muestras de plasma e hígado. En las muestras de tejido hepático se determinaron los niveles de RBP4 y de PPAR γ y se evaluó la lesión hepática a

través de la medición de los niveles de transaminasas en plasma y del estudio histológico del hígado.

Protocolo 3

Para investigar el efecto de la AMPK, un conocido efector del PCI, sobre el RBP4 y el PPAR γ en el trasplante hepático, se realizaron los grupos experimentales que se describen a continuación.

20. Trasplante hepático + activador del AMPK (TH+AMPK activador) (n=12; 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con administración previa de 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleosido (AICAR) (Toronto Research Chemicals, North York, ON, Canada), un activador de la AMPK, a dosis de 100 mg/kg por vía intravenosa, 5 min antes del procedimiento quirúrgico en el donante.¹⁵⁹
21. Precondicionamiento isquémico + Trasplante hepático + inhibidor del AMPK (PCI+TH+AMPK inhibidor) (n=12; 6 trasplantes, en los cuales se utilizaron Ob como donantes): Igual que el grupo 2.1, pero con PCI inducido por 5 min de isquemia seguido de 10 min de reperfusión en el hígado de la rata donante previo a la perfusión del hígado con la solución UW;^{159,160} y administración previa de adenina 9- β -D-arabinofuranosido (ara-A) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), un inhibidor del AMPK, a dosis de 100 μ g/kg/min por vía intravenosa durante 10 min antes del procedimiento quirúrgico en el donante.¹⁵⁹

Se recogieron muestras de plasma e hígado después de 4 horas de reperfusión. En las muestras de tejido hepático se determinaron los niveles de RBP4 y de PPAR γ .

Protocolo 4

Para investigar si los cambios inducidos en los niveles de RBP4 y PPAR γ que se observan en los injertos hepáticos esteatósicos suceden durante la isquemia fría, antes de implantar el injerto hepático esteatósico en el receptor, se realizaron los siguientes grupos experimentales.

22. Isquemia (n=6, 6 injertos hepáticos provenientes de ratas Ob): Los hígados de animales Ob se perfundieron con solución de preservación UW a 4°C, y se preservaron a 4°C en la misma solución de preservación durante 6 h. Transcurrido este tiempo se procedió a la toma de muestras.
23. Precondicionamiento isquémico + Isquemia (PCI+Isquemia) (n=6, 6 injertos hepáticos provenientes de ratas Ob): Igual que el grupo 22, pero con PCI inducido por 5 min de isquemia seguido de 10 min de reperfusión previo a la perfusión del hígado con la solución UW.^{159,160}
24. Isquemia + activador del AMPK (Isquemia+AMPK activador) (n=6, 6 injertos hepáticos provenientes de ratas Ob): Igual que el grupo 22, pero con tratamiento previo con AICAR (Toronto Research Chemicals, North York, ON, Canada), un activador de la AMPK, a dosis de 100 mg/kg por vía intravenosa, 5 min antes del procedimiento quirúrgico.¹⁵⁹

25. Precondicionamiento isquémico + Isquemia + inhibidor del AMPK (PCI+Isquemia+AMPK inhibidor) (n= 6, 6 injertos hepáticos provenientes de ratas Ob): Igual que el grupo 22, pero con PCI inducido por 5 min de isquemia seguido de 10 min de perfusión en el hígado de la rata donante previo a la perfusión del hígado con la solución UW;^{159,160} y con administración de ara-A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), un inhibidor del AMPK, a dosis de 100 µg/kg/min por vía intravenosa durante 10 min antes del procedimiento quirúrgico.¹⁵⁹

Al finalizar las 6 horas de isquemia fría se obtuvieron muestras de hígado de todos los grupos experimentales de este protocolo. Los niveles de RBP4 y de PPAR γ se determinaron en las muestras de tejido hepático.

Los vehículos usados para la administración de los fármacos en los diferentes protocolos de este estudio fueron: tampón fosfato salino (PBS) (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) para RBP4 recombinante y anticuerpo anti-RBP4; dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para GW9662 y Rosiglitazona; y solución salina fisiológica para AICAR y ara-A.

4. Recogida y procesamiento de las muestras

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

Diseño Experimental del Estudio 2		
El RBP4 en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos		
Protocolo 1. RBP4 en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos y en el efecto protector del PCI		
Protocolo 1A. Niveles de RBP4 en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos		
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>	
Grupos 1 al 3 (Estudio 1, Protocolo 1)	Hígado: RBP4	
Protocolo 1B. Estudio Dosis-Respuesta del efecto del RBP4 sobre la lesión hepática en el trasplante de hígados esteatósicos		
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>	
11. TH+RBP4 (6 trasplantes, 6 injertos Ob por cada dosis evaluada)	Plasma: Transaminasas Hígado: Estudio histológico	
Protocolo 1C. Lesión hepática tras la modulación farmacológica del RBP4 en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos		
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>	
12. TH+RBP4 (12 trasplantes, 6 injertos Ob y 6 injertos Ln) 13. PCI+TH+anti-RBP4 (6 trasplantes, 6 injertos Ob)	Plasma: Transaminasas Hígado: Estudio histológico	
Protocolo 2. Mecanismos de protección de estrategias capaces de modular RBP4 en el trasplante hepático.		
Protocolo 2A. Niveles de PPARγ en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos		
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>	
Grupos 1 al 3 (Estudio 1, Protocolo 1)	Hígado: PPAR γ	
Protocolo 2B. Estudio Dosis-Respuesta del efecto del antagonista del PPARγ en el trasplante hepático de injertos esteatósicos		
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>	
14. TH+PPAR γ antagonista (6 trasplantes, 6 injertos Ob por cada dosis evaluada)	Plasma: Transaminasas Hígado: Estudio histológico	
Protocolo 2C. Lesión hepática tras la modulación farmacológica del PPARγ en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos		
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>	
15. TH+PPAR γ antagonista (12 trasplantes, 6 injertos Ob y 6 injertos Ln) 16. PCI+TH+PPAR γ agonista (6 trasplantes, 6 injertos Ob)	Plasma: Transaminasas Hígado: Estudio histológico	
Protocolo 2D. Relación entre el RBP4 y el PPARγ en el trasplante hepático de injertos esteatósicos		
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>	
Grupos 11 (Estudio 2, Protocolo 1B), 12 y 13 (Estudio 2, Protocolo 1C)	Hígado: PPAR γ	
Grupos 15 y 16 (Estudio 2, Protocolo 2C)	Hígado: RBP4	
17. TH+RBP4+PPAR γ agonista (6 trasplantes, 6 injertos Ob) 18. PCI+TH+anti-RBP4+PPAR γ antagonista (6 trasplantes, 6 injertos Ob) 19. TH+RBP4+PPAR γ antagonista (6 trasplantes, 6 injertos Ob)	Plasma: Transaminasas (grupos 17, 18 y 19) Hígado: Estudio histológico (grupos 17, 18 y 19), PPAR γ (grupo 19)	
Protocolo 3. Efecto de la AMPK sobre el RBP4 y el PPARγ en el trasplante de injertos esteatósicos		
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>	
20. TH+AMPK activador (6 trasplantes, 6 injertos Ob) 21. PCI+TH+AMPK inhibidor (6 trasplante, 6 injertos Ob)	Hígado: RBP4, PPAR γ	
Protocolo 4. RBP4 y PPARγ en los injertos hepáticos esteatósicos después de la isquemia fría		
<i>Grupos experimentales</i>	<i>Determinaciones analíticas</i>	
22. Isquemia (6 injertos Ob) 23. PCI+Isquemia (6 injertos Ob) 24. Isquemia+AMPK activador (6 injertos Ob) 25. PCI+Isquemia+AMPK inhibidor (6 injertos Ob)	Hígado: RBP4, PPAR γ	
Protocolo de administración de los fármacos utilizados		
Protocolo	Fármaco	Dosis y tiempo de pre-tratamiento
Protocolo 1B	RBP4 RBP4 recombinante	25, 50, 75, 100, 125, 175 o 200 μ g/kg vía intravenosa, 30 min antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
Protocolo 2B	PPAR γ antagonista GW9662	250, 500, 750, 1000, 1250 o 1500 μ g/kg vía intraperitoneal, 1 h antes del procedimiento quirúrgico en el donante.
Protocolo 1C, 2C y 2D	RBP4 Anti-RBP4 PPAR γ antagonista PPAR γ agonista	RBP4 recombinante Anticuerpo anti-RBP4 GW9662 Rosiglitazona
Protocolo 3 y 4	AMPK activador AMPK inhibidor	AICAR AraA
		100 mg/kg vía intravenosa, 5 min antes del procedimiento quirúrgico en el donante. 100 μ g/kg/min vía intravenosa, durante 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico en el donante.

Tabla 3. Diseño experimental y determinaciones analíticas del Estudio 2.

5. Determinaciones Analíticas

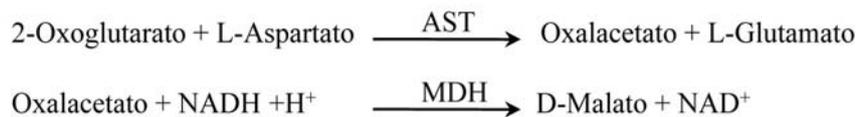
5.1 Parámetros de lesión hepática

Actividad de las Transaminasas

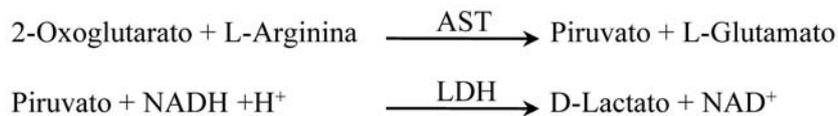
Las transaminasas aspartato amino transferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) son enzimas que se encargan de realizar la conversión de un aminoácido en un ácido carboxílico, participan en el metabolismo de los aminoácidos y son muy abundantes en hígado. En condiciones normales estas enzimas se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

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

Para la AST



Para la ALT



NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada.

Los resultados obtenidos se expresaron en UI/L.

Estudio histológico del tejido hepático

Las muestras se procesaron según procedimientos estándar para su estudio mediante microscopía óptica. Inmediatamente después de la extracción las muestras se fijaron al menos durante 24 h en formaldehído tamponado al 4% (Panreac, Barcelona, España). Tras la inclusión en parafina, las muestras se cortaron con un microtomo en secciones de 4-5 μm. Se realizó la tinción de Hematoxilina y Eosina (HyE) siguiendo los procedimientos convencionales.

Para evaluar la severidad de la lesión hepática, los cortes se clasificaron por un método de conteo utilizando la siguiente escala: grado 0, lesión mínima o sin evidencia de lesión; grado 1, lesión consistente en vacuolización citoplasmática y picnosis nuclear focal; grado 2, lesión de moderada a severa con picnosis nuclear extensa, hipereosinofilia citoplasmática y pérdida del contorno celular; grado 3, necrosis severa con desaparición de los cordones de hepatocitos, hemorragias e infiltrados de neutrófilos.^{182,265}

Para evaluar el grado de esteatosis hepática se congeló el tejido hepático y se utilizó la tinción de Red Oil O en secciones de 3 μm de acuerdo con los procedimientos estándar.

5.2 Parámetros de apoptosis

Tinción inmunohistoquímica TUNEL

Para detectar las células apoptóticas se evaluó la fragmentación nuclear del DNA de las células apoptóticas in situ mediante el método de tinción TUNEL utilizando el kit comercial ApopTag (Millipore, Billerica, MA, USA). Este método está basado en la incorporación al DNA de los nucleótidos presentes en el medio de reacción por la enzima TdT, que cataliza la adición de nucleótidos trifosfato unidos a digoxigenina a los extremos 3'-OH libres de las cadenas de DNA, dobles o simples, fragmentadas. A continuación el DNA se une a un anticuerpo anti-digoxigenina que se conjuga a una molécula de peroxidasa. El conjugado anticuerpo-peroxidasa genera enzimáticamente mediante sustratos cromógenos una tinción intensa, localizada, que puede ser detectada por inmunohistoquímica. Esta reacción es especialmente sensible al tipo de fragmentación del DNA que tiene lugar tras la apoptosis.²⁶⁶

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

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

Actividad de la Caspasa 3

La Caspasa 3 es una proteína perteneciente a una familia de cisteína-proteasas que está implicada en las fases finales de la muerte celular por apoptosis. Para la determinación de la actividad de la caspasa-3 en tejido hepático las muestras fueron homogenizadas en frío en el siguiente tampón: Tris-HCl (pH 7.5) 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, Dodecilsulfato de sodio (SDS) 0.1%, Deoxicolato de sodio 1%; y posteriormente fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 10 min a 4°C, y se recogió el sobrenadante en el que se determinó la actividad de la Caspasa 3.^{97,267}

La actividad Caspasa 3 se determinó en el sobrenadante mediante un kit comercial (Calbiochem, San Diego, CA, USA) que emplea un sustrato colorimétrico Ac-DEVD-pNA (N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina) que tras su escisión por la caspasa-3 presenta un incremento de absorción a 405 nm. Para ello las muestras se disuelven en un volumen total de 90 µl de tampón de ensayo y tras la adición de 10 µl de sustrato colorimétrico, la absorbancia se lee a una longitud de onda de

405 nm cada min durante 1 h. La cantidad de color amarillo producido es proporcional a la actividad de la caspasa-3 presente en la muestra. Los resultados obtenidos se expresaron en pmol/min.

5.3 Parámetros para determinar los niveles del RAS

Ensayo inmunoenzimático de Ang I

Para la determinación de Ang I, las muestras de tejido hepático se pulverizaron en un mortero metálico previamente enfriado con nieve carbónica. El tejido pulverizado se homogenizó en frío en 10 volúmenes de un tampón fosfosalino (K_2HPO_4 0,5 M y NaCl 1.5 M, pH 8,4) conteniendo perindoprilato 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Servier Laboratories, Melbourne, Australia), Ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 20 mM, 2,3-dimercaptopropanol 0,2 M y Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 8%. Esta mezcla de inhibidores se utiliza para prevenir la degradación de Ang I. A continuación el homogenado obtenido fue extraído en columnas Sep-Pak C18 (Waters, Saint-Quentin En Yvelines Cedex, Francia) usando 2 mL de acetonitrilo/ H_2O destilada/ácido acético (74:24:4, en volumen). Posteriormente los eluidos se evaporaron hasta sequedad en un concentrador de vacío Savant.²⁶⁸ Cada uno de los extractos así obtenidos se disolvieron en tampón de ensayo incluido en el kit comercial que se utilizó para determinación de los niveles de Ang I (Bachem, San Carlos, CA, USA) y para el cual se siguió el protocolo indicado por el fabricante, que se describe brevemente a continuación.

El kit utilizado es un ensayo inmunoenzimático en el cual un anticuerpo dirigido contra la Ang I y la Ang I presente en cada muestra son mezclados y colocados juntos en un pocillo de una inmunoplaaca. El anticuerpo se une a los pocillos especialmente tratados de la inmunoplaaca, mientras que la Ang I presente en una muestra determinada se une al anticuerpo inmovilizado. Después de la preincubación de estos componentes, se añade Ang I biotinilada. La Ang I biotinilada compite contra la Ang I no biotinilada presente en las muestras por los sitios de unión del anticuerpo inmovilizado. Después de la incubación, la Ang I biotinilada que no pudo unirse al anticuerpo inmovilizado es eliminada por medio de lavados y posteriormente se añade un conjugado peroxidasa-estreptavidina (SA-HRP) que se une al complejo inmovilizado anticuerpo primario/Ang I biotinilada. Después de lavar y eliminar el exceso del conjugado SA-HRP, se añade 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) que reacciona con el conjugado SA-HRP unido en el pocillo y provoca el desarrollo de un color. La intensidad del color que se desarrolla depende de la cantidad de Ang I biotinilada unida al anticuerpo inmovilizado. Así pues, a mayor cantidad de Ang I no biotinilada presente en las muestras que compite por la cantidad limitada del anticuerpo, menos Ang I biotinilada/conjugado SA-HRP se quedará inmovilizada en el pocillo y por lo tanto el TMB producirá menos color. La intensidad del color se determinó midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados obtenidos se expresaron en fmol/g de tejido hepático.

Ensayo inmunoenzimático de Ang II

Para determinar Ang II en tejido hepático, se realizó una extracción utilizando ácido acético caliente. Las muestras de hígado se colocaron en ácido acético 0,1 M conteniendo una tableta del cóctel de inhibidores de proteasas Complete (Roche, Basilea, Suiza) por cada 50 mL de la solución de ácido acético y se llevaron a ebullición durante 10 minutos. A continuación las muestras se

homogenizaron, posteriormente se enfriaron en hielo y entonces se centrifugaron a 2000 g durante 20 minutos a 4° C. Se recuperó el sobrenadante y se evaporó hasta sequedad en un concentrador de vacío Savant. Los extractos obtenidos se reconstituyeron con H₂O desionizada y se realizó entonces una extracción en fase sólida utilizando columnas Nova-Pak Fenil (Waters, Saint-Quentin En Yvelines Cedex, Francia). Las columnas se acondicionaron con 1 mL de metanol y después se lavaron con 1 mL de H₂O. Los extractos reconstituídos se aplicaron a las columnas. Las columnas Nova-Pak Fenil ya cargadas se lavaron con 1 mL de H₂O desionizada y a continuación la Ang II fue eluida con 0,5 mL de Metanol.²⁶⁹ Los eluidos se evaporaron a sequedad utilizando un concentrador de vacío Savant y posteriormente los extractos que se obtuvieron se reconstituyeron con el tampón de ensayo suministrado en el kit comercial que se utilizó para determinación de los niveles de Ang II (Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, Francia). Finalmente los extractos reconstituídos se centrifugaron a 3 000 g durante 10 minutos a 4° C. Para la determinación de Ang II se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente se describe el protocolo a continuación.

El kit utilizado para la determinación de la Angiotensina II es un ensayo inmunoenzimático en el cual un anticuerpo monoclonal específico frente a la Angiotensina II está inmovilizado en los pocillos de una inmunoplaca. Después de la reacción inmunológica con la Ang II presente en las muestras, la molécula atrapada es unida covalentemente a la inmunoplaca a través de sus grupos amino gracias a la reacción con glutaraldehído. A continuación se realiza un tratamiento desnaturante con borano-trimetilamina en HCl 2N/Metanol para que la Ang II pueda reaccionar con un anticuerpo monoclonal marcado con acetilcolinesterasa utilizado como trazador. A continuación el kit utiliza el reactivo de Ellman que contiene el sustrato enzimático para la acetilcolinesterasa y un cromógeno. De esta manera al interaccionar el trazador con el reactivo de Ellman, se desarrolla un color cuya intensidad es proporcional a la cantidad de trazador unido a cada pocillo, siendo a su vez proporcional a la cantidad de Ang II presente en la muestra. La intensidad del color se determinó midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados obtenidos se expresaron en fmol/g de tejido hepático.

Ensayo radioinmunométrico de Ang 1-7

Para la determinación de Ang (1-7) el tejido hepático se homogenizó a 4° C en una solución de etanol ácido (etanol 80% /0,1 N HCl) conteniendo los siguientes inhibidores de peptidasas: EDTA 15%, Pepstatina A y un inhibidor de renina. El homogenado se centrifugó a 12000 rpm por 20 min a 4°C, y el sobrenadante se recuperó y entonces se acidificó con ácido heptafluorobutírico (HFBA) 1%. Esta solución se dejó a -20°C durante 24 horas y después se centrifugó a 3 000 rpm durante 15 min a 4° C. El sobrenadante obtenido se concentró hasta 1 mL utilizando un concentrador de vacío Savant. A continuación se añadió 9 mL de HFBA 0,1% al sobrenadante remanente, se mezcló en un agitador tipo vórtex y se procedió a realizar una extracción en fase sólida utilizando columnas Sep-Pak de C18 (Waters, Saint-Quentin En Yvelines Cedex, Francia). Las columnas se acondicionaron con 5 mL de metanol ácido (metanol 80% /HFBA 0,1%) y después se lavaron con 10 mL de HFBA 0,1%. Los extractos se aplicaron a las columnas y después se realizó un lavado con 10 mL de HFBA 0,1% y otro lavado más con 5 mL de H₂O desionizada. Posteriormente la Ang (1-7) fue eluida con 3 mL de metanol ácido. Los eluidos se evaporaron a sequedad utilizando concentrador de vacío Savant y se reconstituyeron en un tampón Tris con albúmina sérica bovina 0,1% para proceder a la cuantificación de los niveles de Ang (1-7) presente en las muestras.^{270,271}

La Ang (1-7) se determinó mediante un método de radioinmunoensayo diseñado por el grupo del Dr. Carlos M. Ferrario en el Hypertension and Vascular Research Center, de la Wake Forest University School of Medicine de Winston-Salem, NC, USA.^{272,273} Este mismo grupo de investigación produjo el anticuerpo contra la Ang (1-7) de rata utilizado en el ensayo. Los niveles mínimos detectables del ensayo fueron 1,39 fmol de Ang (1-7) y el coeficiente de variación intraensayo fue de 8%. El anticuerpo no reacciona de forma cruzada con la Ang I ni con la Ang II. Los resultados obtenidos se expresaron en fmol/g de tejido hepático.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de Angiotensinógeno y ACE

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

A continuación se realizó la retrotranscripción del RNA utilizando el kit comercial Ready-To-go You-Prime First Strand Beads (GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, Reino Unido). Para este caso se partió de 5 µg de RNA por cada muestra y se siguieron las especificaciones del kit para obtener el cDNA. Finalmente se realizó RT-PCR partiendo de 75 ng del cDNA obtenido y usando sondas/primer TaqMan Gene Expression Assay prediseñadas y validadas por la casa comercial que las sintetiza (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las sondas/primer utilizadas en esta determinación fueron las siguientes: Rn00593114_m1 para angiotensinógeno, Rn00561094_m1 para ACE y Rn00667869_m1 para β-Actina. El ensayo de Real Time PCR para analizar la expresión génica con las sondas/primer mencionadas se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. También se llevaron a cabo experimentos control de la eficiencia del ensayo. La cuantificación de la expresión génica del angiotensinógeno y de la ACE se realizó aplicando el método de $\Delta\Delta C_t$ usando la β-Actina como gen de referencia o normalizador, y el grupo experimental Sham (grupo experimental 1) como calibrador para realizar el cálculo comparativo.²⁷⁴ La Real Time PCR se llevó a cabo en un termociclador iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los resultados se reportaron como el número de incrementos de la expresión del mRNA (con respecto al grupo calibrador).

Western blot de ACE2

La determinación de ACE2 se realizó en tejido hepático, para lo cual las muestras de hígado se homogenizaron a 4°C en un tampón de Tris-HCl 20 mM (pH=7.5) que contenía Sucrosa 200 mM, Tritón X-100 1%, EDTA 1 mM, Na₃VO₄ 0.1 mM, NaF 10 mM, Ditiotreitól (DTT) 1 mM, PMSF 0.5 mM y una tableta del cóctel de inhibidores de proteasas Complete (Roche, Basilea, Suiza) por cada 50 ml de tampón. Los homogenados se centrifugaron a 12000 g durante 10 min a 4°C,²⁷⁵ se separaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de proteínas totales en los mismos tal y como se describe en el apartado correspondiente.

A continuación se procedió a realizar la técnica de Western blot para la detección de ACE2. Para esto se mezclaron alícuotas de los homogenados con un tampón de carga de electroforesis que contenía β -mercaptoetanol y tampón Laemli en proporción 1:20. La proporción del homogenado y el tampón de carga fue 1:1. Las proteínas se desnaturalizaron calentando la mezcla a 95°C durante 10 min. Se cargaron 50 μ g de proteína y se separaron las proteínas de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en un gel de poliacrilamida/SDS al 10% a un voltaje constante de 120 mV. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) con una intensidad de 370 mA durante 70 min. Después de esto, los geles se tiñeron con Comassie para asegurar que se había cargado igual cantidad de proteína y que las proteínas se habían transferido a la membrana de PVDF. Las membranas se incubaron en un tampón de bloqueo formado por una solución salina tamponada con Tris que contiene Tween-20 (TTBS) a pH=7.5 y leche en polvo no grasa al 3% durante 60 min a temperatura ambiente. A continuación las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario policlonal anti-ACE2 de rata (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) preparado en dilución 1:1000 disuelto en tampón de bloqueo. Al día siguiente, las membranas se lavaron con TTBS pH=7.5 y después se incubaron con el anticuerpo secundario durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) que fue preparado en dilución 1:2000 disuelto en tampón de bloqueo. Después de lavar la membrana con TTBS y finalmente con solución salina tamponada con Tris (TBS), se procedió a realizar la detección de las proteínas mediante el kit de quimioluminiscencia Immun-Star HRP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar preteñido Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y se utilizó un control positivo para ACE2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) que se analizó en paralelo a las muestras. Para ACE2 se detectó una banda a 90 kDa.

La estimación cuantitativa de las proteínas en las membranas se estandarizó respecto a la β -actina. Para ello las membranas se re-incubaron con un anticuerpo primario anti- β -actina de rata (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) preparado en dilución 1:1000 disuelto en tampón que contenía TTBS pH=7.5 y leche en polvo no grasa 5%, durante toda la noche a 4° C y se siguió el proceso descrito para el Western blot de la ACE2 hasta obtener la señal de la β -actina con el kit de quimioluminiscencia mencionado previamente. El anticuerpo secundario para el Western blot de β -actina fue un anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) preparado en dilución 1:5000 disuelto en el mismo tampón utilizado para el anticuerpo primario. Para la β -actina se detectó una banda a 42 kDa.

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

Proteínas totales

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

solución ácida presenta el colorante azul de Coomassie en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. La concentración de proteínas en la muestra es directamente proporcional a la absorbancia observada a una longitud de onda de 595 nm. Para la curva patrón se utilizó una solución de albúmina de 4.75 mg/ml, a partir de la cual se realizaron 6 diluciones mitad. Los resultados obtenidos se expresaron en mg/ml.

5.4 Parámetros para determinar los niveles de RBP4

Para evaluar los niveles de RBP4 presentes en el tejido hepático, se realizaron las determinaciones que se describen a continuación.

Ensayo inmunoenzimático de RBP4

Para determinar los niveles de RBP4, las muestras de tejido hepático se homogenizaron en frío en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Deoxicolato de sodio 1% y Nonidet P40 1%) conteniendo también EDTA 5mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 50 mM, DTT 1 mM y una tableta del cóctel de inhibidores de proteasas Complete por cada 50 ml de tampón (Roche, Basilea, Suiza). Los homogenados se incubaron 20 minutos en hielo y después se centrifugaron a 10 000 g durante 30 min a 4°C.^{276,277} Se recuperaron los sobrenadantes y se determinó el RBP4 en los mismos utilizando un kit comercial (AdipoGen, Seúl, Corea) y siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se describe brevemente el protocolo que se siguió.

El kit utilizado para la determinación de RBP4 es un ensayo inmunoenzimático en el cual un anticuerpo policlonal específico para el RBP4 de rata y ratón está inmovilizado en los pocillos de una inmunoplaaca. Las muestras se colocaron en los pocillos y de esta manera, cualquier RBP4 presente en las muestras es capturado por el anticuerpo policlonal anti-RBP4 que se encuentra inmovilizado en los pocillos. Posteriormente, después de lavar la inmunoplaaca, se añade el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa. Después de lavar nuevamente la inmunoplaaca, se añade un substrato que reacciona con la peroxidasa y se desarrolla entonces un color. La intensidad del color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de RBP4 unido en el pocillo. Finalmente se añade una solución para detener el desarrollo del color y la intensidad del color es determinada midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados obtenidos se expresaron en ng/g de tejido hepático.

RT-PCR de RBP4

La detección de la expresión génica (mRNA) de RBP4 se determinó en tejido hepático utilizando la técnica RT-PCR siguiendo el mismo procedimiento que se ha explicado anteriormente para el angiotensinógeno y ACE en su apartado correspondiente. En resumen, se realizó la extracción de RNA de tejido hepático utilizando los kits RNeasy Lipid Tissue kit para hígados esteatósicos y el RNeasy Mini kit para los hígados no esteatósicos (Quiagen, Hilden, Alemania). Después se realizó la cuantificación del RNA obtenido y se verificó también la calidad del RNA. A continuación se realizó la retrotranscripción del RNA utilizando el kit comercial Ready-To-go You-Prime First Strand Beads (GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, Reino Unido). Finalmente se realizó RT-PCR a partir del cDNA obtenido y usando sondas/primer TaqMan Gene Expression Assay prediseñadas y validadas por la casa comercial que las sintetiza (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las sondas/primer utilizadas en esta determinación fueron las siguientes:

Rn01451317_g1 para RBP4 y Rn00667869_m1 para β -Actina. También se llevaron a cabo experimentos control de la eficiencia del ensayo. La cuantificación de la expresión génica de RBP4 se realizó aplicando el método de $\Delta\Delta C_t$ usando la β -Actina como gen de referencia o normalizador, y el grupo experimental Sham (grupo experimental 1) como calibrador para realizar el cálculo comparativo.²⁷⁴ La Real Time PCR se llevó a cabo en un termociclador iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los resultados se reportaron como el número de incrementos de la expresión del mRNA (con respecto al grupo calibrador).

5.5 Determinaciones analíticas para investigar mecanismos de protección

Microcirculación hepática

La medida del flujo sanguíneo se utilizó para evaluar los cambios relativos en la microcirculación hepática.²⁷⁸ La microcirculación hepática se evaluó mediante un estudio de la perfusión sanguínea utilizando un medidor de flujo sanguíneo basado en el efecto Doppler. Esta técnica se considera adecuada para el estudio de los cambios relativos en el flujo sanguíneo.²⁷⁹⁻²⁸¹ Para monitorizar la perfusión sanguínea hepática se utilizó una sonda de fibra óptica (Tipo R de cabezal epoxy, diámetro 15 mm, altura 7 mm), que en cada animal se colocó sobre los mismos puntos de la superficie hepática. El resultado se consideró como la media de la medida de los cinco puntos de la superficie hepática. El valor del flujo sanguíneo se expresó como porcentaje del valor basal (valor en el grupo Sham).^{281,282}

Oxido Nítrico

Para evaluar la producción de NO en el tejido hepático se determinaron los parámetros que se describen a continuación.

Ensayo colorimétrico de Nitritos y Nitratos

El NO puede reaccionar con numerosas moléculas presentes en el organismo y generar como productos finales *in vivo* el nitrito (NO_2^-) y el nitrato (NO_3^-). La proporción relativa de nitrito y nitrato es variable y no puede ser determinada con certeza, así pues el mejor índice de la producción total de NO en la suma de ambos.²⁸³

La producción de NO en el tejido hepático se determinó midiendo la acumulación de nitritos y nitratos, para lo cual, las muestras de tejido hepático se homogenizaron en 2 mL de tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7.4) a 4° C y enseguida se determinó la concentración de proteínas totales en el homogenado siguiendo el procedimiento descrito previamente. Posteriormente, se desproteinizó el homogenado mezclando 500 μL de homogenado con 100 μL de HCl 1 N en un agitador tipo vórtex. Después de centrifugar, se recuperó el sobrenadante y en éstos se ajustó a pH 7.6 con 100 μL de NaOH 1 N y 300 μL de Tris-HCl 100 mM.^{139,159} Los niveles de nitritos y nitratos se determinaron en el sobrenadante mediante un kit comercial (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo se describe brevemente a continuación.

El kit colorimétrico para determinar nitritos y nitratos requiere de un proceso de dos etapas. El nitrato se redujo a nitrito por incubación durante 3 h con una nitrato reductasa en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH) y flavina adenina dinucleótido (FAD). En el segundo paso se determinó la concentración de nitritos mediante el

reactivo de Griess que convierte el nitrito en un compuesto coloreado. La intensidad del color desarrollado se determinó a través de espectrofotometría midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Los resultados se expresaron en nmol/mg proteína.

Western blot de NOSc y NOSi

Para determinar NOSc y NOSi, se homogenizaron muestras de tejido hepático a 4° C en un tampón de Tris base 20 mM (pH=8.0) que contenía EDTA 10 mM, NaCl 140 mM, glicerol 10%, Nonidet P40 1%, aprotinina 2.5 µg/ml, PMSF 2 mM e inhibidor de tripsina de soja 60 µg/ml. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min a 4°C.^{159,284,285} Se separaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de proteínas totales en los mismos siguiendo el procedimiento descrito en el correspondiente apartado.

A continuación se procedió a realizar la técnica de Western blot para la detección de NOSc y NOSi de manera similar a como se ha descrito en el apartado de Western blot de ACE2. En resumen, se mezclaron alícuotas de los homogenados con un tampón de carga de electroforesis en proporción 1:1. Se desnaturalizaron las proteínas y se cargaron 50 µg de proteína. A continuación se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida/SDS al 6% a un voltaje constante de 120 mV para separar las proteínas. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF con una intensidad de 350 mA durante 120 min. Las membranas se incubaron en un tampón de bloqueo formado por TTBS pH=7.5 y leche en polvo no grasa al 5% durante 60 min a temperatura ambiente. A continuación las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C ya sea con el anticuerpo primario monoclonal anti-NOSc de rata o con el anticuerpo primario monoclonal anti-NOSi de rata (ambos de Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) preparados en dilución 1:500 disueltos en tampón de bloqueo. Al día siguiente, las membranas se lavaron y después se incubaron con el anticuerpo secundario durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) que fue preparado en dilución 1:5000 disuelto en tampón de bloqueo. Después de lavar la membrana, se procedió a realizar la detección de las proteínas mediante el kit de quimioluminiscencia Immun-Star HRP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar preteñido Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y se utilizó un control positivo para NOSc y también para NOSi (ambos de Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) que se analizaron en paralelo a las muestras. Para NOSc se detectó una banda a 140 kDa y para NOSi se detectó una banda a 130 kDa.

La estimación cuantitativa de las proteínas en las membranas se estandarizó respecto a la β -actina. Para ello las membranas se procesaron tal y como se ha indicado en el apartado del Western blot de ACE2 donde también se describe el Western blot de β -actina. La banda de la β -actina se detectó a 42 kDa. La estimación cuantitativa de las proteínas de interés se realizó por densitometría, utilizando el sistema de análisis de imagen Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los resultados obtenidos se expresaron en unidades arbitrarias.

Western blot de p38 MAPK y ERK 1/2

Se determinaron p38 MAPK total, p38 MAPK fosforilada, ERK 1/2 total y ERK 1/2 fosforilada en tejido hepático y para ello las muestras de hígado se homogenizaron a 4° C en un tampón de Tris-HCl 50 mM (pH=7.5) que contenía NaCl 150 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 0.1 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tritón X-100 0.05%, y una tableta del cóctel de inhibidores de proteasas Complete por cada 50 ml de tampón (Roche, Basilea, Suiza). Los homogenizados se incubaron 15 minutos en hielo y se centrifugaron a 15 000 g durante 20 minutos a 4° C.^{61,286} Los sobrenadantes se recuperaron y se determinó la concentración de proteínas totales en los mismos siguiendo el procedimiento descrito en el correspondiente apartado.

A continuación se procedió a realizar la técnica de Western blot para la detección de p38 MAPK total, p38 MAPK fosforilada, ERK 1/2 total y ERK 1/2 fosforilada de manera similar a como se ha descrito en el apartado de Western blot de ACE2. En resumen, se mezclaron alicuotas de los homogenizados con un tampón de carga de electroforesis en proporción 1:1. Se desnaturalizaron las proteínas y se cargaron 100 µg de proteína. A continuación se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida/SDS al 12% a un voltaje constante de 120 mV para separar las proteínas. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF con una intensidad de 370 mA durante 70 min. Las membranas se incubaron en un tampón de bloqueo formado por TTBS pH=7.5 y leche en polvo no grasa al 3% durante 60 min a temperatura ambiente. A continuación las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con uno de los siguientes anticuerpos: anticuerpo primario policlonal anti-p38 MAPK total de rata, anticuerpo primario monoclonal anti-p38 MAPK fosforilada de rata, anticuerpo primario monoclonal anti-ERK 1/2 total, o con el anticuerpo primario monoclonal anti-ERK 1/2 fosforilada de rata (todos ellos de Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) preparados en dilución 1:1000 disueltos en tampón de bloqueo. Al día siguiente, las membranas se lavaron y después se incubaron con el anticuerpo secundario durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) que fue preparado en dilución 1:2000 disuelto en tampón de bloqueo. Después de lavar la membrana, se procedió a realizar la detección de las proteínas mediante el kit de quimioluminiscencia Immuno-Star HRP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar preteñido Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y se utilizó un control positivo para cada una de las proteínas determinadas (p38 MAPK total, p38 MAPK fosforilada, ERK 1/2 total, y ERK 1/2 fosforilada) (todos de Cell Signaling Technology, Beverly, MA) que se analizaron en paralelo a las muestras. Las bandas que se detectaron fueron: una banda a 43 kDa para la p38 total y para la p38 fosforilada; y dos bandas a 42 y 44 kDa para la ERK 1/2 total y para la ERK 1/2 fosforilada. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias.

La estimación cuantitativa de las proteínas en las membranas se estandarizó respecto a la β-actina. Para ello las membranas fueron procesadas tal y como se ha indicado en el apartado del Western blot de ACE2 donde también se describe el Western blot de β-actina. La banda de la β-actina se detectó a 42 kDa. La estimación cuantitativa de las proteínas de interés se realizó por densitometría, utilizando el sistema de análisis de imagen Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los resultados obtenidos se expresaron en unidades arbitrarias.

Estrés oxidativo

Para evaluar el estrés oxidativo se determinaron los siguientes parámetros:

Ensayo colorimétrico de MDA

El malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica y se utilizó como parámetro indirecto de estrés oxidativo.²⁸⁷ Los niveles de MDA se determinaron en muestras de hígado mediante el método del ácido tiobarbitúrico (TBA).²⁸⁸ En condiciones ácidas y a altas temperaturas el MDA reacciona con el TBA para dar lugar a un compuesto de color rosa, cuantificable por espectrofotometría.

Las muestras de tejido hepático congelado se homogenizaron en 2 ml de tampón Tris Base 0.1 M a pH=7 y se determinó la concentración de proteínas totales en el mismo, siguiendo el procedimiento descrito previamente en el apartado correspondiente. A 250 µl de este homogenado se le añadieron 250 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 40% para precipitar las proteínas. Se mezclaron en un agitador tipo vórtex y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se le añadió 250 µl de TBA 0.67% y se llevó a ebullición durante 15 min con lo que se desarrolló un color proporcional a la cantidad de MDA presente en las muestras.¹⁸³

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

Nitrotirosinas

Gran parte de los efectos perjudiciales del NO son mediados por el peroxinitrito, un producto de la reacción entre el NO y el superóxido, altamente oxidante y citotóxico. El peroxinitrito es una molécula muy inestable y altamente reactiva por lo que su producción es únicamente demostrable de forma indirecta, por ejemplo a través de los productos que forma, por ello la determinación de los niveles de nitrotirosinas se utiliza como marcador indirecto de la formación de peroxinitrito.²⁸⁹ Por lo tanto, para evaluar los niveles de nitrotirosinas se determinaron los siguientes parámetros que se describen a continuación.

Ensayo inmunoenzimático de nitrotirosinas

Para la determinación de los niveles de nitrotirosinas en el tejido hepático, las muestras se homogenizaron en 10 volúmenes de tampón Na₂HPO₄ 50 mM pH=7.4 a 4° C, posteriormente se centrifugaron a 20 000 g durante 30 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se determinó en el mismo la concentración de proteínas totales siguiendo el protocolo descrito en el apartado correspondiente.^{159,290,291}

La cuantificación de los niveles de nitrotirosinas en el sobrenadante se llevó a cabo mediante un kit comercial inmunoenzimático (HyCult Biotech, Uden, Holanda) siguiendo las indicaciones del fabricante. En resumen, las muestras y los estándares son incubadas en pocillos cubiertos con anticuerpos anti-Nitrotirosina. Posteriormente se añade un anticuerpo secundario biotinilado que se une a las nitrotirosinas capturadas y después se adiciona un conjugado SA-HRP que reacciona de forma específica con el anticuerpo secundario unido a las nitrotirosinas capturadas. Finalmente se utiliza TMB para desarrollar un compuesto coloreado. El color obtenido es proporcional a la cantidad de nitrotirosinas presentes en la muestra y la intensidad del color es determinada a través de la medición de la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados se expresaron en pmol/mg proteína.

Tinción inmunohistoquímica de nitrotirosinas

Para la detección de nitrotirosinas por inmunohistoquímica las muestras de tejido hepático se fijaron en formaldehído tamponado al 4% (Panreac, Barcelona, España), se incluyeron en parafina y se obtuvieron distintos cortes histológicos de cada muestra (3 µm). Los cortes se desparafinaron y rehidrataron de la siguiente manera: 5 min en xilol, 2 veces; 3 min en alcohol absoluto, 2 veces; 3 min en alcohol 96°, 2 veces; 3 min en alcohol 50°, 2 veces; 5 min en agua destilada, 3 veces. La inmunohistoquímica de las nitrotirosinas se realizó con el kit comercial Vectastain Universal Quick (Vector Lab, Burlingame, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, como paso inicial se realiza el bloqueo de las peroxidasas endógenas de la muestra. A continuación, los cortes se incuban con una solución de bloqueo (suministrada en el kit) al 2.5% durante 60 min y después se incuban durante 2 h con el anticuerpo primario anti-Nitrotirosina (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) preparado en dilución 1:200 en PBS con solución de bloqueo al 5%. Posteriormente las muestras se incubaron durante 60 min con un anticuerpo secundario biotinilado y a continuación se incubaron durante 60 min con un complejo SA-HRP. Finalmente las muestras se trataron con DAB y peróxido de hidrógeno con lo que se desarrolló un color marrón indicativo de la presencia de nitrotirosinas. Los cortes histológicos se tiñieron con hematoxilina para proporcionar una tinción de contraste. En uno de los cortes se omitió la adición del anticuerpo primario frente a nitrotirosinas para utilizar dicho corte como control negativo.^{159,292}

El marcaje positivo para nitrotirosinas se determinó observando las muestras con microscopía convencional. La cuantificación del grado de tinción de nitrotirosinas se realizó estableciendo una escala del 0-3: grado 0, tinción mínima o ausencia de tinción; grado 1, tinción leve; grado 2, tinción moderada; y grado 3, tinción intensa.²⁹³

PPAR γ

Para evaluar los niveles de PPAR γ presentes en el tejido hepático, se realizaron las determinaciones que se describen a continuación.

Ensayo inmunoenzimático de PPAR γ

Para determinar los niveles hepáticos de PPAR γ , las muestras de hígado se homogenizaron en frío en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Deoxicolato de sodio 1% y Nonidet P40 1%) conteniendo también EDTA 5mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 50 mM, DTT 1 mM y una tableta del cóctel de inhibidores de proteasas Complete por cada 50 ml de tampón (Roche, Basilea, Suiza).

Los homogenados se incubaron 20 minutos en hielo y después se centrifugaron a 10000 g durante 30 min a 4°C.^{276,277} Se recuperaron los sobrenadantes y se determinó el PPAR γ en los mismos utilizando un kit comercial (Antibodies-online GmbH, Aache, Alemania) y siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se describe brevemente el protocolo que se realizó.

El kit utilizado es un ensayo inmunoenzimático para detectar PPAR γ de rata. Los pocillos de la inmunoplaaca proporcionada en el kit han sido pre-cubiertos con un anticuerpo específico para el PPAR γ de rata. Las muestras son entonces añadidas al correspondiente pocillo y después de un tiempo de incubación, se adiciona un anticuerpo conjugado con biotina que es específico para PPAR γ y se incuban durante otro periodo de tiempo. Posteriormente, se añade un conjugado de avidina-peroxidasa a los pocillos y se incuban por un tiempo. Se adiciona entonces la solución sustrato de TMB. Solamente aquellos pocillos que contienen el complejo PPAR γ anticuerpo conjugado con biotina/ conjugado peroxidasa-avidina, mostrarán el desarrollo de un color que es proporcional a la cantidad de PPAR γ presente en cada muestra. La reacción se detiene por adición de ácido sulfúrico y finalmente la intensidad del color desarrollado se determina midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onde de 450 nm. Los resultados obtenidos se expresaron en ng/g de tejido hepático.

RT-PCR de PPAR γ

La detección de la expresión génica (mRNA) de PPAR γ se determinó en tejido hepático utilizando la técnica RT-PCR siguiendo el mismo procedimiento que se ha explicado anteriormente para el angiotensinógeno y ACE en su apartado correspondiente. En resumen, se realizó la extracción de RNA de tejido hepático utilizando los kits RNeasy Lipid Tissue kit para hígados esteatósicos y el RNeasy Mini kit para los hígados no esteatósicos (Quiagen, Hilden, Alemania). Después se realizó la cuantificación del RNA obtenido y se verificó también la calidad del RNA. A continuación se realizó la retrotranscripción del RNA utilizando el kit comercial Ready-To-go You-Prime First Strand Beads (GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, Reino Unido). Finalmente se realizó RT-PCR a partir del cDNA obtenido y usando sondas/primer TaqMan Gene Expression Assay prediseñadas y validadas por la casa comercial que las sintetiza (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las sondas/primer utilizadas en esta determinación fueron las siguientes: Rn00440945_m1 para PPAR γ y Rn00667869_m1 para β -Actina. También se llevaron a cabo experimentos control de la eficiencia del ensayo. La cuantificación de la expresión génica de RBP4 se realizó aplicando el método de $\Delta\Delta C_t$ usando la β -Actina como gen de referencia o normalizador, y el grupo experimental Sham (grupo experimental 1) como calibrador para realizar el cálculo comparativo.²⁷⁴ La Real Time PCR se llevó a cabo en un termociclador iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los resultados se reportaron como el número de incrementos de la expresión del mRNA (con respecto al grupo calibrador).

6. Estudio estadístico

El estudio estadístico se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA), y seguidamente se determinó el nivel de significación estadística con un test Student-Newman-Keuls, considerando los datos significativamente diferentes cuando $p < 0.05$. Los datos están expresados como valor de la media \pm error estándar de la media. Los estudios de dosis respuesta del RBP4 y el antagonista del PPAR γ se analizaron utilizando el programa Prism versión 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para obtener la dosis media efectiva (ED_{50}), se calculó un modelo de aproximación no lineal del método de mínimos cuadrados basado en una curva de competición usando un componente. Los datos se evaluaron mediante análisis de la varianza y seguidamente se realizó el test de Bonferroni.