



# 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](http://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](http://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](http://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

## **El RAS en la lesión hepática por I/R en el trasplante de hígados esteatósicos y no esteatósicos.**

### **1. Implicación de la Ang II 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.**

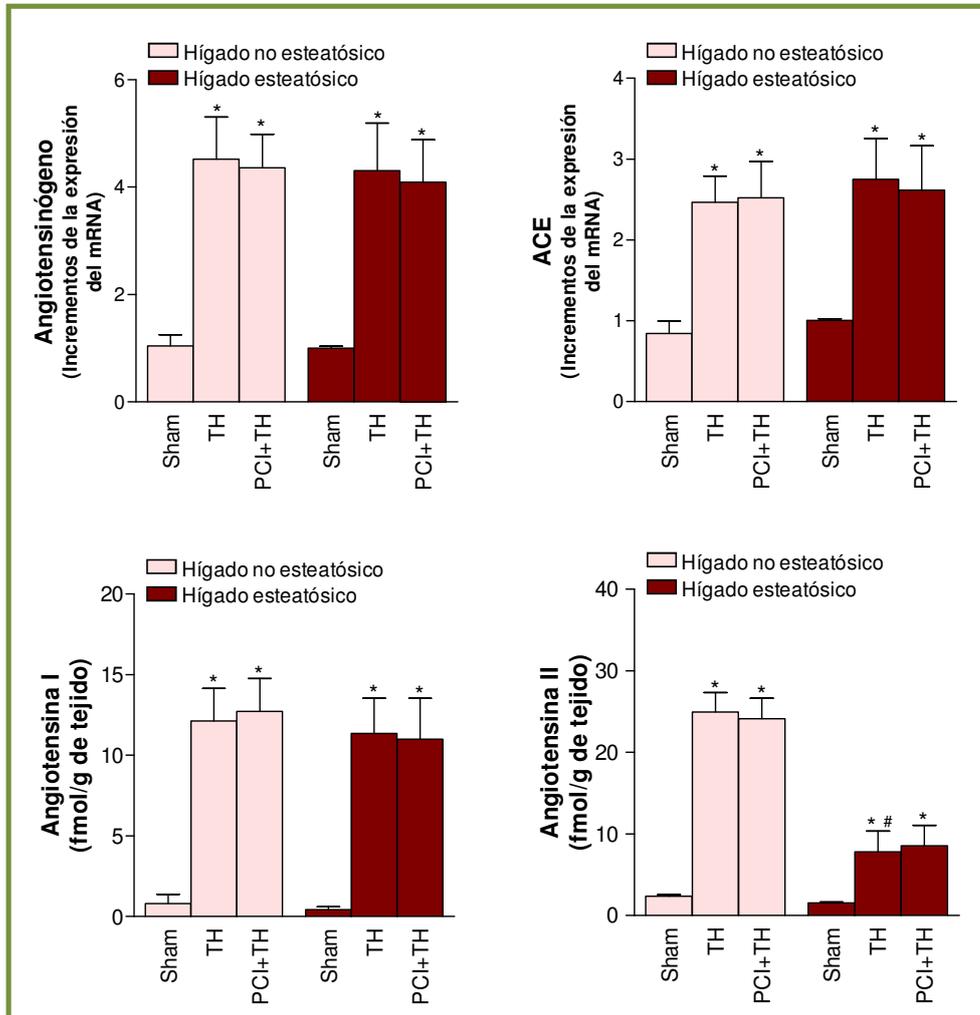
*¿Los niveles de Ang II y algunos precursores del RAS están alterados en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos? ¿Y en el PCI?*

En el grupo TH se observó un aumento en los niveles de los precursores de la Ang II (mRNA de angiotensinógeno, mRNA de ACE y Ang I) en ambos tipos de injertos hepáticos (**Figura 18**). De la misma manera, en el grupo TH se observó un aumento en los niveles de Ang II en ambos tipos de injertos, pero los niveles de Ang II fueron marcadamente más altos en los injertos no esteatósicos en comparación con los injertos esteatósicos. El grupo PCI+TH resultó en niveles de mRNA de angiotensinógeno, mRNA de ACE, Ang I y de Ang II similares a aquellos detectados en el grupo TH, tanto en injertos no esteatósicos como en injertos esteatósicos (**Figura 18**). Estos resultados sugieren que la Ang II no está implicada en los efectos beneficiosos del PCI sobre la lesión por I/R asociada al trasplante hepático en ambos tipos de injertos.

*¿El antagonista de los receptores AT1 y el antagonista de los receptores AT2 tienen algún efecto sobre el daño hepático en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos?*

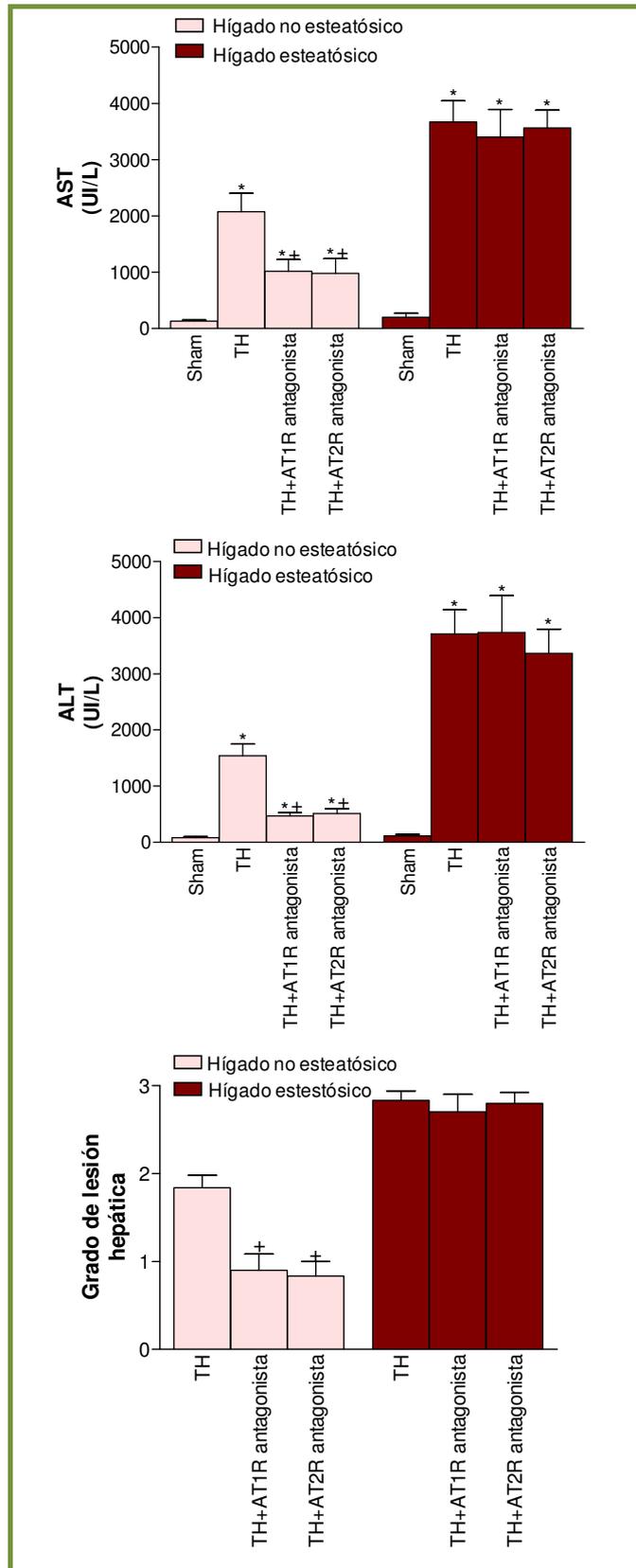
En los grupos TH+AT1R antagonista y TH+AT2R antagonista correspondientes a los hígados no esteatósicos, los niveles de transaminasas fueron inferiores a los observados en el grupo TH (**Figura 19**). Por otra parte, en los grupos TH+AT1R antagonista y TH+AT2R antagonista de los injertos esteatósicos, los niveles de transaminasas fueron similares a los observados en el grupo TH (**Figura 19**). Los resultados histológicos correspondientes al grado de lesión hepática (**Figura 19**) mostraron un patrón similar al descrito para las transaminasas. El estudio histológico de los hígados no esteatósicos pertenecientes al grupo TH reveló áreas multifocales de necrosis coagulativa moderada e infiltración de neutrófilos, distribuidas aleatoriamente en todo el parénquima hepático (**Figura 20A**). En los grupos TH+AT1R antagonista y TH+AT2R antagonista se observó una reducción en la extensión y el número de áreas necróticas en los hígados no esteatósicos, ya que sólo se encontraron áreas de necrosis incipiente de hepatocitos y áreas aisladas de necrosis coagulativa (**Figuras 20B y 20C**). En lo que respecta al estudio histológico de los hígados esteatósicos, en el grupo TH se observaron áreas extensas de necrosis coagulativa severa con

infiltración de neutrófilos (**Figura 20E**). Los grupos TH+AT1R antagonista y TH+AT2R antagonista resultaron en lesiones histológicas en los hígados esteatósicos (**Figura 20F y 20G**) similares a las observadas en el grupo TH (**Figura 20E**). Todos estos resultados fueron consistentes con los resultados histológicos correspondientes al grado de lesión hepática (**Figura 19**).

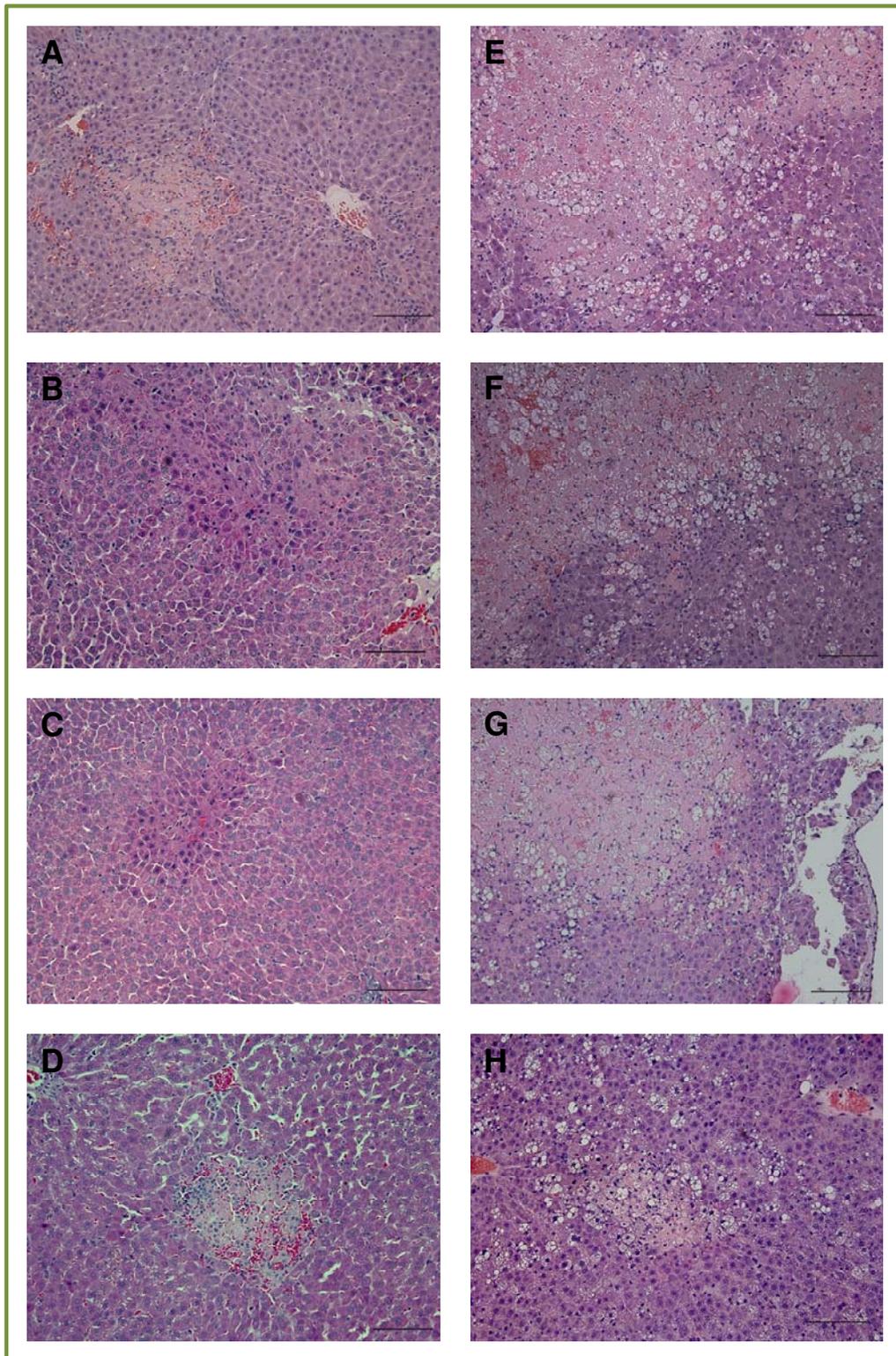


**Figura 18.** Ang II y sus precursores en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos y en los efectos protectores del PCI. \* $p < 0.05$  versus grupo Sham. Los injertos hepáticos esteatósicos mostraron niveles más bajos de Ang II en comparación con los injertos no esteatósicos (# $p < 0.05$ ).

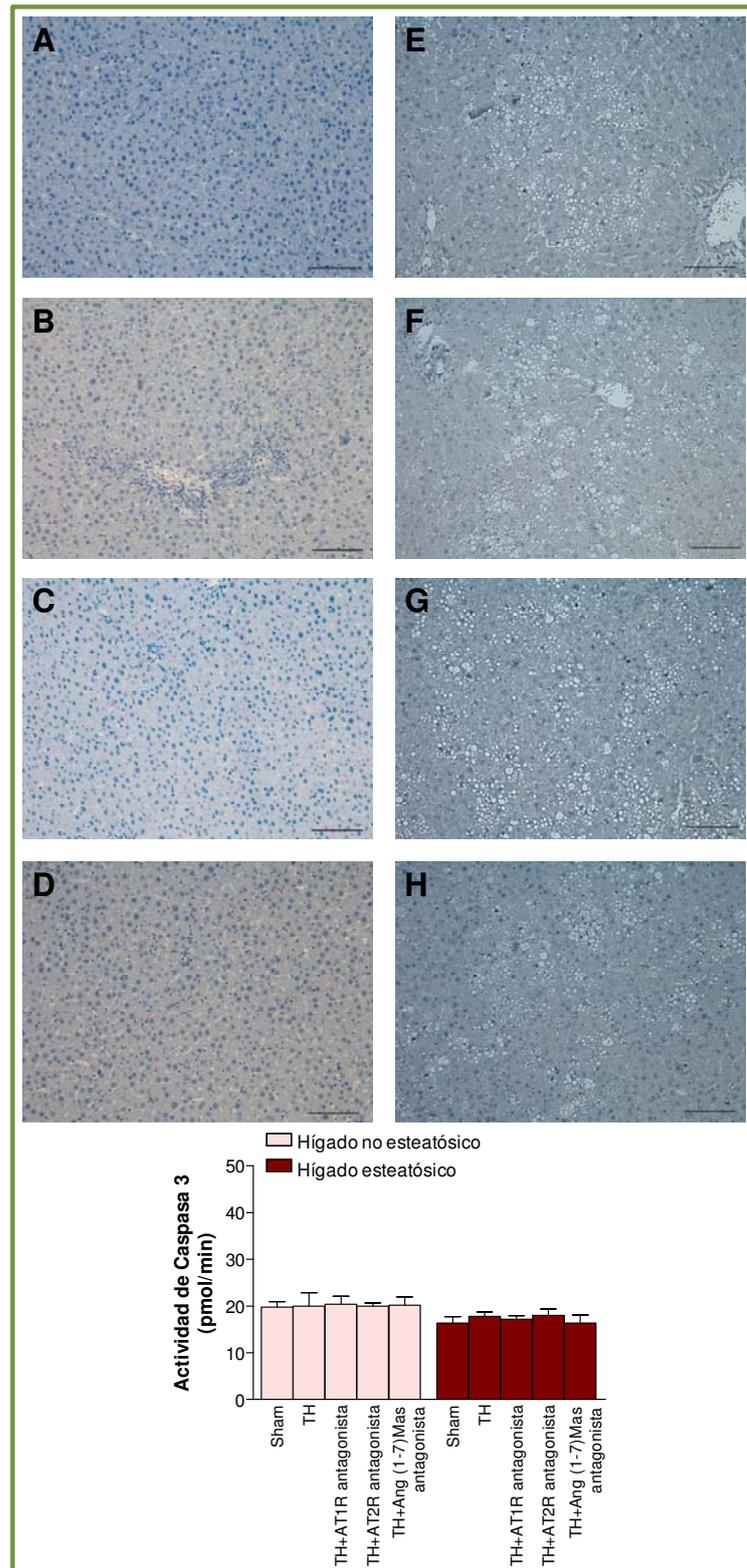
La evaluación de la presencia de células apoptóticas en el tejido hepático mediante la técnica TUNEL reveló la ausencia de hepatocitos TUNEL-positivos (tinción marrón) en todos los grupos (**Figura 21**). La actividad hepática de Caspasa 3 mostró niveles basales de actividad en todos los grupos (**Figura 21**).



**Figura 19.** Efecto de los antagonistas de los receptores de la Ang II sobre las transaminasas y el grado de lesión hepática en el trasplante de hígados esteatósicos y no esteatósicos. \*p < 0.05 versus grupo Sham, †p < 0.05 versus grupo TH.



**Figura 20.** Estudio histológico de los injertos hepáticos esteatósicos y no esteatósicos. A a H) Fotografías representativas de los cambios histológicos en el hígado. A) TH (injerto no esteatósico), área pequeña de necrosis coagulativa hepática con infiltración de neutrófilos. B) TH+AT1R antagonista (injerto no esteatósico), y C) TH+AT2R antagonista (injerto no esteatósico), área irregular de necrosis incipiente hepática. D) TH+Ang(1-7)Mas antagonista (injerto no esteatósico), lesiones hepáticas similares a las del grupo TH. E) TH (injerto esteatósico), necrosis coagulativa hepática con infiltración de neutrófilos. F) TH+AT1R antagonista (injerto esteatósico), y G) TH+AT2R antagonista (injerto esteatósico), lesiones hepáticas similares a las del grupo TH. H) TH+Ang(1-7)Mas antagonista (injerto esteatósico), área pequeña de necrosis coagulativa hepática con infiltración de neutrófilos. Tinción HyE, barra = 100  $\mu$ m.



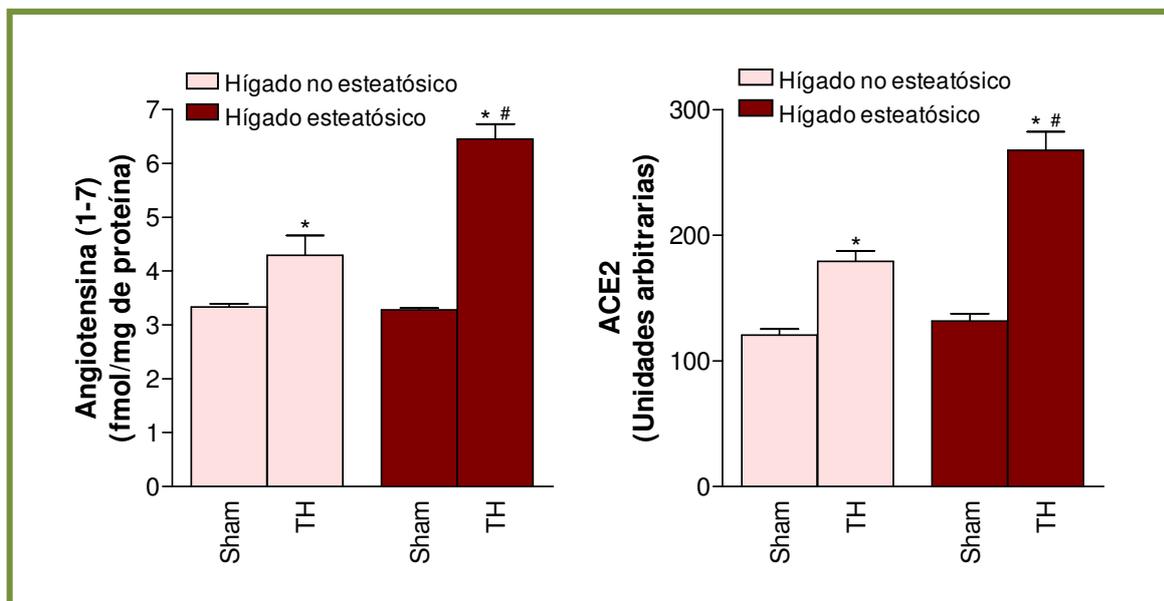
**Figura 21.** Efecto de los antagonistas de los receptores de la Ang II y del antagonista del receptor de la Ang (1-7) sobre la apoptosis en ambos tipos de injertos hepáticos. A a H) Células hepáticas apoptóticas identificadas con el ensayo inmunohistoquímico TUNEL. A) TH (injerto no esteatósico), B) TH+AT1R antagonista (injerto no esteatósico), C) TH+AT2R antagonista (injerto no esteatósico), D) TH+Ang(1-7)Mas antagonista (injerto no esteatósico), E) TH (injerto esteatósico), F) TH+AT1R antagonista (injerto esteatósico), G) TH+AT2R antagonista (injerto esteatósico), H) TH+Ang(1-7)Mas antagonista (injerto esteatósico). No se observaron células positivas para la tinción TUNEL en ningún grupo (Barra = 100  $\mu$ m). Se analizaron los niveles de actividad de la caspasa-3. No se observaron diferencias significativas en los niveles de actividad de Caspasa 3 en ningún grupo.

## 2. Implicación de la Ang (1-7) en la lesión por I/R asociada al trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos.

*¿Los niveles de Ang (1-7) y de la enzima responsable de su formación están alterados en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos?*

Los resultados obtenidos en el modelo experimental de trasplante hepático indicaron que la inhibición de los efectos de la Ang II solamente fue de utilidad para reducir la lesión por I/R en el trasplante de injertos hepáticos no esteatósicos. Por otro lado, aunque ambos tipos de injertos hepáticos (no esteatósicos y esteatósicos) fueron capaces de generar Ang II, curiosamente los injertos esteatósicos sintetizaron menos Ang II que los no esteatósicos. Estos hallazgos sugieren que los bajos niveles de Ang II observados en los injertos esteatósicos podrían explicar el porqué la inhibición de la Ang II no fue relevante para proteger a los injertos esteatósicos frente a la lesión por I/R. Sin embargo, esto llevó a plantearse la siguiente cuestión: ¿Por qué hay menos Ang II en los hígados esteatósicos que en los no esteatósicos sometidos a trasplante? Para responder a esta pregunta, se hipotetizó que los bajos niveles de Ang II observados en los injertos hepáticos esteatósicos podrían ser debidos a la formación de Ang (1-7). De hecho, se ha descrito que la Ang II puede ser degradada a Ang (1-7) por acción de la enzima ACE2.<sup>210</sup> Como ya se ha mencionado, la Ang (1-7) es otro potente efector endógeno del RAS que ejerce sus efectos biológicos a través de un receptor conocido como Mas.<sup>208</sup>

Así pues, se evaluaron los niveles de Ang (1-7) y de la enzima responsable de su formación, la ACE2 en ambos tipos de injertos hepáticos. En el grupo de TH se observaron un aumento en los niveles de Ang (1-7) en injertos no esteatósicos y esteatósicos, pero los niveles de Ang (1-7) fueron más altos en los hígados esteatósicos en comparación con los hígados no esteatósicos (**Figura 22**). Este mismo patrón se observó para los niveles de ACE2 (**Figura 22**).



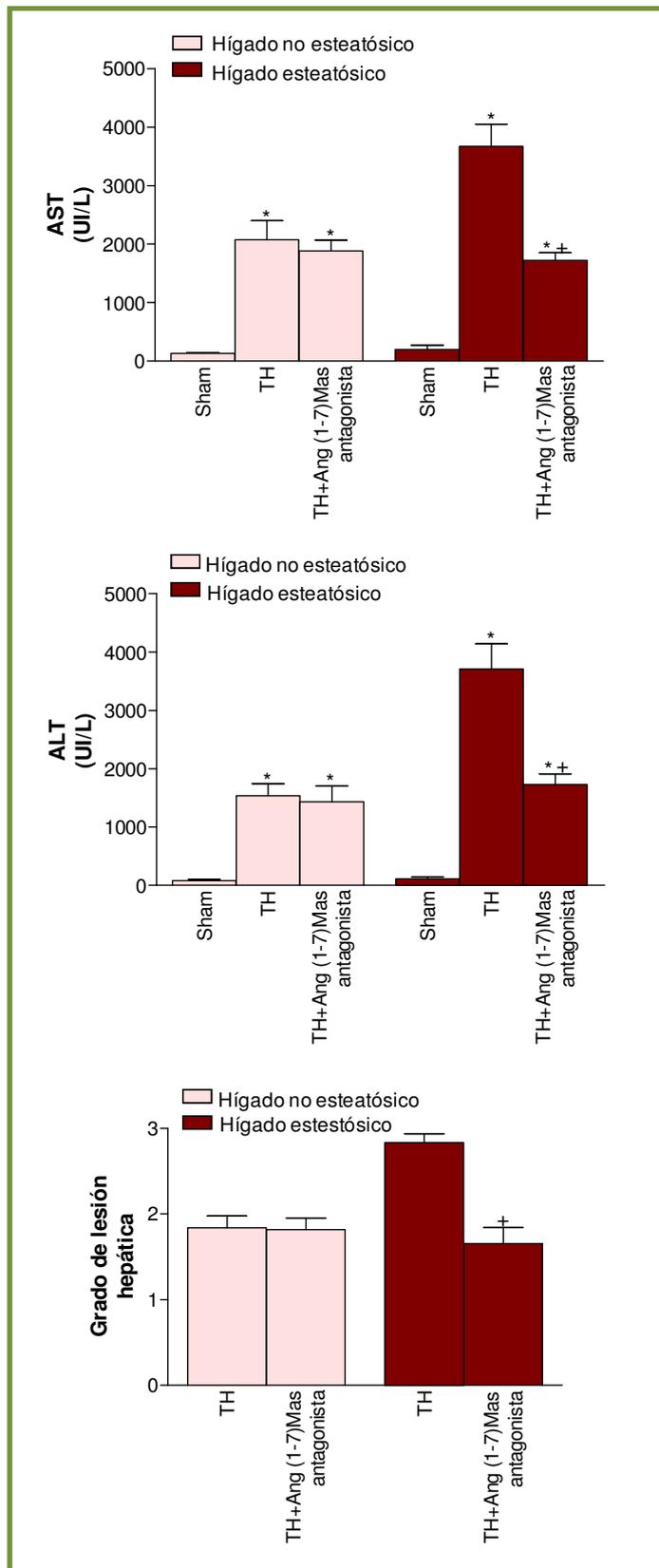
**Figura 22.** Ang (1-7) y la enzima responsable de su formación en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos. \*p < 0.05 versus grupo Sham. Los injertos hepáticos esteatósicos mostraron niveles más altos de Ang (1-7) y ACE2 en comparación con los injertos no esteatósicos (#p < 0.05).

*¿El antagonista del receptor Mas de la Ang (1-7) tiene algún efecto sobre el daño hepático en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos?*

A continuación se evaluó el efecto del antagonista del receptor Mas de la Ang (1-7) sobre el daño hepático en el trasplante de hígado. En el grupo experimental TH+Ang(1-7)Mas antagonista correspondiente a los hígados no esteatósicos, los niveles de transaminasas fueron similares a los observados en el grupo TH (**Figura 23**). Sin embargo, en hígados esteatósicos, el grupo TH+Ang(1-7)Mas antagonista resultó en niveles de transaminasas reducidos en comparación con el grupo TH (**Figura 23**). Los valores correspondientes al grado de lesión hepática (**Figura 23**) mostraron un patrón similar al descrito para las transaminasas.

El estudio histológico reveló que el grupo TH+Ang (1-7)Mas antagonista derivó en lesiones histológicas en hígados no esteatósicos (**Figura 20D**) similares a las observadas en el grupo TH (**Figura 20A**). Por otro lado, en comparación con el grupo TH de injertos esteatósicos (**Figura 20E**), en el grupo TH+Ang (1-7)Mas antagonista se observó una reducción en la extensión y el número de áreas necróticas en hígados esteatósicos, ya que se encontraron áreas multifocales de necrosis coagulativa moderada con infiltración de neutrófilos (**Figura 20H**). Todos estos resultados referentes al estudio histológico fueron consistentes con los resultados correspondientes al grado de lesión hepática (**Figura 22**).

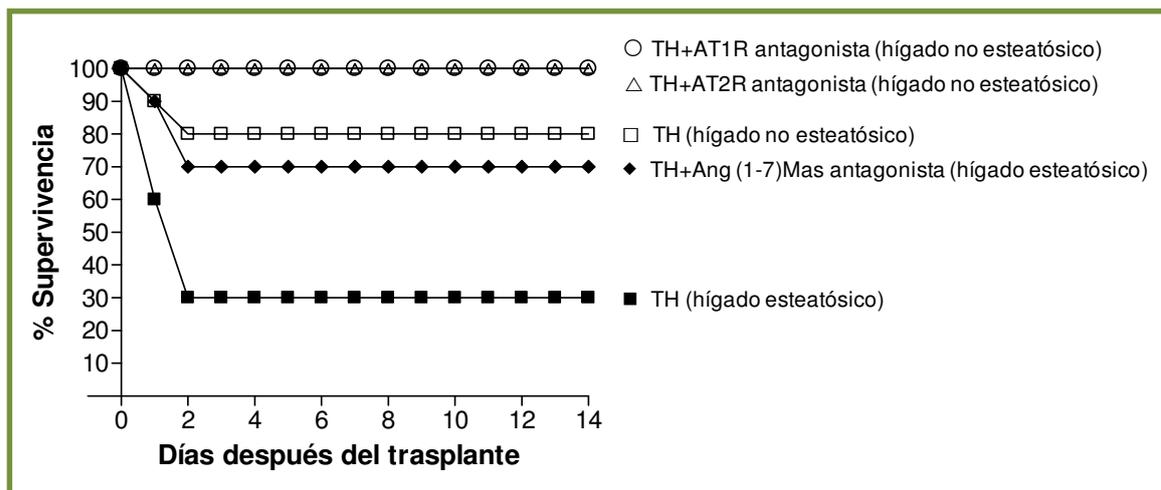
La evaluación de la presencia de células apoptóticas en el tejido hepático mediante la técnica TUNEL reveló la ausencia de hepatocitos TUNEL-positivos (tinción marrón) en todos los grupos (**Figura 21**). La actividad hepática de Caspasa 3 mostró niveles basales de actividad en todos los grupos (**Figura 21**).



**Figura 23.** Efecto del antagonista del receptor Mas de la Ang (1-7) sobre las transaminasas y el grado de lesión hepática en el trasplante de hígados esteatósicos y no esteatósicos. \*p < 0.05 versus grupo Sham, †p < 0.05 versus grupo TH.

### 3. Efecto de la inhibición de la acción de la Ang II y de la Ang (1-7) sobre la supervivencia de los receptores trasplantados.

Teniendo en cuenta que la inhibición de la acción de la Ang II y de la Ang (1-7) protegen a los hígados no esteatósicos y esteatósicos sometidos a trasplante a través de vías de señalización independientes del PCI (una estrategia protectora cuya relevancia en el modelo de trasplante hepático experimental está demostrada), se consideró importante evaluar la relevancia de las estrategias farmacológicas encaminadas a inhibir la acción del RAS, para lo cual se realizaron estudios de supervivencia. En los receptores trasplantados con injertos hepáticos no esteatósicos sin ningún tratamiento la supervivencia fue del 80% (8 de 10) a los 14 días tras realizar el trasplante hepático (Figura 24). El tratamiento con el antagonista de los receptores AT1 o con el antagonista de los receptores AT2R en receptores trasplantados con injertos hepáticos no esteatósicos resultó en una tasa del 100% de supervivencia (10 de 10). Los receptores trasplantados con injertos hepáticos esteatósicos sin ningún tratamiento mostraron un 30% de tasa de supervivencia (3 de 10) a los 14 días después del trasplante, y la mayoría de las muertes ocurrió dentro de los primeros 2 días post-trasplante. El tratamiento con el antagonista de los receptores Mas de la Ang (1-7) redujo la letalidad en los receptores trasplantados con injertos hepáticos esteatósicos, resultando en una tasa de supervivencia del 70% (7 de 10) a los 14 días post-trasplante (Figura 24).



**Figura 24.** Supervivencia de los receptores trasplantados con injertos hepáticos no esteatósicos o esteatósicos a los 14 días después del trasplante. Receptores trasplantados con injertos hepáticos no esteatósicos sin tratamiento (□), receptores trasplantados con injertos hepáticos no esteatósicos tratados con el antagonista del AT1R (○), receptores trasplantados con injertos hepáticos no esteatósicos tratados con el antagonista del AT2R (△), receptores trasplantados con injertos hepáticos esteatósicos sin tratamiento (■), receptores trasplantados con injertos hepáticos esteatósicos tratados con el antagonista del receptor Mas de la Ang (1-7) (◆).

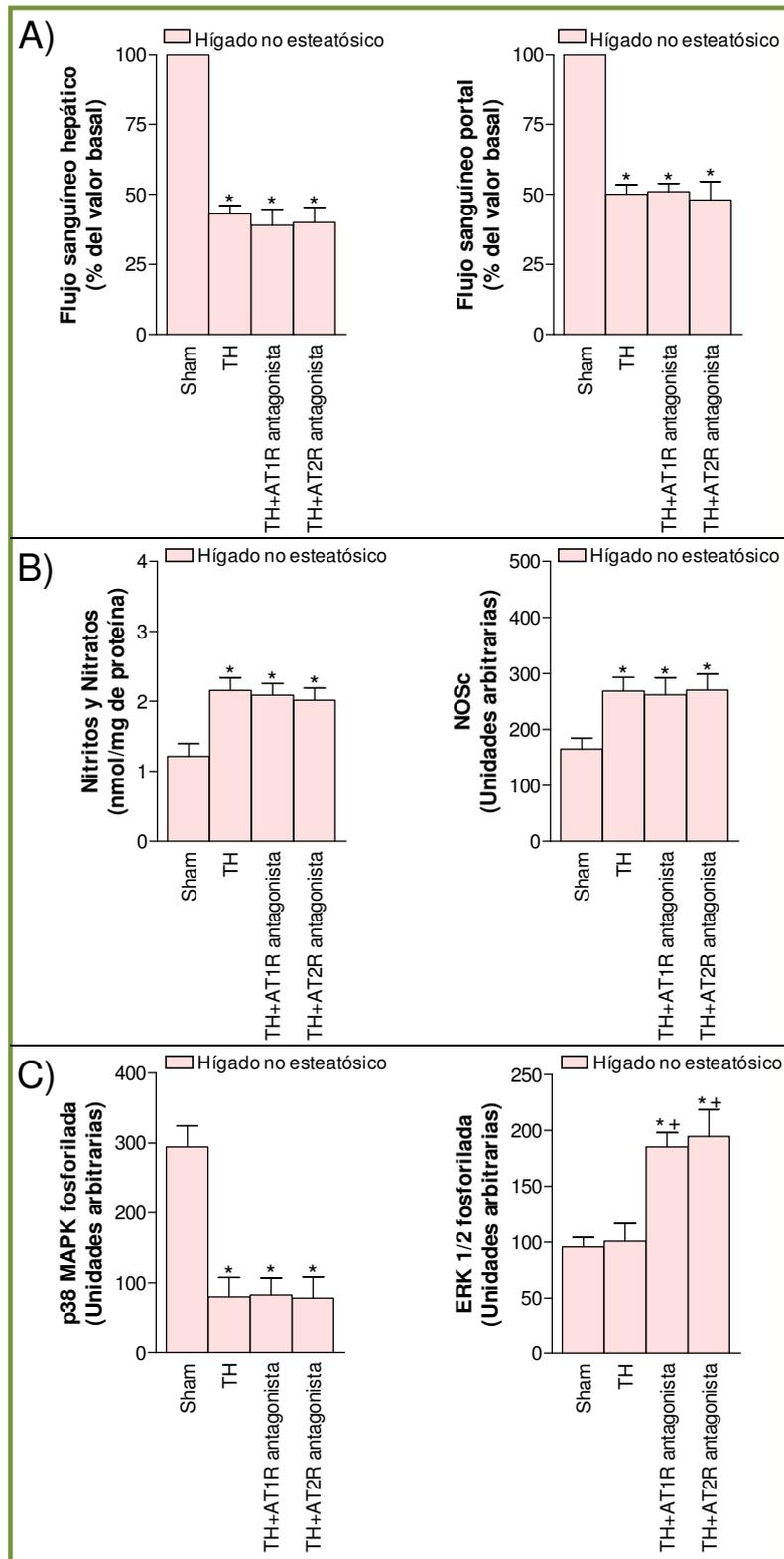
#### **4. Mecanismos protectores de los antagonistas de los receptores de la Ang II en el trasplante hepático de injertos no esteatósicos y del antagonista del receptor de la Ang (1-7) en el trasplante hepático de injertos esteatósicos.**

##### *¿Cómo protegen los antagonistas de los receptores de la Ang II a los injertos hepáticos no esteatósicos en el trasplante hepático?*

Para evaluar el efecto de los antagonistas de los receptores de la Ang II sobre las alteraciones microcirculatorias se estimó el flujo sanguíneo hepático y el flujo portal durante la reperfusión. Se observó una marcada reducción en la microcirculación hepática en los injertos no esteatósicos después del trasplante (TH) con respecto a los valores del grupo Sham (**Figura 25A**). Los antagonistas de los receptores de la Ang II no modificaron el flujo sanguíneo hepático en los injertos no esteatósicos en comparación con el grupo TH (**Figura 25A**). Estos resultados fueron confirmados con los valores obtenidos del flujo sanguíneo portal.

Es conocido que la Ang II ejerce acciones sobre el NO y la p38 MAPK en corazón.<sup>294,295</sup> Así pues, se evaluó si esos dos mediadores estarían relacionados con el efecto de los antagonistas de los receptores de la Ang II en la lesión de los injertos hepáticos no esteatósicos sometidos a trasplante. El grupo experimental TH resultó en un aumento en la producción de NO (valorado por los niveles de nitritos y nitratos y de la proteína NOSc) (**Figura 25B**) y en una reducción de los niveles de p38 MAPK fosforilada (**Figura 25C**) en comparación con el grupo Sham. Por otro lado, en los grupos TH+AT1R antagonista y TH+AT2R antagonista se observaron niveles de nitritos y nitratos y de NOSc (**Figura 25B**) y de p38 MAPK fosforilada (**Figura 25C**) similares a los observados en el grupo TH. Estos resultados indicaron que ni el NO, ni la p38 MAPK, están implicados en los efectos protectores de los antagonistas de los receptores de la Ang II en el trasplante hepático de injertos no esteatósicos.

Se evaluó entonces la posible implicación de la ERK 1/2, ya que un estudio previo en fibrosis hepática indicaba que un antagonista de los receptores de la Ang II podría modular la activación de la ERK 1/2.<sup>296</sup> Tal como se muestra en la **Figura 25C**, los niveles de ERK 1/2 fosforilada en injertos hepáticos no esteatósicos del grupo TH fueron de la misma magnitud que los que se observaron en el grupo Sham. Sin embargo, en los grupos TH+AT1R antagonista y TH+AT2R antagonista se observó un aumento en la ERK 1/2 fosforilada en comparación con el grupo TH. Los niveles de proteína de la p38 MAPK total, iNOS y ERK 1/2 total no presentaron cambios en ninguno de los grupos evaluados (datos no mostrados).

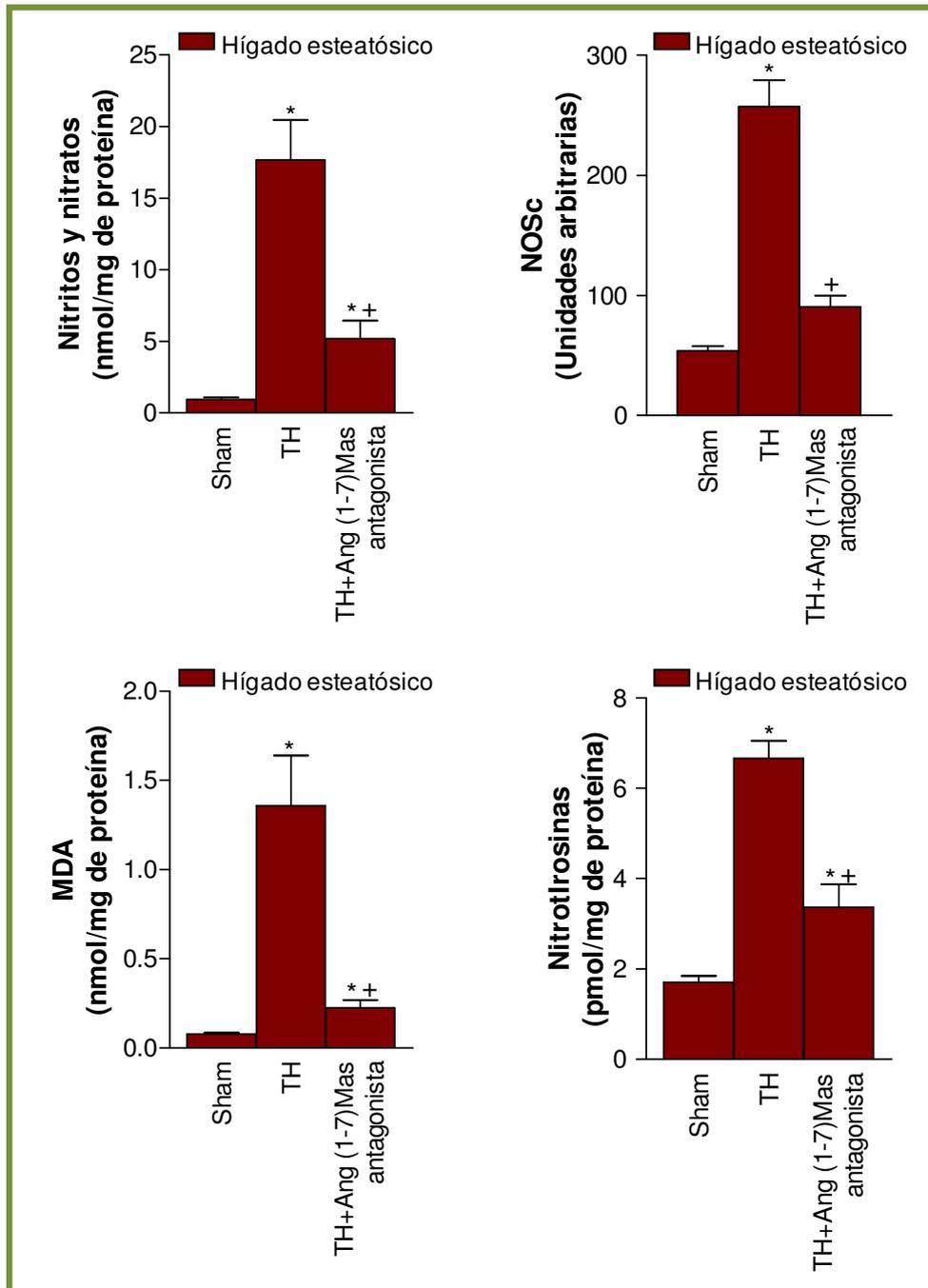


**Figura 25.** Mecanismos protectores de los receptores de los antagonistas de la Ang II en el trasplante de hígados no esteatósicos. A) Flujo sanguíneo hepático y flujo sanguíneo portal después del trasplante en injertos hepáticos no esteatósicos. B) Producción de NO determinada a través de los niveles de nitritos y nitratos y NOSc. C) p38 MAPK fosforilada y ERK 1/2 fosforilada. \* $p < 0.05$  versus grupo Sham, \* $p < 0.05$  versus grupo TH.

*¿Cómo protege el Antagonista del receptor Mas de la Ang (1-7) a los injertos esteatósicos en el trasplante hepático?*

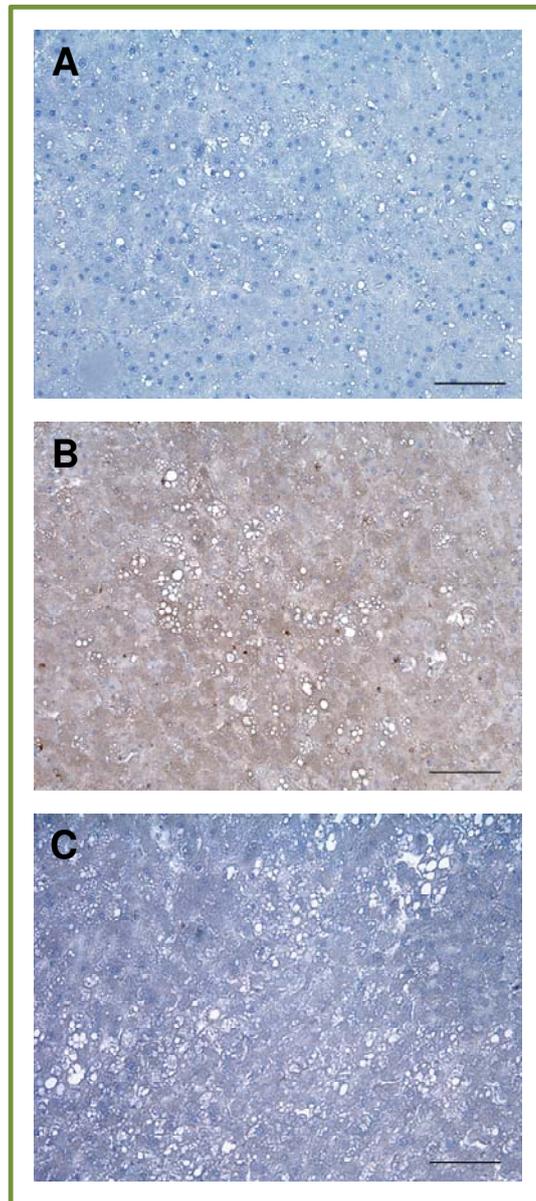
Es bien conocido que la formación de peroxinitrito puede ocurrir en condiciones de alta producción tanto de NO como de RLO, y su potencial oxidativo está bien documentado.<sup>297-300</sup> También se ha descrito que el peroxinitrito es la forma predominante de RLO en los injertos hepáticos esteatósicos sometidos a trasplante.<sup>159</sup> Teniendo en cuenta estas observaciones, se evaluó si la reducción en la formación de peroxinitrito podría ser el mecanismo protector del antagonista del receptor de la Ang (1-7) en el trasplante hepático de injertos esteatósicos.

En el grupo TH de injertos hepáticos esteatósicos, se observó un aumento en la generación de NO (valorado por los niveles de nitritos y nitratos) cuando se comparó con el grupo Sham (**Figura 26**). El NO sintetizado se originó a partir de la isoforma NOSc (**Figura 26**) ya que no hubo cambios en los niveles de la isoforma NOSi en ninguno de los grupos experimentales de estudio (datos no mostrados). De la misma manera que ocurrió con los parámetros relativos al NO, en el grupo de TH en injertos hepáticos esteatósicos aumentaron los niveles de MDA y nitrotirosinas en comparación con el grupo Sham, lo cual indicó la presencia de peroxinitritos en los injertos hepáticos esteatósicos (**Figura 26**). En el grupo TH+Ang (1-7)Mas antagonista se observó una reducción en la generación de NO y en los niveles de NOSc en injertos hepáticos esteatósicos en comparación con el grupo TH. Además, en los injertos hepáticos esteatósicos del grupo TH+Ang(1-7)Mas antagonista también se observó una reducción en los niveles de MDA y nitrotirosinas en comparación con el grupo TH, indicando así una reducción en los niveles de peroxinitrito en ese tipo de injerto hepático (**Figura 26**).



**Figura 26.** Mecanismos protectores del antagonista del receptor de la Ang (1-7) en el trasplante de hígados esteatósicos. Los nitritos y nitratos, niveles de NOSc, MDA y Nitrotirosinas se evaluaron en los injertos hepáticos esteatósicos. \* $p < 0.05$  versus grupo Sham, + $p < 0.05$  versus grupo TH.

El análisis por inmunohistoquímica de las nitrotirosinas fue consistente con estos resultados. En injertos hepáticos esteatósicos el estudio inmunohistoquímico reveló una tinción positiva (grado de tinción de nitrotirosinas 2) en el grupo TH (**Figura 27B**). En el grupo TH+Ang(1-7)Mas antagonista se evidenció una disminución de la tinción de nitrotirosinas (grado de tinción de nitrotirosinas 1) en injertos hepáticos esteatósicos (**Figura 27C**) cuando se comparó con el grupo TH.



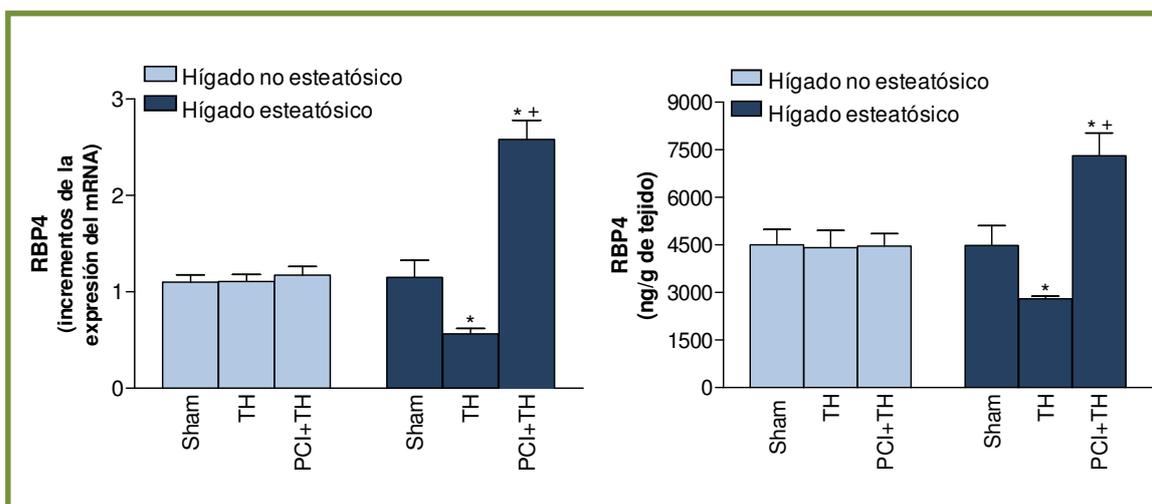
**Figura 27.** Detección inmunohistoquímica de nitrotirosinas en los injertos hepáticos esteatósicos. A) Sham, ausencia de tinción. B) TH, tinción moderada. C) TH+Ang(1-7)Mas antagonista, tinción leve. Barra = 100  $\mu$ m.

## El RBP4 en la lesión hepática por I/R asociada al trasplante de hígados esteatósicos y no esteatósicos.

### 1. Implicación 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.

*¿Los niveles de RBP4 están alterados en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos? ¿Y en el PCI?*

Los niveles de RBP4 (mRNA y proteína) en los injertos hepáticos no esteatósicos de los grupos TH y PCI+TH fueron similares a aquellos observados en el grupo Sham (**Figura 28**). En los injertos hepáticos esteatósicos, se observó una reducción en los niveles de RBP4 en el grupo TH en comparación con el grupo Sham (**Figura 28**). En el grupo PCI+TH, los niveles de RBP4 aumentaron en los injertos hepáticos esteatósicos en comparación con el grupo TH.

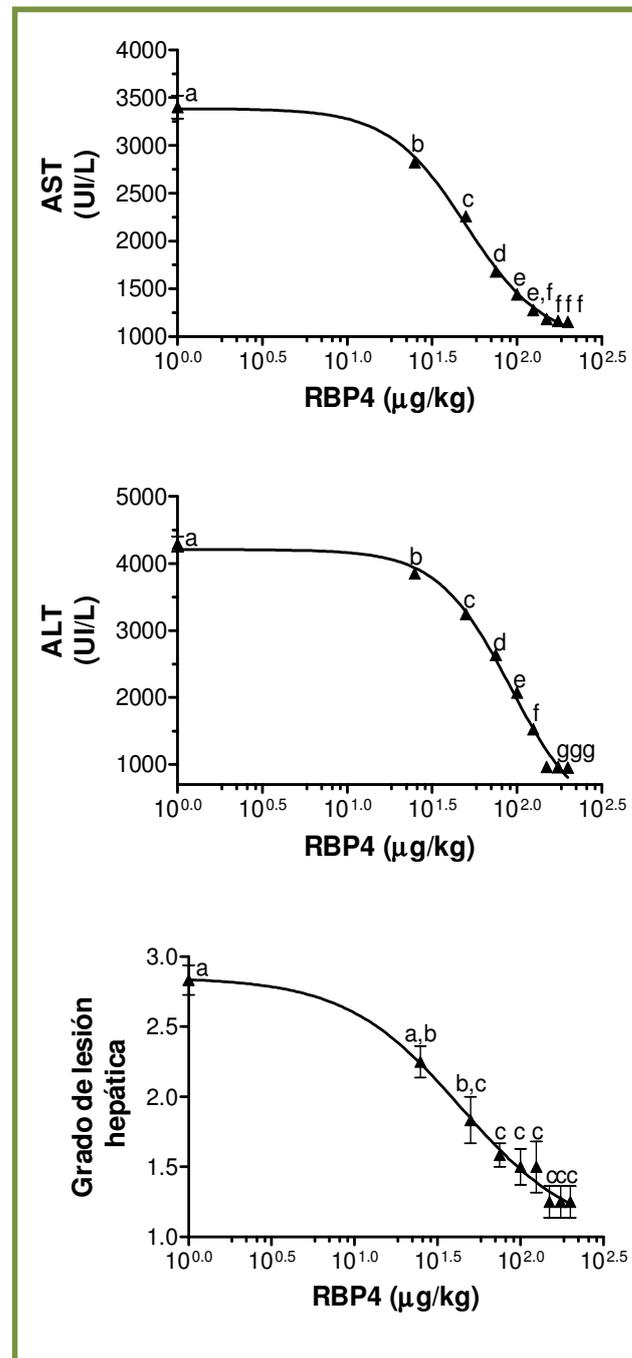


**Figura 28.** Niveles de RBP4 en el trasplante de hígados esteatósicos y no esteatósicos. Se evaluó la expresión génica del mRNA y los niveles de proteína del RBP4. \*p < 0.05 versus grupo Sham, \*p < 0.05 versus grupo TH.

*¿Existe un efecto dosis-respuesta del tratamiento con RBP4 sobre el daño hepático en el trasplante de hígados esteatósicos?*

A continuación se evaluó la relevancia de los cambios en RBP4 observados en los injertos hepáticos esteatósicos sometidos a trasplante sobre el daño hepático. Para esto, se realizó un estudio dosis-respuesta en el cual se administró RBP4 a dosis de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en la rata donante 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico, y se determinaron los efectos sobre el daño hepático en los receptores, 4 h después del trasplante (**Figura 29**). Los resultados obtenidos indicaron que el RBP4 protege a los injertos hepáticos esteatósicos frente al daño de una manera dosis-dependiente. Los valores de  $\text{ED}_{50}$  para AST, ALT y el grado de lesión hepática fueron  $50.29 \pm 1.05$ ,  $91.12 \pm 1.06$  y  $43.81 \pm 1.44$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente (**Figura 29**). La dosis más efectiva de RBP4 para reducir los parámetros de daño hepático en los injertos hepáticos esteatósicos fue de 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ya que dosis más altas no estuvieron asociadas con una mayor reducción del daño hepático (**Figura 29**). El tiempo de pretratamiento de RBP4 usado en el presente estudio (30 min antes del procedimiento quirúrgico) fue seleccionado en base a estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación. En dichos estudios los resultados obtenidos

demonstraron que ese tiempo de pretratamiento resultó en parámetros de daño hepático similares a aquellos observados con tiempos de pretratamiento más largos (60 o 120 min antes del procedimiento quirúrgico, datos no mostrados).

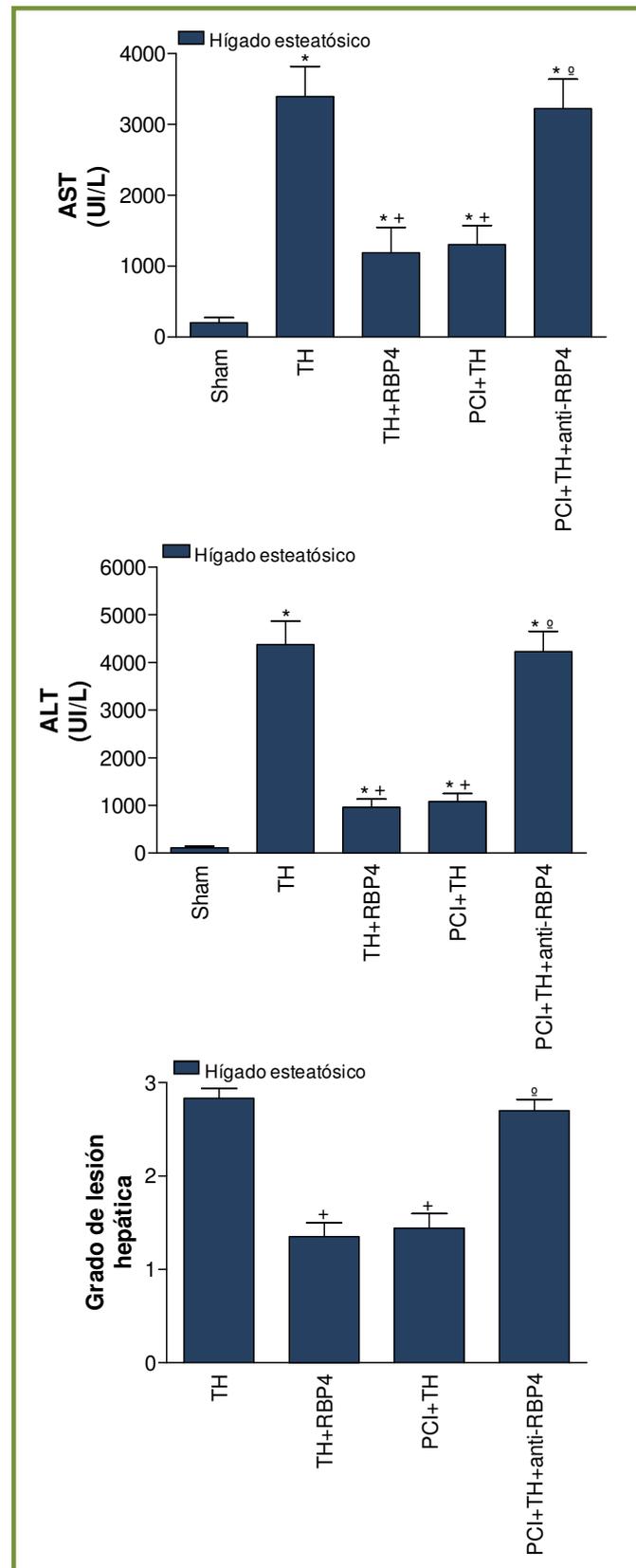


**Figura 29.** Estudio dosis-respuesta del RBP4 en el trasplante de hígados esteatósicos. Se evaluó el efecto del tratamiento con RBP4 sobre el daño hepático determinando los niveles de transaminasas y el grado de lesión hepática. Distintas letras representan diferencias significativas,  $p < 0.05$ .

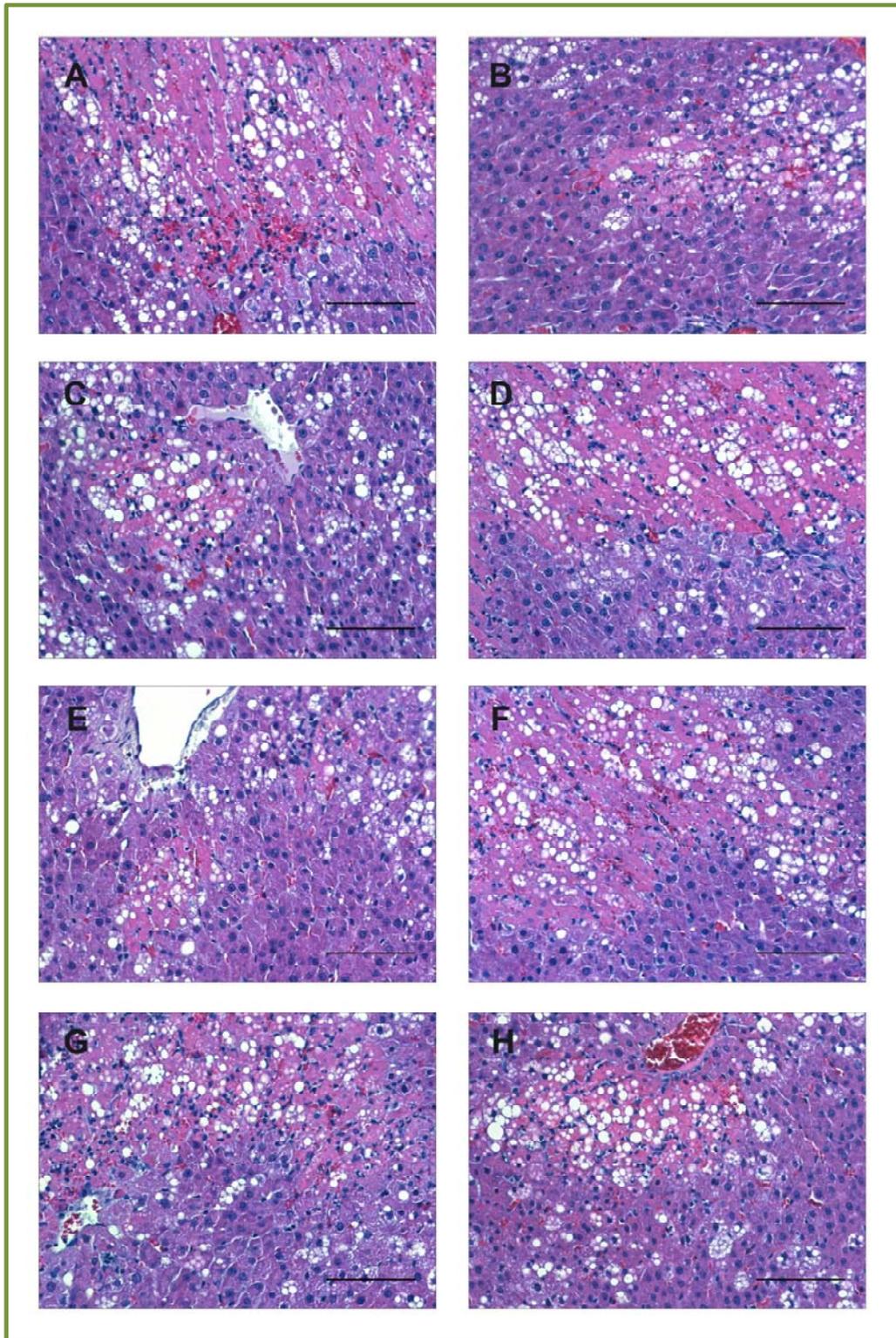
Tal y como se muestra en la **Figura 30**, el tratamiento con RBP4 a la dosis seleccionada, 150 µg/kg (grupo TH+RBP4), redujo los niveles de transaminasas en los injertos hepáticos esteatósicos con respecto a los valores registrados en el grupo TH. El tratamiento con RBP4 no protegió a los injertos no esteatósicos sometidos a trasplante. De hecho, los niveles de transaminasas y los valores del grado de lesión hepática del grupo TH+RBP4 fueron similares a los del grupo TH (AST: 2135±232 y 2075±329 UI/L para los grupos TH+RBP4 y TH, respectivamente; ALT: 1549±129 y 1540±205 UI/L para los grupos TH+RBP4 y TH, respectivamente; grado de lesión hepática: 1.80±0.20 y 1.80±0.12 para los grupos TH+RBP4 y TH, respectivamente).

A continuación se evaluó si el aumento en los niveles de RBP4 inducido por el PCI (grupo PCI+TH) protege a los injertos hepáticos esteatósicos. Para esto se intentó identificar la dosis de anticuerpo anti-RBP4 que al administrarse en el grupo PCI+TH, redujera los niveles de RBP4 a niveles similares a los que se observaron en el grupo TH. Entre las dosis que se evaluaron (1000, 3000 y 5000 µg/kg), la dosis de anticuerpo anti-RBP4 adecuada fue 3000 µg/kg (datos no mostrados). A esta dosis, la administración del anticuerpo anti-RBP4 en el grupo PCI+TH (grupo PCI+TH+anti-RBP4), resultó en niveles de proteína de RBP4 similares a aquellos registrados en el grupo TH (2804±80, 7316±709 and 2863±212 ng/g de tejido para los grupos TH, PCI+TH y PCI+TH+anti-RBP4, respectivamente). Este efecto fue asociado con niveles de transaminasas similares a aquellos detectados en el grupo TH (**Figura 30**). Los resultados histológicos correspondientes al grado de lesión hepática mostraron un patrón similar al descrito para las transaminasas (**Figura 30**). Así pues, la administración del anticuerpo anti-RBP4 en el grupo PCI+TH (grupo PCI+TH+anti-RBP4) eliminó los beneficios del PCI+TH sobre el daño hepático. El tiempo de pretratamiento del anticuerpo anti-RBP4 usado en el presente estudio (30 min antes del procedimiento quirúrgico) fue seleccionado en base a estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación. Los resultados de dichos estudios mostraron que ese tiempo de pretratamiento resultó en parámetros de daño hepático similares a aquellos observados con tiempos de pretratamiento más largos (60 o 120 min antes del procedimiento quirúrgico; datos no mostrados).

Los hallazgos histológicos revelaron que los injertos hepáticos esteatósicos del grupo TH mostraron áreas extensas de necrosis coagulativa severa con infiltración de neutrófilos (**Figura 31A**) que fueron reducidas en número y extensión en el grupo TH+RBP4 (**Figura 31B**). Las lesiones hepáticas observadas en los injertos hepáticos esteatósicos de los grupos PCI+TH (**Figura 31C**) y PCI+TH+anti-RBP4 (**Figura 31D**) fueron similares a aquellas observadas en los grupos TH+RBP4 (**Figura 31B**) y TH (**Figura 31A**), respectivamente.



**Figura 30.** Efecto de la modulación farmacológica del RBP4 sobre el daño hepático en el trasplante de hígados esteatósicos. Se evaluaron como parámetros de lesión hepática las transaminasas y el grado de lesión hepática. \* $p < 0.05$  versus grupo Sham, + $p < 0.05$  versus grupo TH, y ° $p < 0.05$  versus grupo PCI+TH.



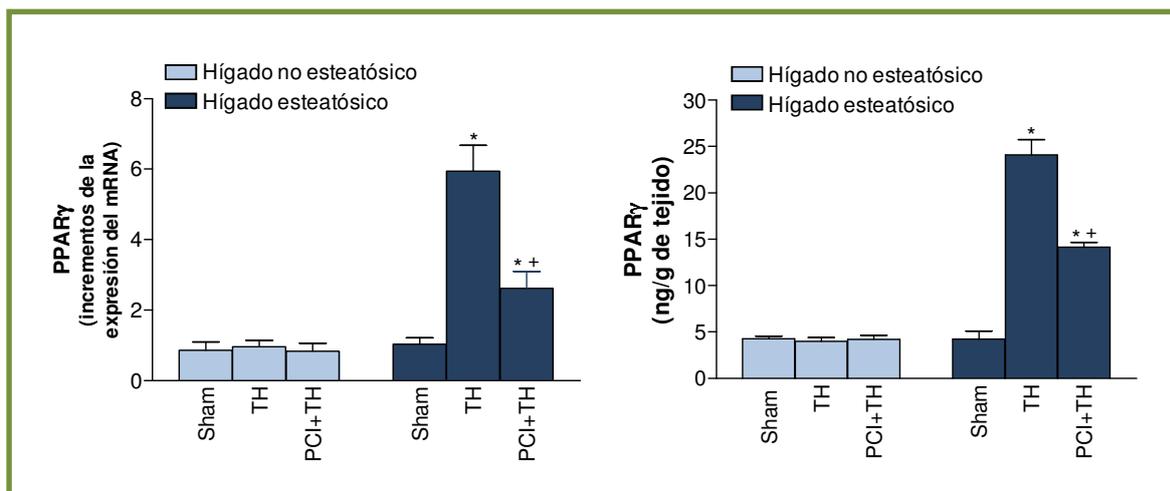
**Figura 31.** Lesiones histológicas en el trasplante de hígados esteatósicos. Fotografías representativas de los cambios histológicos en el tejido hepático de los grupos experimentales estudiados. A) TH, necrosis coagulativa hepática diseminada con infiltración de neutrófilos. B) TH+RBP4, área pequeña de necrosis coagulativa hepática con infiltración de neutrófilos. C) PCI+TH, E) TH+PPAR $\gamma$  antagonista, y H) PCI+TH+anti-RBP4+PPAR $\gamma$  antagonista, lesiones hepáticas similares a las del grupo TH+RBP4. D) PCI+TH+anti-RBP4, F) PCI+TH+PPAR $\gamma$  agonista, y G) TH+RBP4+PPAR $\gamma$  agonista, lesiones hepáticas similares a las del grupo TH. Tinción HyE, barra = 100  $\mu$ m.

## 2. Mecanismos protectores de las estrategias quirúrgicas o farmacológicas capaces de modular el RBP4 en el trasplante hepático con injerto esteatósico.

En base a estudios previos que han indicado que el PPAR $\gamma$  regula mediadores que son dianas moleculares del RBP4,<sup>255,256</sup> y a otros que han descrito que el PCI ejerce sus efectos protectores a través de una sobre-expresión de PPAR $\gamma$  en I/R normotérmica,<sup>215</sup> se investigó si el PPAR $\gamma$  podría estar implicado en los efectos del RBP4 sobre la lesión hepática en el trasplante de hígados esteatósicos. Para ello, primeramente se evaluó si el PPAR $\gamma$  juega un papel en la lesión hepática por I/R asociada al trasplante de injertos hepáticos esteatósicos y seguidamente se evaluó si existía una relación entre RBP4 y PPAR $\gamma$  en las mismas condiciones experimentales, tal como se describe en los resultados mostrados a continuación.

### ¿Los niveles de PPAR $\gamma$ están alterados en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos? ¿Y en el PCI?

Los niveles de PPAR $\gamma$  (mRNA y proteína) en los injertos hepáticos no esteatósicos de los grupos TH y PCI+TH fueron similares a aquellos que se observaron en el grupo Sham (Figura 32). En presencia de esteatosis, los niveles de PPAR $\gamma$  en el grupo TH fueron notablemente más altos que en el grupo Sham. En el grupo PCI+TH de injertos esteatósicos se observaron niveles reducidos de PPAR $\gamma$  en comparación con el grupo TH (Figura 32).

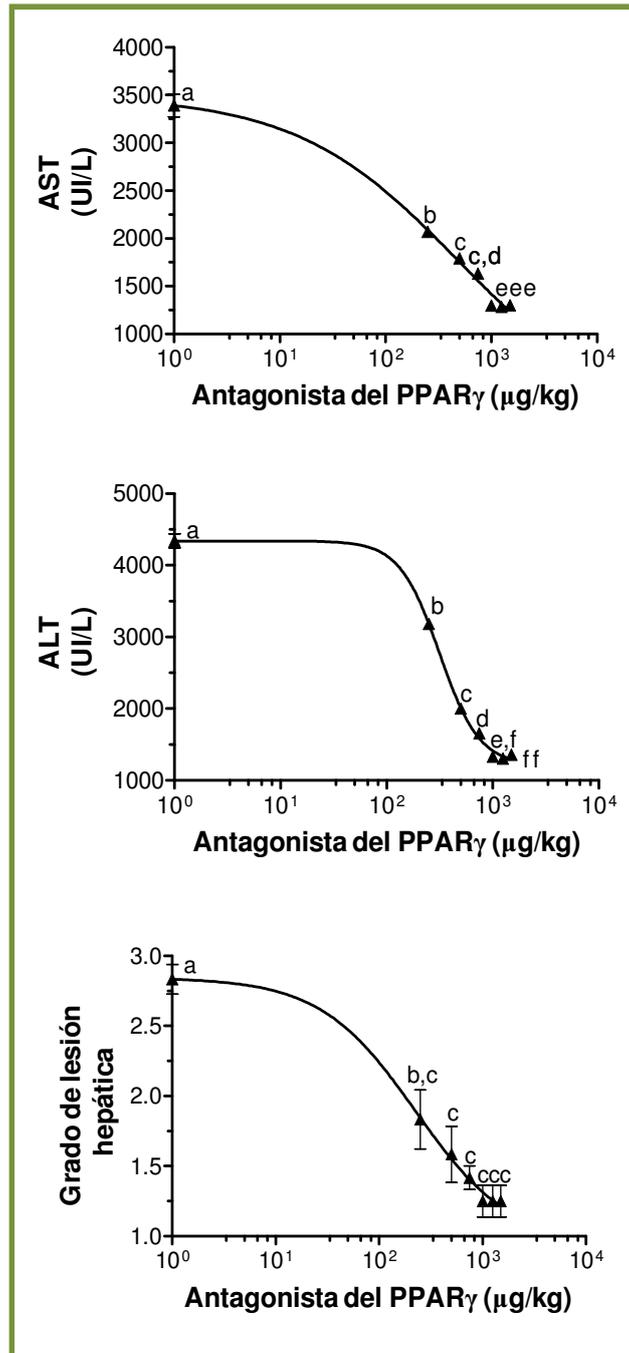


**Figura 32.** Niveles de PPAR $\gamma$  en el trasplante de hígados esteatósicos y no esteatósicos. Se evaluó la expresión génica del mRNA y los niveles de proteína del PPAR $\gamma$ . \*p < 0.05 versus grupo Sham, +p < 0.05 versus grupo TH.

### ¿Existe un efecto dosis-respuesta del tratamiento con el antagonista del PPAR $\gamma$ sobre el daño hepático en el trasplante de hígados esteatósicos?

A continuación se evaluó la relevancia de los cambios en PPAR $\gamma$  observados en los injertos hepáticos esteatósicos sometidos a trasplante sobre el daño hepático. Para esto, se realizó un estudio dosis-respuesta en el cual se administró un antagonista del PPAR $\gamma$  a dosis de 250, 500, 750, 1000, 1250 y 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en la rata donante 1 h del procedimiento quirúrgico, y se determinaron los efectos sobre el daño hepático en los receptores, 4 h después del trasplante (Figura 33). El antagonista del PPAR $\gamma$  protegió a los injertos hepáticos esteatósicos frente al daño de una manera dosis-dependiente. Los valores de ED<sub>50</sub> para AST, ALT y el grado de lesión hepática fueron 503.0 $\pm$ 5.53, 315.0 $\pm$ 1.03 y 224.9 $\pm$ 2.07  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente (Figura 33). La dosis más efectiva

del antagonista del PPAR $\gamma$  para proteger a los hígados esteatósicos frente al daño fue de 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Dosis más altas fueron innecesarias, ya que no lograron reducir más la lesión (**Figura 33**). El tiempo de pretratamiento del antagonista del PPAR $\gamma$  (1 hora antes del procedimiento quirúrgico) se seleccionó en base a estudios previos<sup>215,301</sup> así como también en base a estudios preliminares realizados por nuestro grupo de investigación. Los resultados obtenidos de dichos estudios indicaron que ese tiempo de pretratamiento resultó en parámetros de daño hepático similares a los que se obtuvieron con tiempos de pretratamiento más largos (2 o 3 h antes del procedimiento quirúrgico; datos no mostrados).

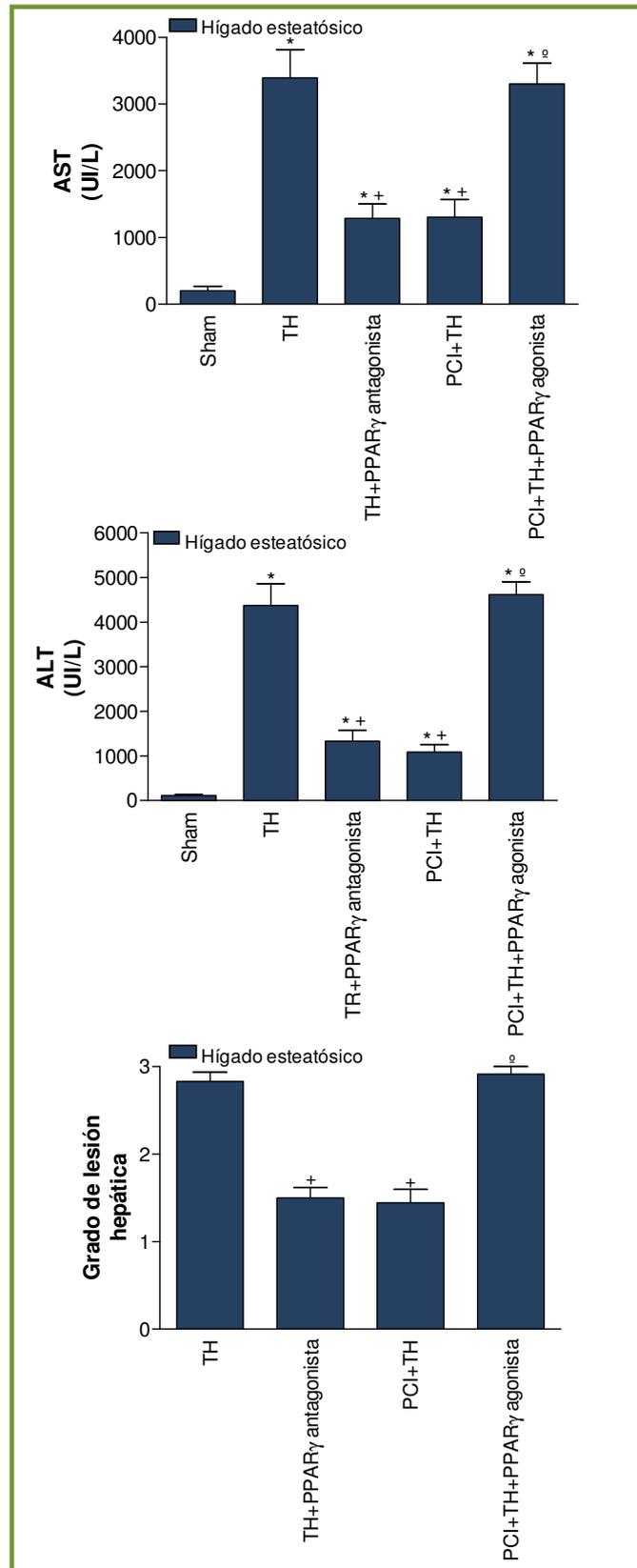


**Figura 33.** Estudio dosis-respuesta del antagonista del PPAR $\gamma$  en el trasplante de hígados esteatósicos. Se evaluó el efecto del tratamiento con el antagonista del PPAR $\gamma$  sobre el daño hepático determinado por los niveles de transaminasas y sobre el grado de lesión hepática. Distintas letras representan diferencias significativas,  $p < 0.05$ .

El tratamiento con el antagonista del PPAR $\gamma$  a la dosis seleccionada, 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (grupo TH+ PPAR $\gamma$  antagonista), resultó en parámetros bioquímicos e histológicos de daño hepático más bajos que los observados en el grupo TH (**Figura 34**). En los injertos hepáticos no esteatósicos, el tratamiento con el antagonista del PPAR $\gamma$  no indujo cambios en el daño hepático. En consonancia con lo anterior, los niveles de transaminasas y los valores histológicos correspondientes al grado de lesión hepática del grupo TH+ PPAR $\gamma$  antagonista fueron similares a aquellos observados en el grupo TH (AST:  $2143\pm 192$  y  $2075\pm 329$  UI/L para los grupos TH+PPAR $\gamma$  antagonista y TH, respectivamente; ALT:  $1630\pm 124$  y  $1540\pm 205$  UI/L para los grupos TH+PPAR $\gamma$  antagonista y TH, respectivamente; grado de lesión hepática:  $1.70\pm 0.26$  y  $1.80\pm 0.12$  para los grupos TH+PPAR $\gamma$  antagonista y TH, respectivamente).

Posteriormente se investigó si la reducción en los niveles de PPAR $\gamma$  inducido por el PCI (grupo PCI+TH) protege a los injertos hepáticos esteatósicos. Con tal finalidad, se buscó una dosis del agonista del PPAR $\gamma$  que al administrarse en el grupo PCI+TH aumentara los niveles de PPAR $\gamma$  a niveles similares a los encontrados en el grupo TH. Entre las dosis que se evaluaron (1000, 3000 y 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), la dosis adecuada del agonista del PPAR $\gamma$  fue de 3000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (datos no mostrados). La administración del agonista del PPAR $\gamma$  a dosis de 3000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (grupo PCI+TH+PPAR $\gamma$  agonista) eliminó los beneficios del PCI+TH, resultando en niveles de trasaminasas y grado de lesión hepática en injertos hepáticos esteatósicos similares a aquellos observados en el grupo TH (**Figura 34**). El tiempo de pretratamiento del agonista del PPAR $\gamma$  usado en el presente estudio (1 h antes del procedimiento quirúrgico) fue seleccionado en base a estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación y por otros.<sup>215,302</sup> Los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación indicaron que ese tiempo de pretratamiento resultó en parámetros de daño hepático similares a aquellos que se observaron con tiempos de pretratamiento más largos (2 o 3 h antes del procedimiento quirúrgico; datos no mostrados).

El estudio histológico reveló que en el grupo TH+ PPAR $\gamma$  antagonista (**Figura 31E**), la extensión y el número de áreas de necrosis en los injertos hepáticos esteatósicos se redujeron en comparación con el grupo TH (**Figura 31A**). Las lesiones hepáticas observadas en el grupo PCI+TH+ PPAR $\gamma$  agonista (**Figura 31F**) fueron similares a las que se observaron en el grupo TH (**Figura 31A**).

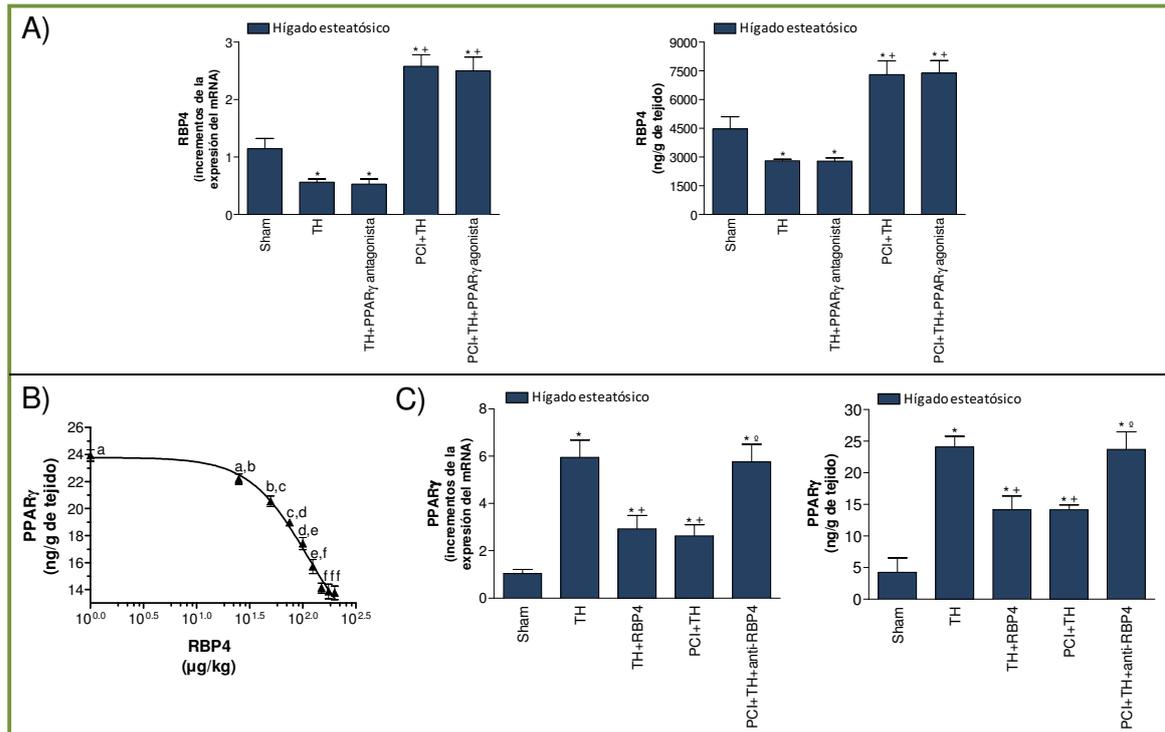


**Figura 34.** Efecto de la modulación farmacológica del PPAR $\gamma$  sobre el daño hepático en el trasplante de hígados esteatósicos. Se evaluaron como parámetros de lesión hepática las transaminasas y el grado de lesión hepática. \* $p < 0.05$  versus grupo Sham, + $p < 0.05$  versus grupo TH, y <sup>e</sup> $p < 0.05$  versus grupo PCI+TH.

*¿Existe alguna relación entre el RBP4 y el PPAR $\gamma$  en el trasplante de injertos esteatósicos? ¿Y en los efectos protectores del PCI?*

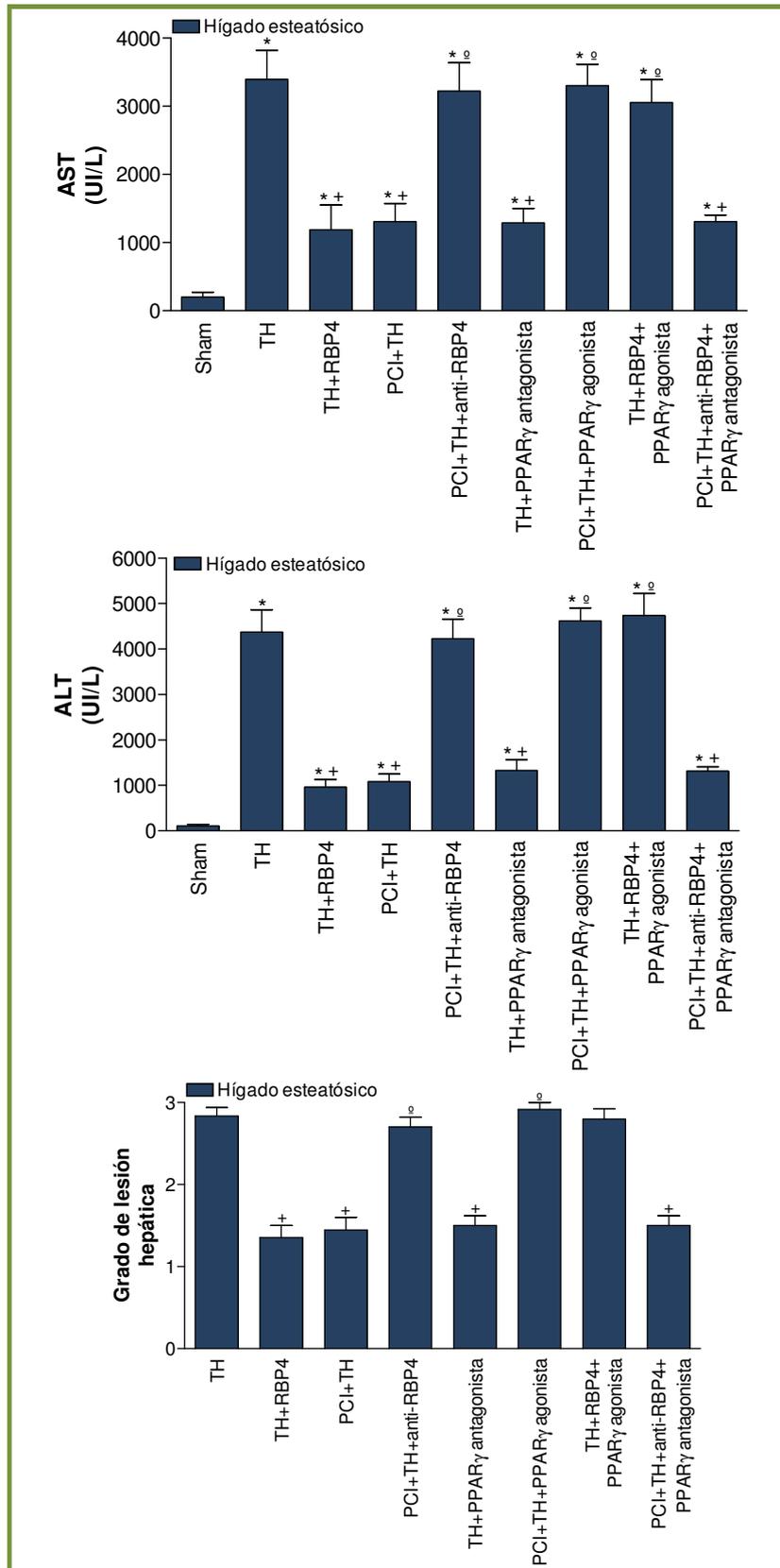
Para investigar una posible relación entre el RBP4 y el PPAR $\gamma$  en las condiciones experimentales evaluadas en el presente estudio, se determinaron los niveles de RBP4 y de PPAR $\gamma$  después de la modulación farmacológica de PPAR $\gamma$  y de RBP4. En el grupo TH+ PPAR $\gamma$  antagonista, los niveles de RBP4 en los injertos hepáticos esteatósicos fueron similares a los que se obtuvieron en el grupo TH (**Figura 35A**), indicando que el tratamiento con el antagonista del PPAR $\gamma$  no modificó los niveles de RBP4 en los injertos hepáticos esteatósicos. Además, en el grupo PCI+TH+PPAR $\gamma$  agonista los niveles hepáticos de RBP4 fueron similares a los observados en el grupo PCI+TH (**Figura 35A**). Se realizó entonces un estudio dosis-respuesta para evaluar los efectos de diferentes dosis de RBP4 sobre los niveles de PPAR $\gamma$  en hígados esteatósicos 4 h después del trasplante y la ED<sub>50</sub> calculada fue de 111.5±1.33  $\mu$ g/kg. La dosis más efectiva de RBP4 para reducir los niveles de proteína de PPAR $\gamma$  fue 150  $\mu$ g/kg. Dosis más altas de RBP4 no redujeron más los niveles de PPAR $\gamma$  en los injertos hepáticos esteatósicos (**Figura 35B**).

Por otro lado, es notorio que a la dosis de RBP4 seleccionada (150  $\mu$ g/kg), los niveles de PPAR $\gamma$  y el daño hepático se redujeron en el grupo TH+RBP4, pero no a los niveles observados en el grupo Sham (**Figuras 35C y 36**). Así pues, se evaluó si la administración del antagonista del PPAR $\gamma$  en el grupo TH+RBP4 podría inhibir los niveles de PPAR $\gamma$  y el daño hepático en los hígados esteatósicos. Los resultados obtenidos indicaron que en el grupo TH+RBP4+PPAR $\gamma$  antagonista los niveles de PPAR $\gamma$  fueron reducidos hasta ser similares a aquellos observados en el grupo Sham (4.12±0.59 y 4.24±0.86 ng/g de tejido en los grupos TH+RBP4+PPAR $\gamma$  antagonista y Sham, respectivamente) pero los parámetros de daño hepático fueron similares a los registrados en el grupo TH+RBP4 (AST:1287±432 y 1188±360 UI/L para los grupos TH+RBP4+PPAR $\gamma$  antagonista y TH+RBP4, respectivamente; ALT:1005±179 y 964±170 UI/L para los grupos TH+RBP4+PPAR $\gamma$  antagonista y TH+RBP4, respectivamente; grado de lesión hepática: 1.38±0.24 y 1.35±0.15 para los grupos TH+RBP4+PPAR $\gamma$  antagonista y TH+RBP4, respectivamente).



**Figura 35.** Relación entre el RBP4 y el PPAR $\gamma$  en el trasplante de hígados esteatósicos. A) Niveles de RBP4. Se evaluó la expresión génica del mRNA y los niveles de proteína del RBP4. B) Estudio dosis-respuesta para evaluar el efecto de diferentes dosis de RBP4 sobre los niveles de proteína de PPAR $\gamma$  en injertos hepáticos esteatósicos 4 horas después del trasplante. Distintas letras representan diferencias significativas,  $p < 0.05$ . C) Niveles de PPAR $\gamma$ . Se evaluó la expresión génica del mRNA y los niveles de proteína del PPAR $\gamma$ . \* $p < 0.05$  versus Sham,  $^o p < 0.05$  versus grupo TH, y  $^p < 0.05$  versus grupo PCI+TH.

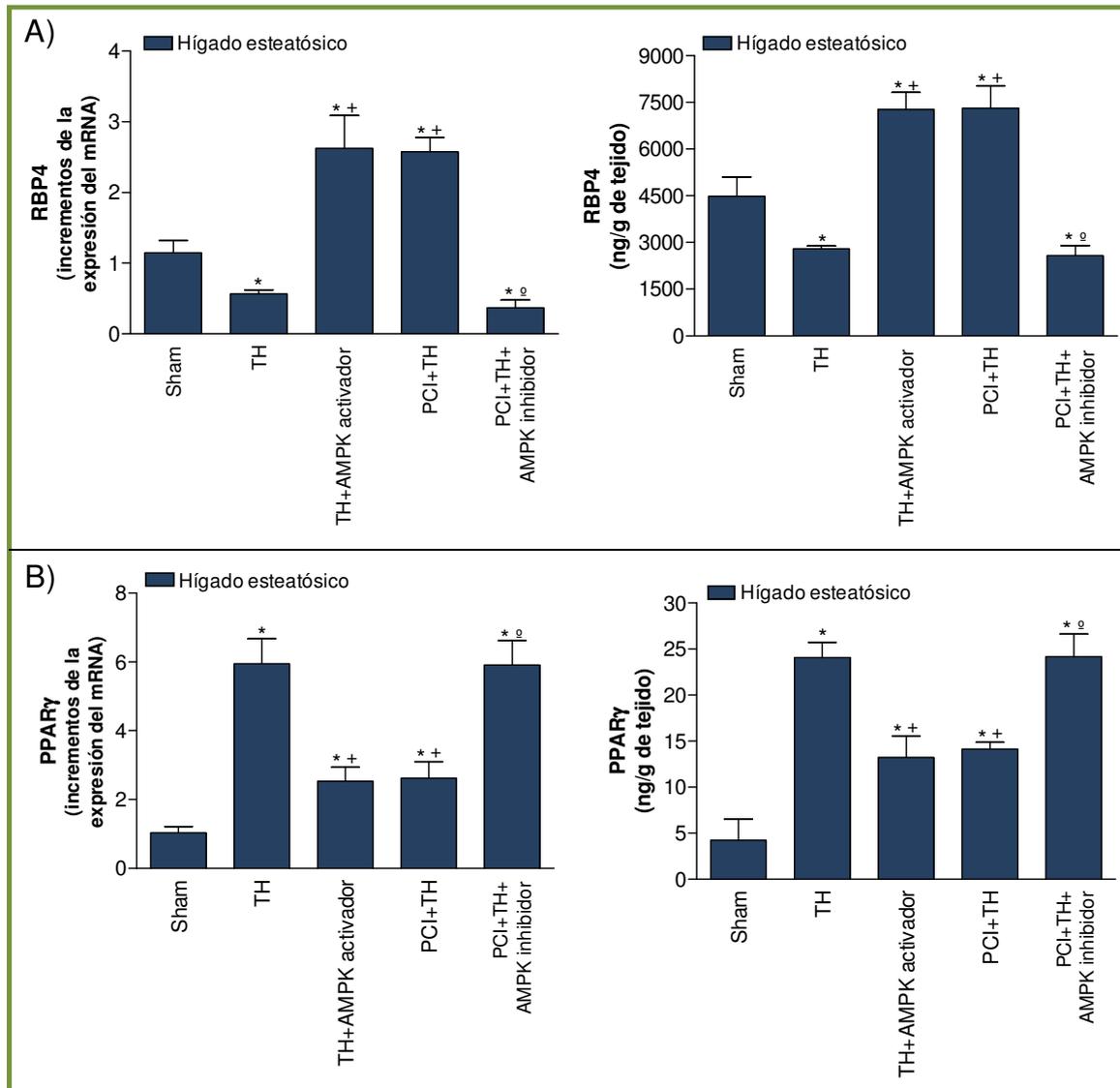
Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con RBP4 (a la dosis seleccionada, 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y el PCI a través de la inducción de RBP4 redujeron el PPAR $\gamma$  en los injertos hepáticos esteatósicos y mejoró la lesión hepática. En el grupo TH+RBP4 los niveles de PPAR $\gamma$  (Figura 35C) y los parámetros de daño hepático (Figura 36) se redujeron en los injertos hepáticos esteatósicos en comparación con el grupo TH. En el grupo TH+RBP4+PPAR $\gamma$  agonista los valores de transaminasas y del grado de lesión hepática fueron similares a los del grupo TH (Figura 36), indicando que el agonista del PPAR $\gamma$  eliminó los beneficios obtenidos con el tratamiento de RBP4 en los injertos hepáticos esteatósicos. El PCI+TH resultó en niveles reducidos de PPAR $\gamma$  (Figura 35C) y de daño hepático (Figura 36) en injertos hepáticos esteatósicos en comparación al grupo TH. En el grupo PCI+TH+anti-RBP4, los niveles de PPAR $\gamma$  y de lesión hepática en los injertos hepáticos esteatósicos fueron similares a aquellos observados en el grupo TH (Figura 35C), indicando los efectos perjudiciales del anticuerpo anti-RBP4 en los injertos hepáticos esteatósicos. En el grupo PCI+TH+anti-RBP4+PPAR $\gamma$  antagonista, el daño hepático fue similar al registrado en el grupo PCI+TH (Figura 36), indicando que el antagonista del PPAR $\gamma$  previno los efectos perjudiciales del anticuerpo anti-RBP4. En el grupo TH+RBP4+PPAR $\gamma$  agonista, se observaron lesiones histológicas en los injertos hepáticos esteatósicos (Figura 31G) similares a aquellas que se encontraron en el grupo TH (Figura 31A). En el grupo PCI+TH+anti-RBP4+PPAR $\gamma$  antagonista, las lesiones histológicas que se observaron en los injertos hepáticos esteatósicos (Figura 31G) fueron similares a aquellas observadas en el grupo PCI+TH (Figura 31C).



**Figura 36.** Daño hepático después de la modulación farmacológica de RBP4 y PPAR $\gamma$  en el trasplante de hígados esteatóticos. Se evaluaron como parámetros de lesión hepática las transaminasas y el grado de lesión hepática. \*p < 0.05 versus grupo Sham, +p < 0.05 versus grupo TH, y <sup>o</sup>p < 0.05 versus grupo PCI+TH.

### 3. Efecto de la AMPK sobre los niveles de RBP4 y PPAR $\gamma$ en el trasplante de hígados esteatósicos

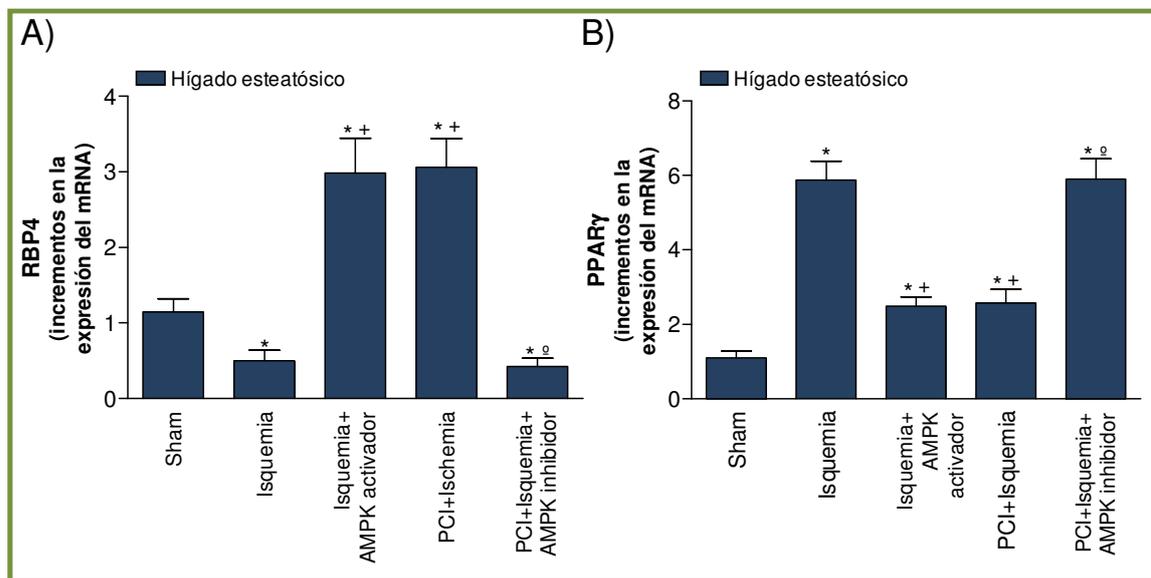
Los efectos beneficiosos de los activadores de la AMPK tales como el AICAR y la implicación de la AMPK en los beneficios del PCI en los injertos hepáticos esteatósicos ya han sido descritos previamente por nuestro grupo de investigación utilizando el mismo modelo experimental de trasplante hepático descrito en la presente tesis.<sup>159</sup> A partir de tales estudios, se seleccionó la dosis y el tiempo de pretratamiento para la administración del activador de la AMPK (100 mg/kg, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico) y del inhibidor de la AMPK (100  $\mu$ g/kg/min, durante 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico). A esa dosis, el activador de la AMPK protegió a los injertos hepáticos esteatósicos. La dosis seleccionada del inhibidor de la AMPK inhibió la AMPK en los hígados esteatósicos preconditionados y resultó así en niveles de AMPK y de transaminasas similares a los observados en el grupo TH.<sup>159</sup> Los resultados obtenidos en el presente estudio indicaron que en los grupos TH+AMPK activador y PCI+TH los niveles de RBP4 aumentaron en los injertos hepáticos esteatósicos en comparación con el grupo TH (**Figura 37A**). Este hallazgo estuvo asociado con niveles reducidos de PPAR $\gamma$  (**Figura 37B**). Por el contrario, en el grupo PCI+TH+AMPK inhibidor los niveles de RBP4 en los injertos hepáticos esteatósicos fueron similares a los niveles registrados en el grupo TH (**Figura 37A**). Este efecto fue asociado con niveles de PPAR $\gamma$  similares a aquellos del grupo TH (**Figura 37B**). Así pues, los activadores del AMPK y el PCI (a través de la inducción de AMPK) aumentaron los niveles de RBP4 en los injertos hepáticos esteatósicos después del trasplante. Esto a su vez fue asociado con una reducción en los niveles PPAR $\gamma$ .



**Figura 37.** Efecto del AMPK sobre los niveles del RBP4 y PPAR $\gamma$  en el trasplante de hígados esteatóticos. A) Niveles de RBP4. Se evaluó la expresión génica del mRNA y los niveles de proteína del RBP4. B) Niveles de PPAR $\gamma$ . Se evaluó la expresión génica del mRNA y los niveles de proteína del PPAR $\gamma$ . \* $p < 0.05$  versus Sham, \*\* $p < 0.05$  versus grupo TH, y <sup>o</sup> $p < 0.05$  versus grupo PCI+TH.

#### 4. RBP4 y el PPAR $\gamma$ en injertos hepáticos esteatósicos después del periodo de isquemia fría.

Los resultados obtenidos revelan una estrecha relación entre los niveles de mRNA de RBP4 y los niveles de proteína de RBP4 en los injertos hepáticos esteatósicos después del trasplante, sugiriendo que este tipo de injerto genera RBP4 por sí mismo después del tratamiento con el activador de la AMPK o de la inducción del PCI (grupos TH+AMPK activador y PCI+TH). Además del hígado, el tejido adiposo es capaz de generar RBP4, el cual puede ser captado por el hígado a partir de la circulación sistémica.<sup>303,304</sup> Para confirmar que el injerto hepático esteatósico por sí mismo y sin la influencia de otros tejidos o constituyentes de la circulación, puede generar RBP4 después del tratamiento con el activador de la AMPK o de la inducción del PCI, se midieron los niveles de mRNA del RBP4 en los injertos hepáticos esteatósicos durante la isquemia fría (antes del implante del injerto hepático en el receptor). En estas condiciones, el hígado está aislado de la influencia de otros tejidos y de la circulación sistémica. Los resultados obtenidos indicaron que durante la isquemia fría los niveles de mRNA de RBP4 en los injertos hepáticos esteatósicos aumentaron después del tratamiento con el activador de la AMPK o de la inducción del PCI (grupos Isquemia+AMPK activador y PCI+Isquemia) (**Figura 38A**) en comparación con los niveles observados en el grupo Isquemia. Este hallazgo fue también asociado con niveles reducidos del mRNA de PPAR $\gamma$  (**Figura 38B**). Por el contrario, en el grupo PCI+Isquemia+AMPK inhibidor, los niveles de mRNA de RBP4 en los injertos hepáticos esteatósicos fueron similares a los del grupo Isquemia (**Figura 38A**). Este resultado estuvo asociado con niveles de mRNA de PPAR $\gamma$  similares a los observados en el grupo Isquemia (**Figura 38B**).



**Figura 38.** RBP4 y PPAR $\gamma$  en los injertos hepáticos esteatósicos después de la isquemia fría. A) Niveles del mRNA de RBP4. B) Niveles del mRNA de PPAR $\gamma$ . \*p < 0.05 versus Sham, +p < 0.05 versus grupo Isquemia, y °p < 0.05 versus grupo PCI+Isquemia.