



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estrategias farmacológicas para reducir la lesión en cirugías hepáticas con oclusión vascular

Esther Bujaldon Ormaechea

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

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

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



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOTECNOLOGIA

ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS PARA REDUCIR LA LESIÓN EN CIRUGÍAS HEPÁTICAS CON OCLUSIÓN VASCULAR

Esther Bujaldon Ormaechea

2019

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

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

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



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOTECNOLOGIA

2015 - 2019



INSTITUT D'INVESTIGACIONS
BIOMÈDIQUES AUGUST PI I SUNYER



HOSPITAL CLÍNIC
DE BARCELONA

Estrategias farmacológicas para reducir la lesión en cirugías hepáticas con oclusión vascular

Memoria presentada por Esther Bujaldon Ormaechea para optar al título de doctor por la Universidad de Barcelona.

La presente Tesis doctoral ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Carmen Peralta Uroz y de la Dra. María Eugenia Cornide Petronio.

Dra. Carmen Peralta Uroz
Directora

Dra. María Eugenia Cornide Petronio
Directora

Esther Bujaldon Ormaechea
Doctoranda

Dra. Josefa Badía Palacín
Tutora

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la Dra. Carmen Peralta la oportunidad de desarrollar la tesis en su grupo de investigación, dirigida por ella misma y por la Dra. M^a Eugenia Cornide, por todo lo aprendido durante estos años. Agradezco también a mi tutora y coordinadora del programa, la Dra. Josefa Badia, por su inestimable colaboración durante el desarrollo de la presente tesis. Igualmente, a la Dra. Mónica Jiménez, por su ayuda siempre que la he necesitado.

Muy agradecida a los compañeros de grupo, Elsa, Cindy, Jose y Floriana que empezaron siendo compañeros de trabajo y se convirtieron en mis mejores amigos. Gracias también a todas las personas que han compartido experiencias en el grupo, como es el caso de la Dra. Mariana Mendes y la Dra. Araní Casillas.

Dejar constancia también del compañerismo que siempre he sentido en la planta 3 del CEK y en el estabulario de la Facultat de Medicina de la UB.

A todos los que habéis contribuido a que esta tesis se haga realidad, muchas gracias.

Al meu pare Miquel, la meva mare M^a Rosa, la meva germana Cristina i a les meves àvies. Perquè durant aquests anys han passat moltes coses, massa, i no totes bones, però hem tirat endavant, com sempre. Mai podré agrair prou els vostres sacrificis i el vostre suport. Gràcies per ser al meu costat. Als que hi són i als que ja no hi són, perquè us recordo sempre. A tots, moltes gràcies.

A la meva família i amics.

'Languages take such a time, and so do all the things one wants to know about'

J.R.R. Tolkien

ÍNDICE

Resumen.....	13
Introducción.....	17
El hígado	19
La resección hepática	23
La regeneración hepática	25
Lesión inducida por isquemia/reperfusión	29
El hígado esteatósico en la cirugía hepática de las resecciones.....	35
Estrategias para reducir la lesión por isquemia/reperfusión.....	45
Posibles dianas farmacológicas.....	55
Cortisol	57
Acetilcolina.....	65
VEGFA.....	71
Objetivos.....	77
Materiales y Métodos	81
Animales de experimentación	83
Modelo experimental	84
Diseño experimental	85
Recogida y procesamiento de las muestras.....	94
Determinaciones bioquímicas.....	94
Resultados.....	111
Impacto del cortisol en cirugía hepática de hígados esteatósicos y no esteatósicos	113
Relevancia del VEGFA en hígados sometidos a hepatectomía parcial bajo oclusión vascular.....	131
Discusión	163
Conclusiones.....	175
Bibliografía.....	179
Anexos	207
Abreviaturas.....	217

RESUMEN

La hepatectomía parcial (PH) bajo oclusión vascular es una estrategia que se utiliza comúnmente en la práctica clínica para reducir la hemorragia durante la resección del parénquima hepático. Más del 20% de los pacientes que se someten a una resección hepática presentan algún grado de esteatosis, factor de riesgo importante en la cirugía de las resecciones, ya que se asocia a un mayor índice de complicaciones y mortalidad postoperatoria. Teniendo en cuenta tal problemática clínica, la presente Tesis plantea posibles terapias farmacológicas basadas en el cortisol y el factor de crecimiento endotelial vascular tipo A (VEGFA) que protejan los hígados frente a la lesión inducida por la isquemia-reperfusión y fallo en la regeneración hepática, utilizando animales de experimentación con o sin esteatosis hepática (ratas Zucker y ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta deficiente en colina) sometidas a 70% de hepatectomía parcial con isquemia-reperfusión.

Los resultados de la presente Tesis indicaron la activación, solo en hígados no esteatósicos, de los mecanismos encargados de mantener niveles bajos de cortisol para evitar en consecuencia sus efectos nocivos sobre la lesión y regeneración. En presencia de esteatosis, el cortisol exagera el daño y el fallo en la regeneración asociado a la cirugía hepática, efectos que se asociaron a niveles hepáticos elevados de acetilcolina. La administración de un antagonista del receptor muscarínico M3 protegió a los hígados frente a la lesión, mejoró la regeneración del parénquima y la tasa de supervivencia tras la cirugía. Los resultados de la presente Tesis también indicaron que el VEGFA reduce la incidencia de complicaciones postoperatorias en hígados no esteatósicos después de la cirugía a través de la vía VEGFR2-Wnt2, e independientemente de Id1. Inesperadamente, la administración de VEGFA redujo notablemente los niveles de VEGFA en hígados esteatósicos, exacerbando el daño y el fallo regenerativo asociado a la cirugía, ya que el VEGFA circulante fue secuestrado por los altos niveles circulantes de sFlt1, el cual es liberado por el tejido adiposo. En consecuencia, se requirió la administración concomitante de VEGFA y de un anticuerpo anti-sFlt1 para secuestrar el sFlt1 y evitar la unión de sFlt1 a VEGFA. Este efecto se asoció con altos niveles de VEGFA en hígados esteatósicos y protección frente al daño y fallo en la regeneración a través de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt, independientemente de la vía Id1-Wnt2.

La presente Tesis establece, por primera vez, el papel del cortisol en hígados esteatósicos y no esteatósicos en condiciones de PH bajo oclusión vascular y propone el potencial terapéutico de la vía cortisol-acetilcolina-receptores muscarínicos M3 en la cirugía con hígados esteatósicos y no esteatósicos. Así mismo, la presente Tesis expone los diferentes efectos y vías de señalización de VEGFA en la cirugía de las resecciones bajo oclusión vascular según el tipo de hígado.

INTRODUCCIÓN

1. EL HÍGADO

El hígado, con un peso entre 1.300 y 1.800 g, representa entre el 2 y el 5% del peso corporal total. Este órgano desempeña funciones vitales para el organismo en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, así como en la formación de la bilis y en la inactivación de diversas sustancias como tóxicos, esteroides y otras hormonas (Sanyal et al., 2017; Sherlock et al., 2008).

El hígado está formado por diferentes tipos celulares, cada uno con una localización y función específicas que se resumen en la Tabla 1.1. Las células principales del hígado son los hepatocitos, células polarizadas en las que se diferencian dos dominios funcionalmente importantes: el dominio basolateral, donde se produce la absorción y secreción de sustancias; y el dominio apical o canalicular especializado en la secreción de sustancias a la bilis (Kuntz and Kuntz, 2008; Sanyal et al., 2017; Peralta et al., 2013). El mantenimiento de esta polarización es esencial para el correcto funcionamiento de los hepatocitos y se requiere una precisa coordinación entre hepatocitos, moléculas de adhesión, *cell junctions*, *tight junctions*, moléculas de la matriz extracelular, etc...para poder ejercer las funciones eficazmente (Gissen and Arias, 2015).

Se considera que la unidad funcional básica del hígado es el acino hepático (Figura 1.1). Los acinos están formados por filas de células epiteliales y hepatocitos interespaciados por los sinusoides, donde drena la sangre procedente de la tríada portal hacia la vena central. Por otro lado, la bilis es secretada hacia una red de canalículos biliares situados en el interior de los cordones de hepatocitos y fluye hacia los conductos biliares situados en las triadas portales (Sanyal et al., 2017).

Tipos celulares		Funciones principales
Hepatocitos		Síntesis proteica, lipoproteínas, glucosa, sales biliares, AGs, colesterol y fosfolípidos
		Obtención, almacenamiento y liberación de nutrientes a la circulación
		Digestión y absorción de las grasas a través de la secreción de la bilis
		Detoxificación de toxinas
Células sinusoidales	Células endoteliales	Secreción de citoquinas, componentes de la matriz, factores de crecimiento, moléculas de adhesión, sustancias vasoactivas.
	Células de Kupffer (KC)	Pinocitosis, fagocitosis.
		Secreción de moléculas señalizadoras
		Secreción de mediadores citotóxicos. Eliminación de toxinas
	Células de Ito (cél. estrelladas o lipocitos)	Almacenaje de lípidos y retinol.
Síntesis de colágeno, fibronectina y otras. Reparación del tejido hepático, regulación del tono microvascular.		
Células PIT	Natural Killers. Regulación de la respuesta inmune.	
Células epiteliales del tracto biliar		Función relacionada con la síntesis biliar

Tabla 1.1. Tipos celulares del hígado y sus funciones.

Se pueden diferenciar tres zonas a lo largo del acino, numeradas de la 1 a la 3, a medida que la sangre arterial fluye hacia a la vena central y reduce su suministro en oxígeno y nutrientes (Figura 1.1). El sistema vascular intrahepático recibe sangre de dos vías diferentes: por la arteria hepática, el hígado recibe sangre rica en oxígeno procedente del corazón; y por la vena porta el hígado recibe aproximadamente el 75% del aporte sanguíneo rico en nutrientes (pero pobre en oxígeno) procedente del intestino, páncreas y bazo. Tanto la sangre proveniente de la vena porta como de la arteria hepática alcanzará los sinusoides, donde tiene lugar el intercambio entre la sangre y los hepatocitos. (Figura 1.1). Cada célula de los cordones hepáticos dispuestos radialmente está en contacto, al menos por un costado, con la sangre que fluye de los sinusoides hacia la vena central del lobulillo hepático, que desemboca en las vénulas hepáticas y finalmente en la vena cava inferior justo por debajo del diafragma (Sanyal et al., 2017; Sherlock et al., 2002).

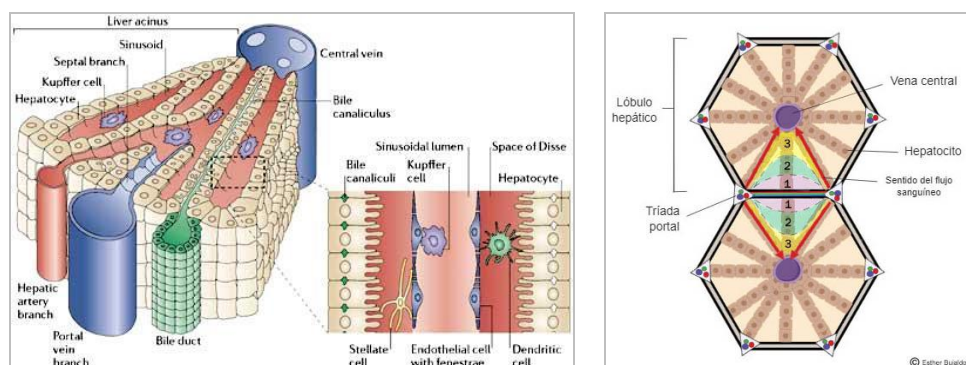


Figura 1.1. Izquierda: Estructura del lóbulo hepático. Fuente: Adams and Eksteen, 2006. Derecha: Esquema de un acino hepático

El hígado se puede dividir siguiendo un criterio funcional. Así, la vena porta se bifurca en dos ramas que dividen el hígado en dos partes, la izquierda y la derecha. Cada mitad tiene un aporte sanguíneo independiente, tanto desde la vena porta como desde la arteria hepática; de la misma manera, el drenaje biliar también es independiente. Cada una de las dos ramas de la vena porta se bifurca en dos, dividiendo el hígado en cuatro sectores, que a su vez se dividen en 9 segmentos (Figura 1.2). Cada segmento tiene su propio pedículo vascular y biliar, así como su drenaje venoso. La clasificación de este modo facilita la realización de resecciones hepáticas y las técnicas de trasplante parcial (Cingolani y Houssay, 2004; Barrett et al., 2012; Pocock and Richards, 2006; Sherlock et al., 2002; Sanyal et al., 2017).

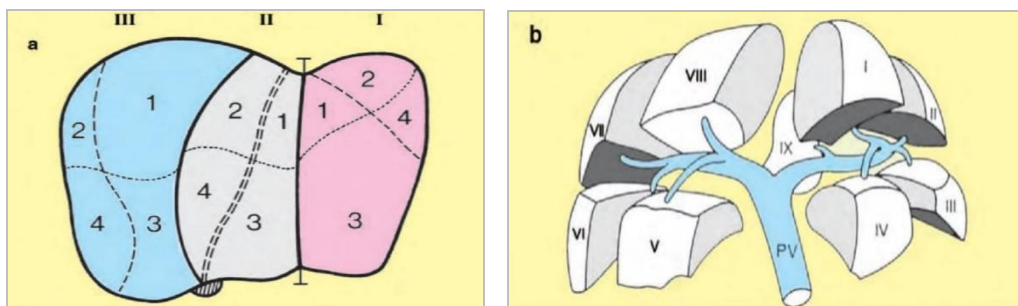


Figura 1.2. Segmentación del hígado: a) Lóbulo izquierdo (I): 4 segmentos (1 - 4); Parte central (II): lóbulo cuadrado (3), lóbulos caudados (1, 2) y proceso caudado (4); Lóbulo derecho (III): 4 segmentos (1 - 4). El lóbulo izquierdo y derecho se separan por el ligamento falciforme. b) De acuerdo con las ramificaciones de la vena porta (PV), el hígado se puede dividir en 9 segmentos (I - IX). *Fuente: Hepatology Textbook and Atlas, 3rd Ed. E. Kuntz y H.-D. Kuntz. 2008. Springer.*

Experimentalmente, se utilizan modelos animales para la investigación de patologías y cirugías hepáticas. Entre ellos, la rata es el más utilizado en investigación por su coste relativamente bajo y facilidad de manejo. Los roedores, y la rata en particular, son modelos muy usados para el estudio de regeneración hepática, metástasis hepática, trasplante, inmunología y enfermedades del hígado. Además, se disponen de modelos experimentales de esteatosis hepática en rata, imposibles de conseguir en el caso de modelos experimentales de cerdo. Esto dificulta la extrapolación a la práctica clínica de los resultados obtenidos en cerdo en resecciones y trasplante hepático utilizando hígados esteatósicos (Jiménez-Castro et al., 2013a).

2. RESECCIÓN HEPÁTICA

La mayoría de hepatectomías parciales se realizan para el tratamiento de neoplasias hepáticas, tanto benignas o malignas. El objetivo de la resección es eliminar la lesión macroscópica dejando suficiente masa hepática funcional con la preservación del flujo vascular. La hepatectomía también puede ser el procedimiento de elección para el tratamiento de cálculos biliares intrahepáticos o quistes hepáticos (Garcea and Maddern, 2009; Garden et al., 2006; Jamagin, 2017).

Las nuevas técnicas de resección hepática han mejorado la intervención quirúrgica de tumores hepáticos y retroperitoneales, donde el uso de la obstrucción del flujo portal (con o sin oclusión de la cava), disminuye la pérdida de sangre y permite un manejo más seguro de las venas involucradas en la masa tumoral (Busuttil and Klintmalm, 2015). En efecto, la hemorragia durante la cirugía del hígado es el riesgo principal durante las resecciones hepáticas. Para reducir este riesgo se utiliza la técnica conocida como maniobra de Pringle u oclusión de la tríada portal, que consiste en la compresión del ligamento hepatoduodenal, interrumpiendo así el flujo sanguíneo al hígado a través de la arteria hepática y la vena porta y controlando de esta forma la hemorragia (Figura 2.1).

La maniobra de Pringle permite minimizar el sangrado de la superficie cortada durante la resección del parénquima, aunque no tiene efecto sobre el sangrado de las ramas de las venas hepáticas (Huguet et al., 1992, Selzner et al., 2000).

Otra técnica que se utiliza es la exclusión vascular hepática (HVE). Consiste en la oclusión de la tríada portal y la de la vena cava inferior, aislando de este modo completamente el hígado y la vena cava retro hepática del resto de la circulación. El objetivo de esta técnica

es reducir el riesgo de hemorragia masiva y de formación de trombos gaseosos causados por la ruptura de la vena cava o de la vena hepática, al extirpar un tumor hepático muy extenso o bien situado en el lóbulo posterior del hígado (Huguet et al., 1992). La HVE está indicada principalmente para la resección de tumores en la vena cava o alrededores y/o tumores cercanos a la confluencia de las venas hepáticas (Azoulay et al., 2014)

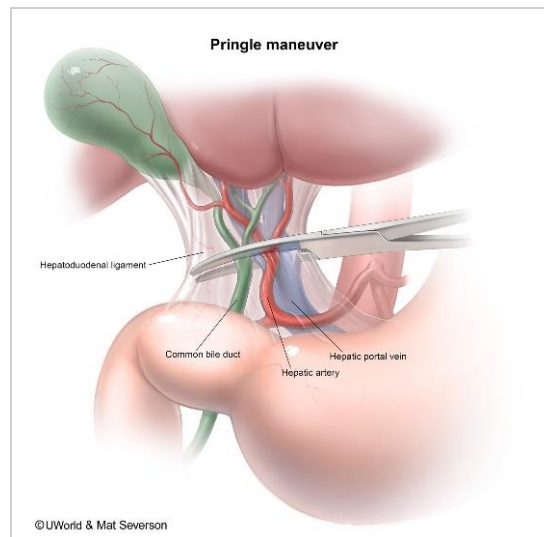


Figura 2.1. Maniobra de Pringle. *Fuente: UWorld & Mat Severson.*

Si bien estos procedimientos reducen eficazmente el sangrado durante la cirugía, hay que tener presente las lesiones provocadas por la interrupción del flujo sanguíneo cuando se emplean estos procedimientos, como son la lesión por isquemia/reperfusión (I/R) o la congestión intestinal. Para evitar la congestión intestinal, que puede llegar a ser mortal, se han desarrollado técnicas de oclusión vascular hemihepáticas que conserva gran parte del aporte sanguíneo portal, disminuyendo el riesgo de congestión visceral (Li et al., 2017). De esta forma, con el fin de minimizar tanto el sangrado durante la cirugía hepática y las alteraciones bioquímicas ocasionadas por la interrupción del flujo sanguíneo del hígado, se desarrolló una técnica basada en el control selectivo de los vasos del hígado hepático, llamada oclusión vascular hemi hepática o hemi-Pringle (Makuuchi et al., 1987). Esta técnica consiste en la oclusión de los vasos aferentes (arteria hepática y vena porta) de aproximadamente la mitad del hígado, es decir, de los lóbulos hepáticos derecho o izquierdo dependiendo de la situación del fragmento hepático a reseccionar. La ventaja de esta técnica es que se preserva el flujo sanguíneo en el lóbulo hepático contralateral, reduciendo así la lesión hepática asociada a la isquemia-reperfusión y la congestión vascular e intestinal (Tanaka et al., 2006; Li et al., 2016).

3. REGENERACIÓN HEPÁTICA

El hígado, en condiciones normales, tiene una gran capacidad regenerativa pero que se ve comprometida cuando el órgano se enfrenta a una agresión aguda, como la resección de un tumor, o una lesión crónica que afecte la arquitectura hepática como la fibrosis (Forbes and Newsome, 2016).

El hígado adulto normal es un órgano quiescente en términos de proliferación celular (Koniaris, et al., 2003), en el cual la mayor parte de los hepatocitos están en la fase G0 del ciclo celular. Sin embargo, frente a la resección de una parte de la masa hepática, aproximadamente el 95% de las células hepáticas, desde hepatocitos a células epiteliales biliares, endoteliales y de Kupffer, antes quiescentes, entran rápidamente en el ciclo celular y proliferan hasta recuperar la masa hepática original (Michalopoulos et al., 1997). Por lo tanto, es más correcto hablar de una hiperplasia compensatoria de todos los tipos celulares del hígado remanente para recuperar el volumen perdido, más que una regeneración *per se* de los lóbulos reseccionados (Taub, 2004; Fausto et al., 2000).

La hepatectomía parcial en rata es el modelo clásico, ampliamente reconocido por la comunidad científica y clínica, para estudiar experimentalmente la regeneración hepática, ya que reproduce resultados fiables y extrapolables a la práctica clínica (Forbes and Newsome, 2016). Fruto de ello, han sido los resultados exitosos en preconditionamiento isquémico en pacientes sometidos a resecciones hepáticas de tumores tomando resultados extrapolados a partir de modelos experimentales de resección hepática y

siguiendo las técnicas ampliamente descritas por el grupo de investigación (Casillas-Ramírez et al., 2006b; Serafín et al., 2004a; Grande et al., 2006).

La mayoría de los estudios se centran en la capacidad regenerativa de los hepatocitos ya que, inmediatamente después del estímulo regenerativo tras la hepatectomía parcial (PH), son los primeros tipos celulares en proliferar. En el modelo del 70% (o 2/3 PH) en ratas, el tercio restante de hepatocitos remanentes sale del estado G0 para entrar en la fase G1. Luego entran en la fase S, donde dividen su DNA y entran en mitosis (fase M), siendo el pico proliferativo a las 24 horas y llegando al 60% de hepatocitos originales. Seguidamente, un porcentaje más reducido de hepatocitos entra en fase proliferativa y mitosis, estableciendo aproximadamente el número original de hepatocitos (Michalopoulos, 2007). Existe una etapa apoptótica al final del proceso regenerativo de los hepatocitos para finalizar la proliferación y evitar el crecimiento excesivo del hígado (Taub, 2004). La proliferación de los hepatocitos avanza de la región periportal hacia la vena central del lóbulo. En efecto, los hepatocitos alrededor de la vena central son los últimos en entrar en mitosis. En ratas, el mayor pico de regeneración ocurre entre las 22 y 24 horas, y existe un segundo pico menor entre las 36 y las 48 horas (Koniaris et al., 2003). El peso original del hígado de rata se recupera entre 5-7 días después de la hepatectomía; en humanos, entre 8-15 días.

La regeneración hepática se ha dividido en dos fases, los procesos principales de las cuales se resumen en la Figura 3.1.

1. Fase de iniciación (*priming*)

Durante las primeras horas después de la PH se expresan diferencialmente una gran variedad de genes relacionados con las citoquinas. Las KC son responsables tanto de la producción y liberación de las citoquinas que favorecen la proliferación como el Factor de Necrosis Tumoral α y la interleucina 6 (TNF- α e IL-6, respectivamente), como de los mediadores que inhiben tal proceso, la interleucina 1 y el factor de crecimiento transformante- β (IL-1 y TGF- β respectivamente) (Malik et al., 2002; Taub, 2004). La IL-6 activa en hepatocitos las vías del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y quinasas regulada por señales extracelulares (ERK1/2) que iniciarán la entrada de los hepatocitos quiescentes en el ciclo celular (G0 a G1) (Fausto et al., 2006; Mao et al., 2014). Del mismo modo, en estos hepatocitos también se expresan moléculas inhibitoras de la proliferación, como el

supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3) y el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI).

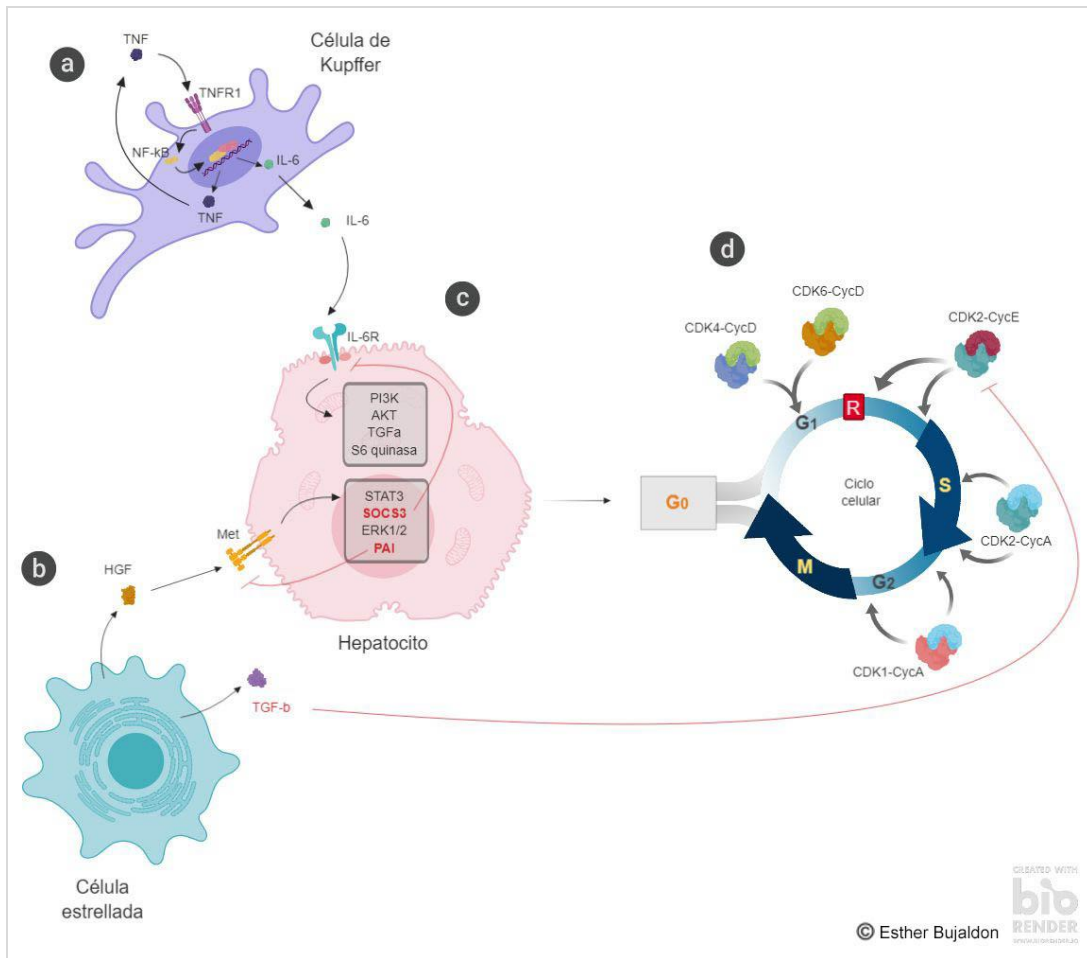


Figura 3.1. Esquema resumen de los acontecimientos principales de la regeneración hepática. a. Señales de citoquinas producidas por las células de Kupffer. b. Señales de factores de crecimiento producidos por células estrelladas. c. Hepatocito quiescente receptor de estas señales y las vías proliferativas (negro) e inhibidoras de la proliferación (rojo) que desencadenan. d. Complejos de quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y ciclinas (Cyc) y las fases del ciclo celular que regulan.

2. Fase de progresión y terminación:

Esta fase está regulada por factores de crecimiento además de ciclinas, entre otras moléculas (Fausto et al., 2006, Zimmermann et al., 2004). Entre ellas, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el TGF-β son de especial importancia:

- **HGF:** es un factor de crecimiento producido por las células estrelladas y tiene efecto mitogénico directo sobre los hepatocitos. Varios estudios prueban esta capacidad mitogénica *in vitro* y en diferentes modelos experimentales de trasplante hepático y resección (Ninomiya et al., 2003; Mizuno et al., 2007; Paranjpe et al., 2007; Nejak-Bowen, K. et al., 2013).

El HGF se une a su receptor tirosina quinasa c-Met en la membrana de los hepatocitos y activa diversas vías de señalización proliferativas como PI3K, Akt, ERK1/2 y S6 quinasa, además de promover la producción y secreción de TGF- α (Mao et al., 2014). Estas vías, por mecanismos aún poco establecidos, activarían TOR, que a su vez sería la responsable de promover la progresión del ciclo celular de los hepatocitos mediante la expresión de ciclinas D y E y la reducción de p27 (Gómez- Quiroz et al., 2008; Nakamura et al., 2010; Taub, 2004; Palestino-Domínguez et al., 2012).

- TGF- β : esta citoquina inhibe la regeneración hepática, ya que reduce la producción de HGF y retrasa de síntesis de DNA en procesos de PH. La administración intravenosa de TGF- β inhibe la fase temprana de la regeneración hepática después de una PH mientras que el tratamiento con anticuerpos anti-TGF- β promueven la regeneración hepática (Enami et al., 2001).

Existen otras moléculas que intervienen en la regeneración hepática y resultan ser buenos marcadores de hepatocitos en proliferación. Como ejemplos relevantes para esta tesis, destacamos:

- Ciclinas: las ciclinas desempeñan su función formando un complejo activo con quinasas dependientes de ciclina (CDKs) que actúan en determinadas etapas del ciclo celular (Figura 3.1). La transición de la fase G0 a la G1 y las primeras etapas del G1 son controladas por los complejos Cdk4-Ciclina D y Cdk6-Ciclina D. El complejo Cdk2-Ciclina E permite avanzar en la fase G1 y proseguir a la fase S. Seguidamente, la Cdk2 interacciona con la ciclina A durante la progresión de la fase S. Esta misma ciclina A, asociada a Cdk1 controla la transición de la fase S a G2, mientras que el complejo Cdk1-Ciclina B regularía el paso de la fase G2 a M (Malumbres and Barbacid, 2005).
- El Ki-67 es una proteína comúnmente utilizada como marcador de proliferación celular ya que está presente durante todas las etapas activas del ciclo celular (G1, S, G2 y M) mientras que está ausente en la fase quiescente (G0) (Scholzen and Gerdes, 2000). Durante la mitosis, el Ki-67 recubre la superficie de los cromosomas mitóticos. Después de la mitosis, el Ki-67 se relocaliza hacia la periferia del núcleo y se solapa con la heterocromatina perinuclear (Sun and Kaufman, 2018).

4. LESIÓN INDUCIDA POR ISQUEMIA – REPERFUSIÓN HEPÁTICA

La lesión por isquemia–reperfusión (I/R) se inicia cuando el hígado se ve privado temporalmente de flujo sanguíneo y por lo tanto, de oxígeno (isquemia) y se agrava al restablecerse la circulación (reperfusión).

La relevancia de la lesión inducida por I/R es un problema sin resolver en la práctica clínica de la cirugía hepática y contribuye a disfunción hepática, morbilidad y mortalidad postoperatoria tras la cirugía (Nastos et al., 2014). La lesión por I/R se produce siempre que se interrumpa la circulación al hígado, tal y como ocurre en la maniobra de Pringle, técnica ampliamente usada para controlar la hemorragia en las cirugías y que consiste en pinzar el ligamento hepatoduodenal del hígado. Cabe destacar que la relevancia de la lesión por I/R es de especialmente importante en el hígado hepatectomizado ya que tendrá que regenerarse, proceso que se ve mermado por la I/R (Teoh et al., 2003). La lesión por I/R afecta negativamente el proceso de regeneración hepática, hecho que se agrava cuando están presentes factores como la esteatosis hepática. Es bien conocido que los hígados esteatósicos son menos tolerantes a la lesión inducida por I/R y presentan mayores problemas de fallos en la regeneración hepática cuando lo camparamos con los resultados post-operativos en hígados no esteatósicos sometidos a cirugía (Elias Miró et al., 2014; Ben-Mosbah et al., 2010).

4.1. Isquemia en resecciones hepáticas

Existen diversos modelos para el estudio de la lesión por I/R normotérmica hepática. Por ejemplo, la isquemia global con descompresión portal es un modelo que simula idealmente la situación clínica de isquemia a temperatura corporal después de la maniobra de Pringle en resecciones hepáticas (Jiménez-Castro et al., 2013a). Desde su primera aplicación en humanos (Vidal, 1903) y ratas (Blakemore and Lord, 1945), este modelo se ha modificado y adaptado a lo largo del tiempo (Burnett et al., 1951; Bernstein and Cheiker, 1959; Spiegel et al., 1995; Bengmark et al., 1995).

En 1982, Yamauchi y colaboradores describieron un modelo de isquemia normotérmica parcial en rata. En este modelo, la isquemia se consigue con la oclusión de la arteria hepática, la vena porta y el ducto biliar de los lóbulos izquierdo y mediano, manteniendo el flujo sanguíneo a los lóbulos restantes y evitando así la congestión de los intestinos. Este modelo del 70% de isquemia ha sido utilizado ampliamente para el estudio experimental de la lesión por I/R. La incorporación de hepatectomía parcial ha hecho de éste un excelente modelo para el estudio de la lesión por I/R y también la regeneración hepática. Modificaciones en este modelo han permitido isquemias y hepatectomías del 30% e incluso del 90% (Jiménez-Castro et al., 2013a). Es bien conocido que, en la práctica clínica, la oclusión vascular (asocada a un proceso de I/R) es comúnmente utilizada para evitar la hemorragia en las resecciones hepáticas. De ahí la importancia de centrarse en modelos experimentales que mimeticen lo máximo posible las condiciones que ocurren en la práctica clínica (tal y como se ha procedido en la presente tesis) con la finalidad de encontrar estrategias protectoras que se puedan extrapolar y ser de utilidad en la práctica clínica.

4.2. Patofisiología de la lesión por I/R hepática

Podemos resumir la lesión por I/R en dos fases: la lesión inducida por isquemia, y la lesión inducida por reperfusión. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta división no es tan evidente, ya que la lesión por I/R es un proceso dinámico y las fases están íntimamente relacionadas. Se puede decir que los eventos que suceden en la reperfusión son la consecuencia de aquellos que se inician durante la isquemia. Curiosamente, se ha visto que la reperfusión de un hígado expuesto a un periodo de isquemia breve no induce ningún daño detectable, un hallazgo indicativo de que la reperfusión por sí sola no es perjudicial (Casillas-Ramírez et al., 2006a).

Durante el periodo isquémico, se interrumpe el aporte de oxígeno al hígado, y la degradación de ATP acelera la glucólisis anaeróbica produciendo ácido láctico y alteraciones en los iones necesarios para mantener la homeostasis celular, como los iones Na^+ , Ca^{2+} y H^+ . Como consecuencia de esta acidosis, se ven afectados el gradiente de iones de las membranas celulares, la cinética normal de las enzimas y los sistemas para producir ATP, induciendo la formación de edema y un daño importante en el hepatocito (Cannistrà et al., 2016; Casillas-Ramírez et al., 2006a).

La lesión del hígado isquémico se ve exacerbada cuando se re-establece el aporte sanguíneo al hígado durante la etapa de reperfusión. La lesión por reperfusión se caracteriza por la activación de las KC y desencadenamiento de una respuesta inflamatoria en la que están implicados múltiples mediadores de la inflamación, plaquetas, leucocitos y el endotelio vascular, los cuales al interactuar derivan en la lesión por reperfusión. Algunas de las consecuencias de esta lesión son la vasoconstricción, infiltración leucocitaria y agregación plaquetaria en los sinusoides, que provoca su estrechamiento y resulta en fallo microcirculatorio. La activación de las KC y neutrófilos resulta en la liberación de citoquinas inflamatorias y radicales libres que agravan la lesión (Cannistrà et al., 2016).

4.3. Mecanismos implicados en la lesión por I/R y regeneración

El daño hepático que sufre el hígado al someterlo a un proceso de resección bajo oclusión vascular es el resultado de la interacción entre diferentes tipos celulares y vías de señalización celular. Los mecanismos principales implicados en la lesión por I/R se resumen en la figura 4.1.

Como se ha explicado anteriormente, el déficit energético inducido por la isquemia provoca un desequilibrio iónico y consecuente fallo del transporte activo transmembranal. En consecuencia, se activan las KC y se produce lesión en las células endoteliales (EC). Así mismo, la activación de neutrófilos conjuntamente con el desajuste en la producción de óxido nítrico (NO) y endotelina (ET) contribuye a desórdenes microcirculatorios. Al mismo tiempo, la activación de KC genera radicales libres de oxígeno (RLO) y citoquinas proinflamatorias, tales como $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 , lo cual promoverá la activación y acumulación de neutrófilos, y la consiguiente generación de RLO y proteasas que contribuyen a la progresión del daño hepático. Adicionalmente, los RLO pueden derivar de la mitocondria y del sistema xantina deshidrogenasa/xantina oxidasa (XDH/XOD) de células endoteliales sinusoidales (SEC) y hepatocitos. Tanto el $\text{TNF-}\alpha$ como la IL-1 , activan linfocitos T-CD4+,

capaces de producir GM-CSF, interferón gamma (IFN- γ) y TNF- β que a su vez amplifican la activación de las KC y promueven el reclutamiento de neutrófilos en el hígado. El daño celular activa vías de señalización como el High mobility group box 1 (HMGB1) - Toll Like Receptor 4 (TLR4), lo cual amplifica aún más el daño inflamatorio en procesos de PH bajo I/R (Jiménez-Castro et al., 2013a).

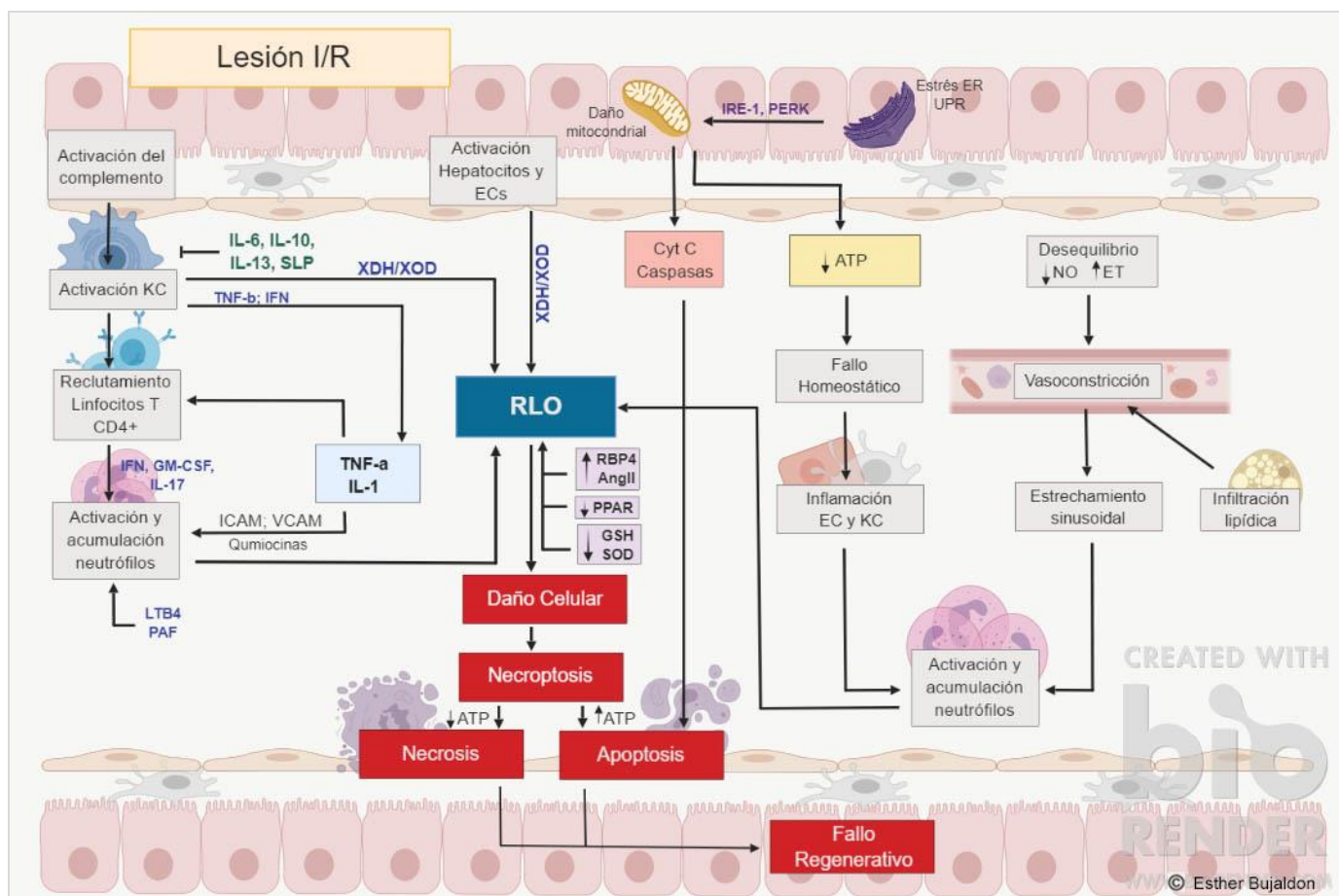


Figura 4.1. Mecanismos principales implicados en la patofisiología de la lesión por I/R hepática.

Adicionalmente, la I/R provoca la desestructuración proteica que desencadena una respuesta a proteínas desplegadas (UPR) en el retículo endoplasmático (RE). Si el daño es tan severo que la homeostasis no puede recuperarse, esta señal de estrés en el RE iniciará procesos apoptóticos y necróticos. En este sentido, los niveles de ATP serán claves para desencadenar necrosis y/o apoptosis (Jiménez-Castro et al., 2013a).

Lo anteriormente expuesto sólo expone un resumen breve de la lesión por I/R, lo cual pone de evidencia la multitud de mediadores y factores implicados en esta patología. Es importante destacar que los mecanismos implicados en la lesión por I/R hepática, como, por ejemplo, los RLO, alteraciones en los niveles de citoquinas o desórdenes microcirculatorios, afectan negativamente a los procesos de regeneración (Selzner et al.,

2002; Ramalho et al., 2006; Vollmar and Menger, 2009). Además, tal y como se observará en los apartados siguientes, la patofisiología y los mecanismos implicados en la lesión por I/R y fallo en la regeneración hepática asociados a la cirugía hepática pueden ser específicos según si el hígado sometido a cirugía presenta o no esteatosis, lo que dificulta enormemente la búsqueda de dianas y tratamientos farmacológicos útiles en ambos tipos de hígados (Selzner and Clavien, 2001; Veteläinen, et al., 2007a; Suzuki et al., 2011).

5. EL HÍGADO ESTEATÓSICO EN LA CIRUGÍA HEPÁTICA DE LAS RESECCIONES

La prevalencia de la esteatosis hepática, entendiéndose como tal la presencia la infiltración lipídica en las células hepáticas, es del 20 – 30 % de la población mundial, y un 95% en las personas obesas (Sikalias et al., 2017). Debido al aumento de la obesidad en los países occidentales, se espera que la prevalencia de hígado graso aumente considerablemente.

La esteatosis se puede cuantificar por microscopía o espectroscopía, expresada como el porcentaje de hepatocitos que presentan vacuolas lipídicas en su citoplasma (Figura 5.1) Cuando excede el 5%, se considera patológica (Tashiro et al., 2014). Según el porcentaje de grasa, se puede hablar de esteatosis leve (hasta un 30% de hepatocitos grasos); moderada (entre el 30 y 60%) y severa (más del 60%) (Adam et al., 1991). Existe otra clasificación dependiendo de la manera en que la grasa puede almacenarse dentro de las células. Hablamos así de esteatosis macrovesicular o macroesteatosis cuando los lípidos que concentran en una única vacuola grande que desplaza el núcleo del hepatocito a la periferia celular. Por otro lado, se conoce como esteatosis microvascular o microesteatosis cuando en el citoplasma del hepatocito existen múltiples vacuolas pequeñas que no desplazan el núcleo. Normalmente se encuentran los dos tipos de esteatosis en los diferentes grados de severidad (McCrack et al., 2011).

Entre los factores causantes de la acumulación de lípidos destacan una dieta alta en grasas y consiguiente obesidad, diabetes, hiperlipidemia, consumo excesivo de alcohol, hepatitis y síndrome metabólico, entre otros (Sikalías et al., 2017).

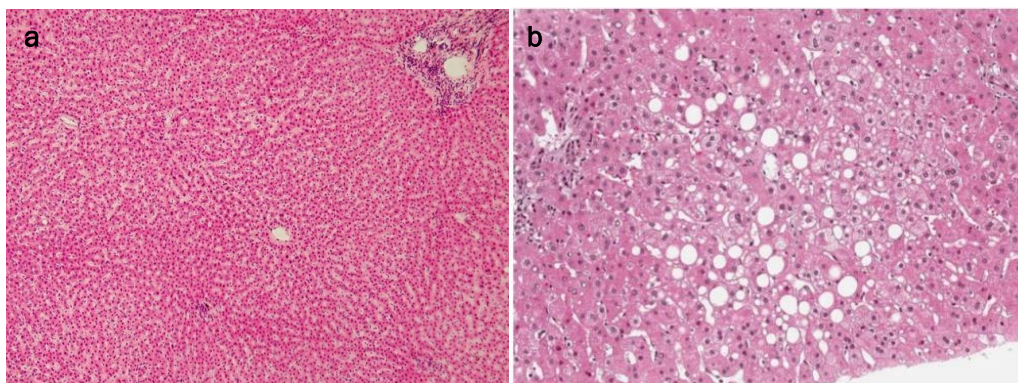


Figura 5.1. Tinciones histológicas de hematoxilina-eosina de un hígado sano (a) versus un hígado esteatósico (b). Fuente: a) Wiedmann et al., 2009; b) Department of Histology, Jagiellonian University Medical College.

5.1. Relevancia de la esteatosis en cirugía hepática

Se estima que más del 20% de los pacientes programados para resección hepática presentan algún grado de esteatosis (Veteläinen et al., 2007a).

La esteatosis es un factor de riesgo importante en la cirugía hepática, asociado con complicaciones postoperatorias, disfunción hepática, fallo en la regeneración y mayor mortalidad. Los datos de estudios clínicos confirman la correlación entre la extensión de la esteatosis con el aumento de la vulnerabilidad al daño por I/R (Li et al., 2018). En tal caso, en un estudio de 135 pacientes sometidos a resección hepática, se asoció el grado de esteatosis con mayor duración de la intervención y niveles de bilirrubina postoperatoria más altos. Además, se produjo fallo hepático en el 14% de los pacientes con esteatosis frente al 4% de hígados no grasos (Behrns et al., 1998; Selzner et al., 2001). Otro estudio de resección hepática en 478 pacientes asoció la presencia de esteatosis con un aumento significativo en las complicaciones postoperatorias y fallo regenerativo (22% frente al 8%) (Belghiiti et al., 2000; Selzner et al., 2001). En la misma línea, se estimó un riesgo de muerte post-hepatectomía aproximadamente 3 veces mayor en pacientes con al menos un 30% de estosis respecto a los pacientes con un porcentaje menor de grasa hepática (de Meijer et al., 2010). Se ha sugerido que la esteatosis macrovesicular es más susceptible al daño por I/R que la microvesicular (Li et al., 2018).

Dado el aumento en la prevalencia de esteatosis que se espera en la población y por lo tanto en la cirugía hepática, es evidente la necesidad de desarrollar estrategias para minimizar los efectos adversos de la lesión por I/R en los hígados esteatósicos y el fallo en la regeneración hepática que presentan tales hígados. Esto disminuiría por lo tanto el riesgo de disfunción y/o fallo hepático tras la cirugía de las resecciones. Para lograrlo es imprescindible el estudio de los mecanismos que conducen a la mayor susceptibilidad de un hígado esteatósico frente a la lesión por I/R y al fallo en la regeneración.

5.2. Mecanismos implicados en la lesión por I/R y fallo en la regeneración en el hígado esteatósico

Las causas de la mayor susceptibilidad de los hígados esteatósicos frente a la lesión por I/R y fallo en la regeneración no están totalmente definidas. Se han planteado diversas hipótesis para explicar los mecanismos implicados en tal patología que se describen a continuación.

5.2.1. Alteraciones del metabolismo energético

La fosforilación oxidativa en las mitocondrias es deficiente en hígados esteatósicos sometidos a isquemia, provocado por un bloqueo en el complejo I de la cadena respiratoria y fallo en la ATP sintasa. La depleción de ATP desencadena necrosis celular irreversible (Tashiro et al., 2014). La disfunción mitocondrial también afecta al metabolismo de la glucosa. La esteatosis conlleva una acumulación de ácidos grasos no esterificados que tienen un efecto inhibitor en la β -oxidación y, por lo tanto, se produce un descenso de Acetil-CoA, componente clave en el ciclo de Krebs y gluconeogénesis. La inhibición de estas dos vías energéticas en el hígado sería corresponsable de la depleción de ATP (Selzner et al., 2001).

Diversos estudios muestran que tras varias horas de isquemia los hígados esteatósicos presentan una depleción de los niveles de ATP durante la isquemia mayor que la sufrida por los hígados no esteatósicos (Fukumori et al., 1997; Selzner et al., 2003). En otros estudios se observaron niveles semejantes de ATP en ambos tipos de hígados durante la isquemia, pero una recuperación del metabolismo energético más lenta durante la reperfusión en los hígados esteatósicos (Trevisani et al., 1996). Según estos últimos datos, la esteatosis no afecta directamente al metabolismo energético de los hepatocitos durante la isquemia, pero reduce la capacidad de las mitocondrias de generar ATP al iniciarse la reperfusión (Hui et al., 1994; Fukumori et al., 1997; Chavin et al., 1999; Rashid et al., 1999; Caraceni et al.,

2004). Para explicar tales resultados, diversos autores postulan que la presencia de grasa en el hepatocito produce diversas alteraciones en las mitocondrias, desencadenando en un significativo deterioro del metabolismo energético tras la cirugía y contribuyendo a la vulnerabilidad que presentan los hígados esteatósicos frente a la lesión por I/R y al fallo en la regeneración (Hui et al., 1994; Fukumori et al., 1997; Miki et al., 1998; Nardo et al., 2000; Vendemiale et al., 2001).

5.2.2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo que acompaña la lesión por I/R hepática es la consecuencia de un desequilibrio entre la producción de sustancias prooxidantes y los mecanismos de defensa antioxidantes.

Cuando el hígado es reoxigenado después del periodo isquémico se generan RLO. Los RLO son moléculas pequeñas y altamente reactivas y entre la gran diversidad de RLO existentes, son especialmente relevantes para la lesión por I/R las siguientes: el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($HO\cdot$) y el peroxinitrito ($OONO\cdot$), siendo este último el más predominante en presencia de esteatosis. Los RLO inducen peroxidación de lípidos y por lo tanto, afectan la integridad de los receptores y transportadores de membrana, como explicamos más adelante. Además, los RLO dañan proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y contribuyen al fallo microvascular (Ferguson et al., 1991, Kanno et al., 1993; Elias-Miró et al., 2013; Jaeschke et al., 2000). Para prevenir el daño oxidativo por los RLO, las células tienen mecanismos antioxidantes como la vitamina C, la vitamina E o tocoferol, los β -carotenos, el ácido úrico, los flavonoides, el glutatión (GSH) y enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD). Es importante destacar que durante la I/R se produce una inactivación de tales mecanismos antioxidantes, siendo más acentuada en presencia de esteatosis, lo que exacerba aún más el daño oxidativo ocasionado por los RLO (Sarracino-Inglott et al., 2001; Peralta et al., 2002; Nelson & Cox, 2006).

Los hígados esteatósicos presentan mayor susceptibilidad al daño ocasionado por los RLO, traduciéndose en una exacerbación de la lesión inducida por I/R y fallo en la regeneración. Las membranas celulares de los hígados grasos son más susceptibles a la peroxidación lipídica debida a la sobreproducción de RLO y presentan una respuesta antioxidante insuficiente durante la reperfusión comparado con hígados no grasos. La peroxidación lipídica tiene como consecuencia directa alteraciones estructurales celulares y deterioro funcional de los componentes de la célula, ya que

se ven expuestos al daño de los RLO generados tanto fuera como dentro de estos orgánulos (Elias-Miró et al., 2012). Además, los productos de la peroxidación lipídica como el malondialdehído, podrían actuar como atrayentes de neutrófilos e inducir necrosis celular (Day and James, 1998; Curzio et al., 1985). Una de las causas del aumento en la peroxidación lipídica en hígados grasos es una mayor cantidad de substrato fácilmente oxidable (Letteron et al., 1996).

Diferentes trabajos se han centrado en prevenir el aumento de estrés oxidativo observado en los hígados esteatósicos. El tratamiento con cerulenina, un inhibidor de la enzima ácido graso sintasa (FAS), produce un cambio de macroesteatosis a microesteatosis y aumenta el contenido de ATP mediante la inhibición de la expresión de la proteína desacopladora tipo 2 (UCP-2). (Chavin et al., 2004). La UCP-2 es una proteína de la membrana interna mitocondrial, sobreexpresada en presencia de esteatosis, que regula el flujo de protones de la cadena respiratoria y en última estancia, la producción de ATP. En el contexto de esteatosis, la desregulación de esta proteína provocaría que la energía de la cadena respiratoria se disipara en forma de calor en detrimento de producción de ATP (Tashiro et al., 2014). La administración de un flavonoide antioxidante, el galato de epigallocatequina (EGCG), 5 días antes de la isquemia reduce el contenido lipídico hepático y los niveles de UCP-2, traduciéndose en un aumento de los niveles de ATP (Fiorini et al., 2005). Otro antioxidante, el tocoferol, aumenta la tolerancia del hígado graso a la isquemia caliente (Elias-Miró et al., 2012) y la L-carnitina es capaz de recuperar la fluidez y estabilidad de la membrana y secuestrar RLO, aumentando la viabilidad de los hígados esteatósicos sometidos a cirugía (Tolba et al., 2003).

No obstante, los datos obtenidos en los estudios en los que se administraban antioxidantes han sido contradictorios. Estudios experimentales en hígados con esteatosis inducida por una dieta deficiente en colina-metionina mostraron que la administración de precursores de GSH, como la N-acetilcisteína, pueden ayudar a restaurar la integridad hepatocitaria en los hígados esteatósicos, pero sin bloquear los RLO ni sus efectos nocivos. Además, en hígados esteatósicos inducidos por dieta o por alcohol, se producen RLO insensibles a la SOD y catalasa y que están implicados en la vulnerabilidad de este tipo de hígados a la lesión por I/R (Soltys et al., 2001; Nardo et al., 2001; Caraceni et al., 2005).

Además de lo mencionado anteriormente, hay que considerar el papel divergente del NO en función del tipo de hígado sometido a cirugía. El NO podría ser perjudicial en

términos de estrés oxidativo en presencia de esteatosis. En condiciones fisiológicas, tanto el NO como el anión superóxido son producidos en las células endoteliales, con una producción de NO 2-3 veces superior a la del anión superóxido, lo que permite captarlo cómodamente. Sin embargo, tras la I/R hepática, se produce un desequilibrio en esta proporción debido a una disminución e inactivación de los sustratos, cofactores y enzimas necesarios para la síntesis de NO y el aumento de RLO, lo cual es más evidente en presencia de esteatosis. En consecuencia, los niveles de RLO aumentan y exceden los de NO, impidiendo que éste sea capaz de captar y neutralizar el anión superóxido (Elias-Miró et al., 2012). En presencia de esteatosis se genera además peroxinitrito, lo cual es extremadamente perjudicial en procesos de I/R e influye negativamente en la regeneración hepática (Ramalho et al., 2009; Suzuki et al., 2011).

5.2.3. Alteraciones en la microcirculación

Las alteraciones en la microcirculación se han propuesto como un factor importante en la baja tolerancia que presentan los hígados grasos frente a la lesión inducida por I/R. La acumulación de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos está asociada con el incremento del volumen celular, que puede provocar la obstrucción completa o parcial del espacio sinusoidal hepático (Ogawa et al., 2014). Se produce entonces un estado continuo de hipoxia crónica, por lo que las células están predispuestas a la lesión por I/R (Tashiro et al., 2014). Se ha observado en estudios con humanos y animales que el espacio sinusoidal en un hígado graso puede verse reducido hasta un 50% comparado con un hígado no graso (Farrell et al., 2008). Este estrechamiento de la luz del sinusoides, junto a la inflamación, edema celular y adhesión de plaquetas y leucocitos que desencadena la I/R, amplifica los efectos nocivos de ésta. La luz sinusoidal se ve además afectada por glóbulos de grasa liberados durante la preservación y la reperusión del injerto, además de microtrombos de fibrina y elementos celulares que están en la sangre después de la reperusión (Teramoto et al., 1993).

5.2.4. Citoquinas

El TNF- α actúa a través de sus dos receptores de membrana tipo 1 y 2 (TNFR1 y TNFR2, respectivamente) y tiene diversas funciones: activación del factor nuclear kappa beta (NF- κ B), proteínas quinasa activadas por estrés (SAPKs) y la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), induce la sobreproducción de RLO y regula en última instancia

vías apoptóticas (Zhang et al., 2007; Cannistrà et al., 2016). No obstante, en el contexto de I/R, esta citoquina puede ejercer efectos hepatoprotectores, dependiendo del tipo celular y de las condiciones experimentales. Por ejemplo, se ha constatado su implicación en la regeneración hepática en trasplantes hepáticos con injertos de tamaño reducido (Casillas-Ramírez et al., 2006b). El TNF- α administrado en dosis altas perjudica la regeneración del hígado, no teniendo efecto si se administra en dosis bajas. Por otro lado, esta citoquina induce la síntesis de DNA en cultivos de hepatocitos en suero, pero no tiene efecto mitogénico cuando el medio de cultivo no contiene factores de crecimiento (Fausto, 2000; Yamada et al., 1997). En presencia de esteatosis, se ha observado que altos niveles de TNF- α están asociados a lesión y fallo en la regeneración tras la cirugía hepática (Serafín et al., 2004b; Veteläinen et al., 2007b).

Por su lado, tanto la IL-1 α como la IL-1 β , tienen una acción inhibitoria sobre la proliferación de hepatocitos *in vitro*. En estudios experimentales *in vivo* de PH, se ha observado que la administración exógena de IL-1 β reduce la regeneración hepática (Boulton et al., 1997; Court et al., 2002). La IL-1 β puede estimular la adhesión y agregación leucocitaria por la activación del NF- κ B y MIP-2, además de estimular la producción de NO por la vía Akt e iNOS (Cannistrà et al., 2016). Los hígados esteatósicos presentan niveles elevados de IL-1 comparados con los no esteatósicos, lo cual contribuye a la menor tolerancia de la lesión inducida por I/R (Serafín et al., 2004b).

Entre las citoquinas antiinflamatorias, cabe destacar la IL-6 y la IL-10. En el contexto de la regeneración hepática, se ha visto que la IL-6 está íntimamente ligada al TNF- α . Estudios con ratones knock-out para los genes TNFR1 y IL-6, mostraron una pobre regeneración tras una PH, que se recuperaba tras administrar IL-6. A partir de estos estudios se sugirió que el TNF- α , a través del TNFR1, podría iniciar la regeneración hepática y activar una vía dependiente de IL-6 en la que participa el factor de transcripción STAT3 y NF- κ B (Sudo et al., 2008). La IL-6 estimularía la producción de GH, por lo que contribuiría a la disminución de RLO (Husted et al., 2006). Se sabe que los hígados esteatósicos, al someterlos a un proceso de I/R, producen una menor cantidad de IL-10 que los no esteatósicos, traduciéndose en unos efectos postoperatorios deficientes tras la cirugía hepática (Serafín et al., 2004b).

5.2.5. Células de Kupffer y neutrófilos

Investigaciones previas han demostrado que una dieta alta en grasas aumenta la activación de KC y esto se asocia con un aumento de la severidad de la inflamación en I/R hepática (Li et al., 2018). Los hígados esteatósicos presentan alteraciones en la fluidez de las membranas debido a la menor presencia de colesterol y de ácidos grasos poliinsaturados (Fukumori et al., 1997). Tanto las KC como los neutrófilos son fuentes de proteasas, RLO, y moléculas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β . Esto conlleva una activación de las LSECs y a un aumento en la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión vascular (VCAM-1) y la P-selectina que promueven la acumulación de neutrófilos y favorece la respuesta inflamatoria asociada a la I/R hepática (Peralta et al., 2013; Jones et al., 2015).

En un modelo experimental de trasplante hepático en ratas Zucker (genéticamente obesas) se demostró que el bloqueo de integrinas y selectinas, moléculas implicadas en la adhesión de los neutrófilos al endotelio sinusoidal, redujo la lesión hepática y aumentó la supervivencia de los receptores (Amersi et al., 2003). En los hígados grasos, se ha demostrado un aumento en el número y en la actividad fagocítica de las KC, con respecto a los hígados no esteatósicos (Teramoto et al., 1993). Sin embargo, en modelos de I/R normotérmica sin PH en ratas Zucker, la acumulación de neutrófilos no parece ser responsable de la tolerancia reducida de estos hígados grasos frente a la lesión por I/R, ya que éstos presentan unos niveles de acumulación de neutrófilos y alteraciones microcirculatorias similares a los hígados no grasos (Serafín et al., 2002; Peralta et al., 2013).

Por otra parte, en un estudio se observó que, después de la I/R, la adhesión de KC y plaquetas en hígados con una esteatosis media (5-30%) no estaba correlacionada con un aumento de la lesión por I/R, hecho que no ocurría cuando el grado de esteatosis era mayor (30-60%) ya que estaba agravando la lesión por I/R (Ogawa et al., 2014).

5.2.6. Otros mecanismos menos estudiados en la literatura

En relación al estrés del RE, se ha observado que las chaperonas encargadas del correcto plegamiento proteico en la respuesta UPR, están menos expresadas en

hígados con esteatosis. En un estudio de PH del 70% en hígados grasos, IRE1 y PERK resultan activadas. Estas proteínas se encargan de la expresión de factores encaminados a recuperar la homeostasis en la UPR, pero si la lesión es muy severa, pueden provocar la muerte celular (Ben Mosbah et al., 2010; Tashiro et al., 2014). En este sentido, el tratamiento con ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) protege al hígado graso de la lesión inducida por el estrés RE mediante la reducción de la expresión de IRE1 y PERK (Anderson et al., 2011). Por otro lado, el papel del estrés del RE en condiciones de trasplante es contradictorio, y esta observación se ha evidenciado también con los mecanismos que a continuación se especifican (Jiménez-Castro et al., 2012).

En relación al PPAR α y PPAR γ , además de actuar en el metabolismo de ácidos grasos, aminoácidos y glucosa, están involucrados en el control de la respuesta inflamatoria y adipogénesis y almacenamiento de lípidos. En hígados grasos sometidos a cirugía, se ha evidenciado cambios en la expresión de PPAR α y PPAR γ en hígados no esteatósicos, pero existen controversias con respecto al papel ejercido en presencia de esteatosis. Lo mismo ocurre con el papel de la adiponectina, adipocitoquinas como la resisitina y visfatina, del HMGB1, de la vía TLR4 y de los antagonistas de los receptores de Ang II. De hecho, cuando se evalúan los resultados descritos en la literatura, existen notables diferencias en el papel ejercido por tales mecanismos en función del tipo de hígado, de las distintas condiciones quirúrgicas y grados de esteatosis. Teniendo en cuenta tales observaciones y los pocos estudios experimentales existentes, es difícil poder llegar a conclusiones fehacientes en relación a la relevancia de tales mecanismos en la lesión y fallo en la regeneración tras la cirugía de las resecciones (Elias-Miró et al., 2014; Jiménez-Castro et al., 2013b; Ramalho et al., 2009; Cornide-Petronio et al., 2016; Jiménez-Castro et al., 2012; Peralta et al., 2013).

Una característica clave del daño isquémico en el hígado no esteatósico es la apoptosis, una forma activa de muerte celular que requiere energía. El porcentaje de hepatocitos apoptóticos tras la I/R se correlaciona con el daño hepático y la supervivencia de los animales de experimentación. El uso de estrategias antiapoptóticas ha resultado beneficioso para la lesión inducida por I/R en hígados no esteatósicos (Natori et al., 1999; Selzner y Clavien, 2001).

Los hígados esteatósicos presentan alteraciones en la vía de señalización apoptótica. Mientras que los hígados no grasos muestran la apoptosis como forma predominante de muerte celular tras un insulto por I/R, las ratas esteatósicas tienen

una tasa apoptótica muy inferior y tardía, que se manifiesta como un descenso en los mediadores apoptóticos como caspasas y citocromo c (Cyt c). En su lugar, el tipo de muerte celular predominante en hígados grasos es la necrosis. En la muerte celular por necrosis se produce una rotura inespecífica de los orgánulos celulares y de la membrana citoplasmática, liberándose así el contenido celular y agravando la lesión inflamatoria hepática (Behrns et al., 1998; Crowley et al., 2000). De hecho, estudios que evalúan el papel de la apoptosis en animales sometidos a I/R hepática en presencia o no de esteatosis indican que el bloqueo de la apoptosis tiene un efecto protector frente a la lesión por I/R solo en hígados no esteatósicos, mientras que no tiene relevancia en presencia de esteatosis (Selzner and Clavien, 2001; Casillas-Ramírez et al., 2006a).

El hecho de que se produzca uno u otro tipo de muerte celular podría estar asociado, entre otros factores, con la disponibilidad de ATP de la célula, ya que como se ha comentado anteriormente la apoptosis es un proceso dependiente de ATP. De este modo, el deterioro del metabolismo energético que presentan los hígados grasos tras la I/R hepática podría explicar el fallo de la apoptosis en este tipo de hígados y el predominio de la lesión por necrosis como forma de muerte celular (Selzner and Clavien, 2001; Behrns et al., 1998; Crowley et al., 2000).

6. ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS PARA REDUCIR LA LESIÓN POR I/R

La importancia de intentar paliar los efectos nocivos de la lesión por I/R y el fallo en la regeneración asociado a la cirugía hepática es evidente al tratarse de un tipo de daño presente en un gran número de intervenciones quirúrgicas. Por eso se ha investigado desde diferentes áreas, desde la cirugía hasta la farmacología o biología molecular, con la finalidad de encontrar estrategias que ayuden a reducir los efectos adversos de esta patología. Algunos de los tratamientos farmacológicos que se han aplicado hasta el momento para reducir la lesión y el fallo en la regeneración asociado a las resecciones se resumen en las tablas 6.1 y 6.2. En general, estas estrategias se han centrado en disminuir la producción de RLO y la respuesta inflamatoria que caracteriza la lesión por I/R y recuperar el metabolismo energético (Jiménez-Castro et al., 2013b).

Fármaco	Especie	Modelo	Esteatosis	Efecto sobre I/R	Referencia
Alopurinol Inhibidor XOD	Ratón	30 min isquemia total	No	↓ lesión, ↑ GSH, ↓ peroxidación lipídica, ↓ apoptosis	Liu et al., 2008
Apocinina Inhibidor NADPH oxidasa	Ratón	30 min isquemia total	No	↓ lesión, ↑ glutatión, ↓ peroxidación lipídica, ↓ apoptosis	Liu et al., 2008
Atorvastatina Vasoprotector	Rata	60 min isquemia total	No	↓ lesión, inflamación	Cámara-Lemarroy et al., 2014
Aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) Inhibidores de KCs	Rata	30 min isquemia total	No	↓ lesión, inflamación y alteraciones microcirculación	Kitagawa et al., 2013
Carvacrol Antimicrobial	Rata	30 min isquemia total	No	↓ lesión, apoptosis y estrés oxidativo ↑ fosforilación Akt	Suo et al., 2014
Cerulenina Inhibidor síntesis AGs	Ratón	15 min isquemia total	Sí	↓ UCP-2, ↑ ATP	Chavin et al., 2004
CR2-CD59 Inhibidor del complemento	Rata	30 min isquemia total	No	↓ lesión; ↑ regeneración hepática, supervivencia, TNF α , IL-6, STAT3, Akt, ATP	Marshall et al., 2014
Hidrato sódico sivelestat Inhibidor neutrófilo elastasa	Rata	30 min isquemia total	No	↓ lesión, acumulación neutrófilos	Sakai et al., 2014
IL-10 Citoquina antiinflamatoria	Ratón	15 min isquemia total	Sí	↑ supervivencia, inhibición IL-1 β , ↓ inflamación	Sutter et al., 2014
Inhibidor Rho-quinasa	Rata	45 min isquemia total	Sí	↓ lesión, presión portal al reperfundir; ↑ supervivencia	Kuroda et al., 2015
Levosimendan Regulador de canales K _{ATP}	Rata	40 min isquemia total	No	↓ lesión, apoptosis; ↑ COX, regulación del estrés oxidativo, inflamación, NO; ↑ microcirculación	Ibrahim et al., 2014
Litio	Rata	60 min isquemia total	No	↓ lesión, inflamación y HMGB1	Liu et al., 2013a
Nanopartículas de platino	Ratón	15 min isquemia total	No	↓ lesión,	Katsumi et al., 2014
Sevoflurano Anestésico	Cerdo	40 min isquemia total	No	↓ lesión,	Balzan et al., 2014

Tabla 6.1. Estrategias farmacológicas para tratar la lesión por I/R y regeneración en modelos animales de isquemia total o parcial

Fármaco	Especie	Modelo	Esteatosis	Efecto sobre I/R	Referencia
Terapia hiperbárica con O₂	Rata	30 min isquemia total	No	↓ lesión; ↑ función mitocondrial	Losada et al., 2014
Tocoferol Antioxidante	Rata	60 min isquemia total	No	↓ lesión, ↓ peroxidación lipídica	Giakoustidis et al., 2002
15-desoxi-$\Delta^{12,14}$- prostaglandina J₂	Ratón	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, inflamación; ↑ respuesta antioxidante dependiente de Nrf2	Kudoh et al., 2014
1A29 Anticuerpo anti-ICAM-1	Rata	30 min isquemia parcial	Sí	↓ oxidación neutrófilos, ↑ integridad celular	Nakano et al., 1998
Ácido α-lipoico Antioxidante	Rata	45 min isquemia parcial	No	↓ TNF, IL1 β , ↓ lesión, ↑ GSH, ↓ peroxidación	Dulundu et al., 2007
Ácido eicosapentaenoico Ácido docosahexaenoico AGs poliinsaturados n3	Rata	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, ↑ función hepática, ↑ activación PPAR α , ↓ inflamación,	Zúñiga et al., 2011
Ácido carnósico Derivado del romero	Rata	45 min isquemia parcial	No	↓ lesión; ↑ SOD y SIRT1	Yan et al., 2014
Ácido rosmarínico Antioxidante	Rata	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, estrés oxidativo, respuesta inflamatoria, eNOS, INOS, NO, señalización NF-kB	Ramalho et al., 2014
Ácido sulfhídrico gasotransmisor	Ratón	75 min isquemia parcial	No	↑ supervivencia, ↑ regeneración hepática; ↓ lesión, apoptosis, inflamación	Shimada et al., 2014
Adenosina Mediador celular	Rata	60 min isquemia parcial	No	↓ infiltración y acumulación de neutrófilos, TNF y lesión,	Harada et al., 2000
Adiponectina Adipocitoquina	Rata	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, inflamación y apoptosis; ↑ AMPK, eNOS	Zhang et al., 2013
ALR	Ratón	90 min isquemia parcial	No	↓ lesión, apoptosis, reclutamiento células T CD4+	Khandonga et al., 2014
Ago-miR-146a	Ratón	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, apoptosis y activación de TLR4	Jiang et al., 2014
Antag PAR-4 antiplaquetario	Ratón	90 min isquemia parcial	No	↓ lesión, reclutamiento plaquetario, células-T CD4+, apoptosis	Mende et al., 2014

Cont. Tabla 6.1. Estrategias farmacológicas para tratar la lesión por I/R y regeneración en modelos animales de isquemia total o parcial

Fármaco	Especie	Modelo	Esteatosis	Efecto sobre I/R	Referencia
Anticuerpo anti-CD25	Ratón	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, inflamación, reclutamiento células T CD4+	Yang et al., 2014
Ascorbato Antioxidante	Rata	30 min isquemia parcial	No	↓ apoptosis	Ichiki et al., 2008
Bloqueo CIRP antiinflamatorio	Ratón	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, inflamación y apoptosis ↑ supervivencia	Godwin et al., 2015
Butirato AG de cadena cota de 4C	Rata	45 min isquemia parcial	No	↑ función hepática; ↓ lesión e inflamación; ↓ apoptosis; ↓ acumulación neutrófilos	Liu et al., 2015
Cloroquina Anti malaria e inhibidor autofagia	Rata	60, 90 min isquemia parcial	No	Reperusión temprana: ↓ lesión, inflamación, HMGB1 Reperusión tardía: ↑ lesión, apoptosis; ↓ autofagia	Fang et al., 2013
DADLE Agonista receptor δ-opioide	Ratón	45 min isquemia parcial	No	↓ lesión, ↓ peroxidación lipídica, ↑ expresión HO-1 ↑ SOD, CAT, GPx,	Zhou et al., 2017
Dexmedetomidina Antag receptores α2	Rata	60 min isquemia parcial	No	↑ CAT, SOD, GPx, ↓ lesión	Sahin et al., 2013
Dianexina Inhibidor micropartículas	Ratón	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión e inflamación	Teoh et al., 2014
Diazóxido Activador canales K	Rata	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión e inflamación,	Nogueira et al., 2014
Dimetilfumarato Inmunosupresor	Rata	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, ↑ función hepática, ↓ inflamación, ↓ estrés oxidativo	Takasu et al., 2017
Dioscina Antioxidante	Rata	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, estrés oxidativo, inflamación, apoptosis; ↑ supervivencia	Tao et al., 2014
Dipiridamol Inhib transportador nucleósidos	Ratón	45 min isquemia parcial	No	↓ lesión; ↑ adenosina	Zimmerman et al., 2013
Edaravona Captador radicales libres	Rata	90 min isquemia parcial	No	↓ lesión, estrés oxidativo	Uchiyama et al. 2015

Cont. Tabla 6.1. Estrategias farmacológicas para tratar la lesión por I/R y regeneración en modelos animales de isquemia total o parcial

Fármaco	Especie	Modelo	Esteatosis	Efecto sobre I/R	Referencia
Eritropoyetina Inductor HO-1	Ratón	90 min isquemia parcial	No	↓ lesión, apoptosis; ↑ HO-1	Riehle et al. 2014
Formulación AGs ω-3	Ratón	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, inflamación, ↑ GPR120	Raptis et al., 2014
GPC Fosfolípido desacilado	Rata	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, NADPH oxidasa, MPO, HMGB1, alteraciones microcirculación	Hartmann et al., 2014
GSH antioxidante	Rata	90 min isquemia parcial	No	↓ lesión, estrés oxidativo, TNFα y apoptosis	Suyavaran, A. et al. 2015
Helio	Ratón	90 min isquemia parcial	No	↓ lesión, ↑ supervivencia, PI3K/Akt	Zhang et al. 2014
Hidroxitirosol Antioxidante	Ratón	75 min isquemia parcial	No	↓ lesión, producción de ROS e inflamación, ↑ producciones antioxidantes	Pan et al., 2013
Inhib miR-370	Ratón	75 min isquemia parcial	No	↓ lesión y respuesta inflamatoria	Li et al. 2015a
L-arginina Precursor de NO	Rata	45 min isquemia parcial	No	↓ lesión, y congestión vascular,	Lucas et al., 2015
	Conejo	60 min isquemia parcial	No	↓ congestión vascular, ↓ infiltración leucocitaria ↓ lesión e inflamación	Taha et al., 2012
Limonina Antioxidante	Rata	45 min isquemia parcial	No	↓ lesión, estrés oxidativo, inflamación y señalización TLR4	Mahmoud et al., 2014
Lisinopril Inhibidor ACE	Rata	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, ↑ función hepática, ↓ peroxidación lipídica, ↑ NO	Morsy, 2011
Litio	Rata	90 min isquemia parcial	No	↓ lesión, inflamación y HMGB1	Liu et al., 2013a
Losartan Antag Receptor Angiotensina	Ratón	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, inflamación y apoptosis ↑ PPARγ	Koh et al., 2013
Melatonina Hormona	Ratón	60 min isquemia parcial	No	↓ autofagia, ↑ activación de mTOR	Kang et al., 2014
	Rata	35 min isquemia parcial	Sí	↓ lesión, ↓ apoptosis, ↓ estrés oxidativo; ↑ ATP	Kireev et al., 2013
	Ratón	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, activación vía Raf-MEK-ERK, y apoptosis,	Gim and Ko., 2015

Cont. Tabla 6.1. Estrategias farmacológicas para tratar la lesión por I/R y regeneración en modelos animales de isquemia total o parcial

Fármaco	Especie	Modelo	Esteatosis	Efecto sobre I/R	Referencia
Minociclina Antibiótico	Rata	2, 6, 24 horas Isquemia parcial	No	↓ lesión, estrés oxidativo, citoquinas inflamatorias y activación vía Wnt/ β -catenina	Li et al., 2015b
Monóxido de carbono Gasotransmisor	Ratón	90 min isquemia parcial	No	↓ lesión; ↑ fosforilación Akt	Kim et al., 2013
N-acetilcisteína Antioxidante	Ratón	90 min isquemia parcial	No	↓ producción ROS, lesión, estrés RE y apoptosis	Sun et al., 2014
Olprinona Inhibidor fosfodiesterasa	Rata	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión y peroxidación lipídica, ↑ enzimas antioxidantes y Akt	Bejaoiu et al., 2018
OP-2507 Análogo de prostaciclina	Rata	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión y adhesión leucocitaria, ↑ función microvascular	Chen et al., 2001
Péptido derivado de fribrina Bβ15-42	Rata	30 min isquemia parcial	No	↓ lesión, inflamación y HMGB1	Liu et al., 2013b
Péptido de suero de leche hidrolizado	Rata	30 min isquemia parcial	Sí	↓ lesión, necrosis y apoptosis; ↑ NF- κ B	Hanaoka et al., 2014
Péptido vasoactivo intestinal	Ratón	90 min isquemia parcial	No	↓ lesión, apoptosis e inflamación; ↑ señalización cAMP/PKA	Ji et al., 2013
Piruvato de etilo Antiinflamatorio	Ratón	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, apoptosis, autofagia, y eje HMGB1-TLR4-NF- κ B	Shen et al. 2013
Propofol73 Anestésico	Rata	30, 60, 90 min isquemia parcial	No	↓ lesión, apoptosis y GSK β	Zhao et al., 2013
Protopofirina de cobalto Inductos HO-1	Ratón	90 min isquemia parcial	No	↓ lesión, inflamación; ↑ Nrf2, HO-1, PI3K-Akt	Huang et al., 2014
Rapamicina Inhib mTOR	Ratón	90 min isquemia parcial	No	↓ lesión y estrés ER, ↑ autofagia	Zhu et al., 2015
Riboflavina Vitmaina B2	Ratón	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, inflamación, estrés oxidativo, eNOS/iNOS, NO	Sanches et al., 2014

Cont. Tabla 6.1. Estrategias farmacológicas para tratar la lesión por I/R y regeneración en modelos animales de isquemia total o parcial

Fármaco	Especie	Modelo	Esteatosis	Efecto sobre I/R	Referencia
Rosiglitazona Agonista PPAR α	Ratón	60 min isquemia parcial	No	↓ inflamación vía inhibición de TLR4	Zhai et al., 2008
Sevoflurano Anestésico	Rata	60 min isquemia parcial	No	↓ lesión, inflamación, TNF α y IL-6 ↑ función hepática, expresión miR-9-5p	Liao et al., 2019
Sildenafil Guanilato ciclasa inhib	Rata	90 min isquemia parcial	No	↓ lesión, inflamación y apoptosis	Savvanis et al., 2014
Simvastatina vasoprotector	Rata	60 min isquemia parcial	No	Reperusión temprana: ↓ lesión y disfunción LSECs Reperusión tardía: ↓ lesión, apoptosis e infiltración neutrófilos	Gracia-Sancho et al., 2015

Cont. Tabla 6.1. Estrategias farmacológicas para tratar la lesión por I/R y regeneración en modelos animales de isquemia total o parcial

Fármaco	Especie	Modelo	Esteatosis	Efecto sobre I/R	Referencia
C1-INH Inhibidor C1 esterasa	Ratón	60 min isquemia parcial con PH	No	↓ lesión; ↑ regeneración hepática y supervivencia	Saidi et al., 2014
Espermidina / Espermina Poliaminas donadoras de NO	Rata	40 min isquemia con PH 70%	No	↓ lesión, inflamación, necrosis y apoptosis, ↑ regeneración	Okumura et al., 2016
FK3311 Inhibidor ciclooxigenasa 2	Perro	60 min isquemia parcial con PH	No	↑ microcirculación y supervivencia; ↓ lesión	Takeyoshi et al., 2001
Glucosa/emulsiones lipídicas Suplementos nutricionales	Rata	60 min isquemia parcial con PH	Sí	↓ lesión, ↑ regeneración hepática y niveles ATP	Mendes-Braz et al., 2014
Lisinopril Inhibidor ACE	Rata	40 min isquemia parcial con PH	No	↓ lesión, producción ROS y ET-1	Yirmibesoglu et al., 2011
Resistina/anticuerpos anti-visfatina adipocitoquinas	Rata	60 min isquemia parcial con PH	Sí	↓ lesión, niveles NAD y visfatina; ↑ regeneración hepática	Elías-Miró et al., 2014
Trombomodulina anticoagulante	Rata	20 min isquemia parcial con PH	No	↓ lesión, apoptosis e infiltración macrófagos; ↑ regeneración hepática	Tanemura et al., 2014

Tabla 6.2. Estrategias farmacológicas para tratar la lesión por I/R y regeneración en modelos animales de isquemia parcial con hepatectomía

A pesar de los avances en los tratamientos farmacológicos para prevenir la lesión y fallo en la regeneración (mostrados en las tablas 6.1 y 6.2) los resultados no han sido concluyentes ya que sólo han reducido parcialmente la lesión o el fallo en la regeneración e incluso efectos opuestos se han observado al utilizar los mismos fármacos en función del tipo de hígado y tipo de cirugía hepática.

Adicionalmente, hay que tener presente que pocas investigaciones se han realizado en modelos experimentales que simulen al máximo posible las condiciones clínicas que se dan en las resecciones hepáticas (resección bajo oclusión vascular) y pocos estudios se han centrado en evaluar fármacos que sean eficaces en presencia de esteatosis. Es más, en limitados estudios se investiga el efecto del mismo fármaco en presencia o no de esteatosis y con las mismas condiciones experimentales. Este hecho es importante ya que, si no es el caso, es imposible extrapolar los resultados experimentales a la práctica clínica de las resecciones. Se sabe que fármacos que protegen en hígados no esteatósicos pueden no ser efectivos en presencia de esteatosis. Incluso en diferentes ocasiones, diferentes dosis pueden ser requeridas para proteger frente a la lesión por I/R y fallo en la regeneración dependiendo de si el hígado es o no esteatósico (Ramalho et al., 2009; Elias-Miró et al., 2014; Gracia-Sancho et al., 2015; Mendes-Braz, et al., 2014).

Por todo lo mencionado, la presente Tesis se centrará en el estudio de nuevas dianas de acción farmacológicas no evaluadas hasta el momento y en modelos que mimeticen lo máximo posible a la práctica clínica. Todo ello para resolver el problema clínico de las resecciones hepáticas tanto en hígados esteatósicos como no esteatósicos.

POSIBLES DIANAS FARMACOLÓGICAS

7. CORTISOL

7.1. Generalidades y síntesis

El cortisol, también conocido como hidrocortisona en su forma sintética, es la principal hormona glucocorticoide en humanos y participa en la regulación de la homeostasis del metabolismo basal de proteínas y carbohidratos, equilibrio de sales y agua corporal y modula la respuesta a situaciones de estrés (Walker and Seckl, 2001). Fue descubierta en la década de los años 30 por E. Kendall y colaboradores, cuando aislaron 6 compuestos diferentes de la glándula adrenal, nombrados del A al F, siendo F el cortisol (Mason et al., 1938).

La síntesis del cortisol forma parte de la vía sintética de las hormonas esteroideas, derivadas del colesterol y se produce en la corteza de las glándulas suprarrenales. La corteza está formada por 3 regiones histológicamente distintas: la zona glomerular, la zona fasciculada y la zona reticular. Cada zona contiene una serie de enzimas funcionalmente diferentes que determinarán qué hormona se producirá en cada una de ellas. En la zona fasciculada se producen cortisol y corticosterona; en la zona glomerular se produce aldosterona y finalmente en la zona reticular se produce androstenediona (Katsu and Iguchi, 2015). El primer paso de la síntesis de cortisol es la producción de pregnenolona a partir de colesterol en las mitocondrias. En la zona fasciculada, la pregnenolona se traslada al RE donde es convertida a 17-hidroxipregnenolona por la acción de la enzima 3β -HSD respectivamente. A partir de 17-hidroxipregnenolona (mediante 3β -HSD) se produce 17-

hidroxiprogesterona. La enzima CYP21 transforma la 17-hidroxiprogesterona en 11-desoxicortisol y éste último es finalmente transformado en cortisol en la mitocondria por la enzima CYP11 (Figura 7.1) (Katsu and Iguchi, 2015).

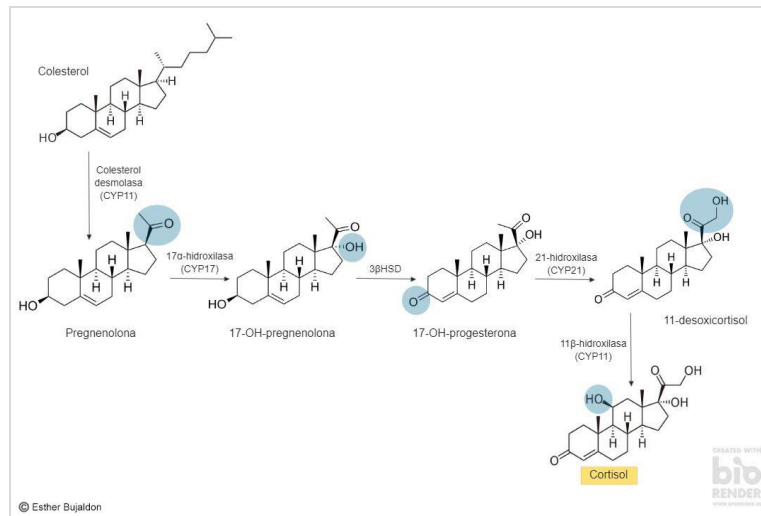


Figura 7.1. Biosíntesis del cortisol.

La secreción de cortisol está controlada por el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) (Figura 7.2). Cuando se activa bajo señales de estrés, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH). La CRH es secretada de forma circadiana por el hipotálamo, produciéndose un pico diurno por la mañana y uno pico menor al atardecer. Esta CRH estimula la hipófisis anterior para secretar la hormona adrenocorticotropa o corticotropina (ACTH). La ACTH se acopla al receptor MC2-R de las células de la corteza adrenal, donde provoca un cambio conformacional en este receptor, activándolo. Este hecho estimula la producción de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) que, a su vez, activa la proteína quinasa A (PKA). La PKA, en la membrana mitocondrial interna, fosforila la proteína transportadora de colesterol StAR. Esta proteína deriva el colesterol hacia la mitocondria donde se inicia la vía biosintética del cortisol descrita anteriormente (Katsu and Iguchi, 2015).

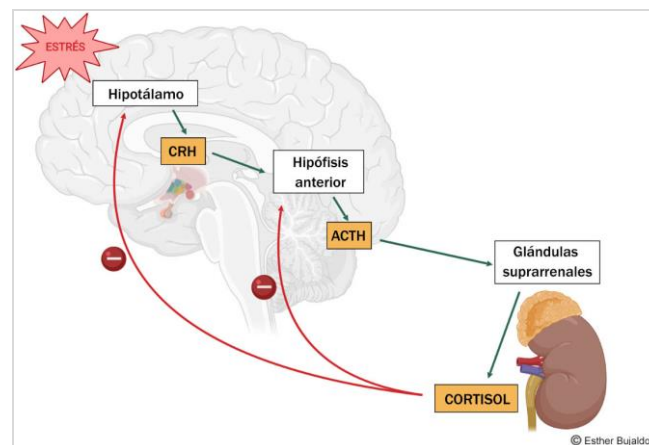


Figura 7.2. Eje HPA

Adicionalmente, existen enzimas metabólicas que se encargan de la regulación del cortisol circulante cuando cesa el estímulo productor del eje HPA, regulando así la respuesta hormonal en determinados tejidos. Las enzimas metabólicas del cortisol principales son las isoenzimas 11 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa Tipo 1 (11 β -HSD1), que en células intactas tiene actividad reductasa, transformando cortisona a cortisol, y la 11 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa Tipo 2 (11 β -HSD2), una deshidrogenasa con alta afinidad por el cortisol que convierte rápidamente el cortisol a cortisona (Figura 7.3) (Chapman et al., 2013). Por otro lado, las 5 α y 5 β reductasas catalizan la reducción del doble enlace del anillo A, contribuyendo por lo tanto a disminuir la acumulación de cortisol. Las enzimas 11 β -HSD1, 11 β -HSD, 5 β -reductasa (5 β R) y las dos isoenzimas de la 5 α -reductasa, tipo 1 (5 α R1) y 2 (5 α R2), se expresan en el hígado, además de otros tejidos. El cortisol *per se* actúa también como molécula reguladora del eje HPA, ya que ejerce un *feedback* negativo sobre la producción de ACTH en la hipófisis y de CRH en el hipotálamo (Figura 7.2) (Fuentes Arderiu et al., 1998).

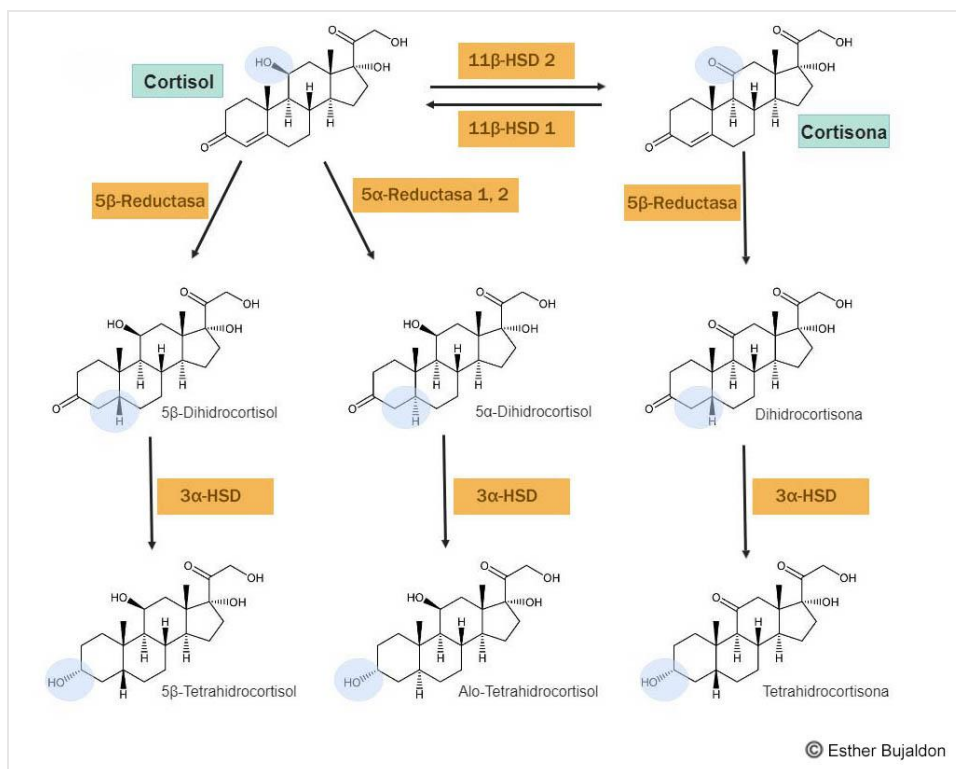


Figura 7.3. Principales enzimas del metabolismo del cortisol y las reacciones que catalizan.

Las hormonas esteroides en general circulan a través del torrente sanguíneo unidos a proteínas transportadoras, desde su lugar de producción hasta los tejidos diana. La mayor parte del cortisol circulante está unido a la globulina captadora de corticosteroides (CBG) (~80%) o a albúmina (~15%), por lo que menos del 5% circula libre, es decir, en su forma activa (Lu et al., 2006).

7.2. Funciones del cortisol

Los glucocorticoides son los primeros responsables de la modulación del metabolismo de hidratos de carbono. El cortisol es el glucocorticoide de origen natural más importante en humanos.

El cortisol actúa sobre el músculo, el hígado y el tejido adiposo para suministrar al organismo el combustible necesario para afrontar diversas situaciones de estrés, como pueden ser hemorragia, infecciones o bajos niveles de glucosa (Nelson and Cox, 2006).

En el tejido adiposo, el cortisol provoca un aumento de la liberación de ácidos grasos de los triglicéridos (TAG) de reserva, que se exportan para ser utilizados como combustible en otros tejidos. El cortisol es responsable de la obtención de sustratos para la gluconeogénesis en el hígado. Estos sustratos son el glicerol obtenido de la movilización de TAGs y aminoácidos procedentes de la degradación de proteínas musculares. En el hígado, el cortisol promueve la síntesis de la proteína PEP carboxiquinasa, esencial para transformar oxalacetato en fosfoenolpiruvato y empezar la gluconeogénesis (Nelson and Cox, 2006).

Bioquímicamente, la función se ejerce después de la incorporación celular del cortisol y la interacción con receptores intracelulares altamente específicos en el núcleo (Figura 7.4) (Nelson and Cox, 2006). El cortisol entra a la célula fácilmente gracias a su estructura lipofílica y se une al receptor de glucocorticoides (GR) intracelular en el citoplasma. Seguidamente, este complejo cortisol-GR se transloca al núcleo, donde puede interactuar con el DNA, desencadenando respuestas diferentes: la transactivación y la transrepresión génicas. La transactivación promueve la expresión de proteínas antiinflamatorias (por ejemplo, MKP-1, I κ B, IL-10 o Annexina-1) o proteínas involucradas en la gluconeogénesis. Por otro lado, la transrepresión consiste en la supresión de la expresión de genes que codifican para proteínas inflamatorias e involucradas en la actividad inmune, por ejemplo, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 beta y 6 (IL-1 β e IL-6, respectivamente) o la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Nixon et al., 2012). La transrepresión también ha sido relacionada con la promoción de la apoptosis en procesos neoplásicos. Por lo tanto, en general, la transactivación ha sido relacionada con efectos adversos del metabolismo de la glucosa, como la diabetes mellitus,

obesidad o intolerancia a la glucosa, mientras que la transrepresión ha sido asociada a efectos antiinflamatorios beneficiosos (Figura 7.4) (Stahn et al., 2007).

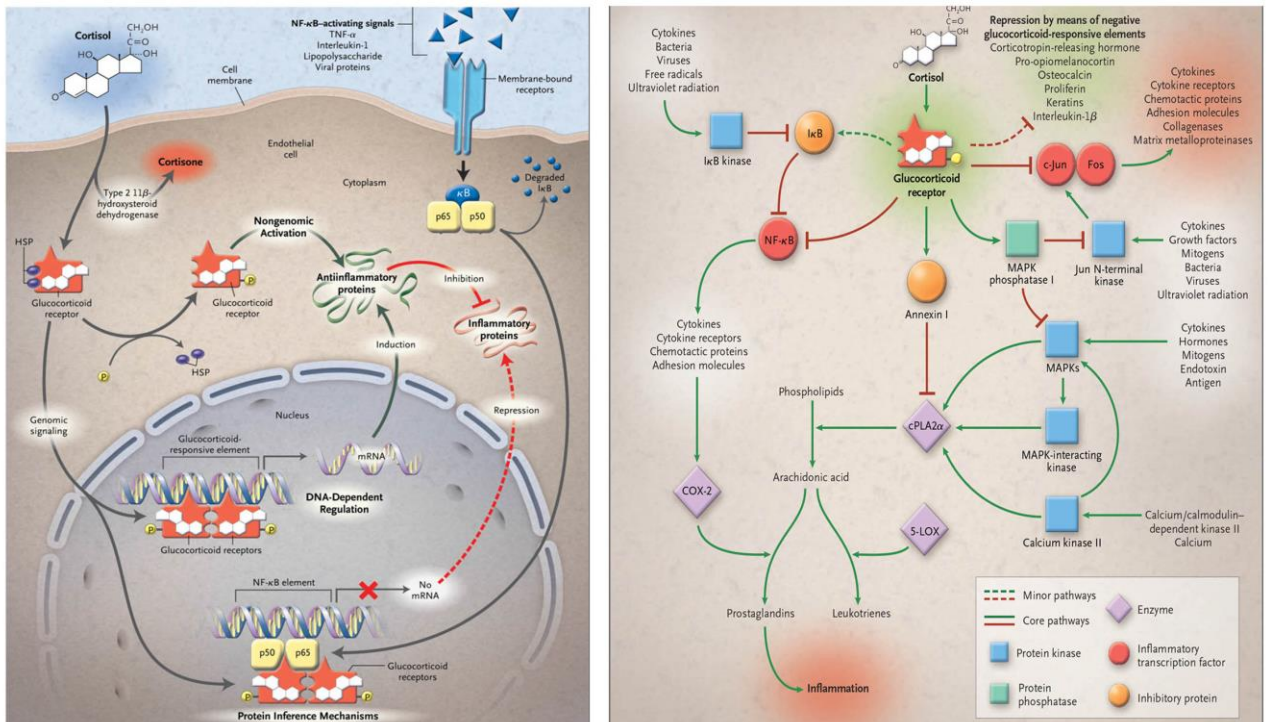


Figura 7.4. Izquierda. Tres mecanismos principales de acción de los glucocorticoides sobre la inhibición de la inflamación: activación no genómica, transrepresión y transactivación genómica. Derecha. Posibles vías en la inhibición de la inflamación. Fuente: Rhen and Cidlowski, 2005.

Los corticosteroides son el tratamiento antiinflamatorio e inmunosupresor clásico para una gran variedad de patologías como el asma, esclerosis múltiple, lupus o enfermedad de Crohn, entre otras.

7.3. El cortisol y la obesidad

Diversos estudios han evidenciado que el metabolismo de los glucocorticoides en pacientes con obesidad está alterado en diferentes tejidos.

Los niveles de glucocorticoides, incluido cortisol, no están elevados en pacientes con síndrome metabólico. Sin embargo, los metabolitos excretados en la orina sí se encuentran elevados en pacientes con acumulación de grasa visceral, indicando una sobreproducción de cortisol (Gathercole and Stewart, 2010). Así mismo, se observa una mayor sensibilidad del eje HPA a la acción de ACTH y CRH. Esto sigue o bien una alteración de la producción de cortisol o un aumento del metabolismo encargado de eliminarlo (Walker and Seckl, 2001). En esta línea, en pacientes obesos se

encontraron niveles elevados de los metabolitos que producen las 5 α -reductasas, indicando por lo tanto una mayor actividad de estas enzimas encargadas de reducir los niveles de cortisol circulantes (Andrew et al., 1998). Esta reducción en los niveles de cortisol circulantes comporta una menor inhibición del eje HPA por feedback negativo, lo que resulta en un aumento neto de la actividad el eje HPA. (Walker and Seckl, 2001). Esta actividad aumentada del eje HPA ha sido comprobada en pacientes adultos diabéticos con esteatosis no alcohólica (Targher et al., 2005).

La 11 β -HSD1, que produce cortisol a partir de cortisona, ha sido considerada como una molécula diana en obesidad. Se ha observado que la actividad de esta enzima se encuentra reducida en hígados esteatósicos. Sin embargo, cuando se añaden complicaciones como la diabetes o síndrome metabólico, la expresión génica de 11 β -HSD1 se encuentra aumentada (Torrecilla, et al. 2011). En ratas Zucker obesas, se ha observado que la actividad de esta enzima está aumentada en el tejido adiposo mientras que está disminuida en el hígado (Livingstone and Walker, 2003). En línea con los resultados experimentales, se ha observado una disminución de la actividad hepática de la 11 β -HSD1 en pacientes con esteatosis hepática (Ahmed et al., 2012).

Se ha sugerido que la inhibición de la 11 β -HSD1 en pacientes obesos que desarrollan intolerancia a la glucosa podría evitar que desarrollaran diabetes tipo 2. En este sentido, los niveles elevados de 11 β -HSD1 en tejido adiposo de humanos obesos y la sobreexpresión de esta misma enzima en tejido adiposo e hígado de ratón sugieren que la inhibición de la generación de cortisol, especialmente en tejido adiposo, sería una buena diana terapéutica en patologías que cursan con obesidad y en diabetes (Joharapurkar et al, 2012; Sandeep et al., 2005). El hecho que esta enzima productora de cortisol (11 β -HSD1) presente una actividad superior a la isoforma encargada de eliminar el cortisol (11 β -HSD2), permite que los niveles de cortisol intracelular en adipocitos sean relativamente altos respecto a los niveles de cortisona inactiva (Kargi et al., 2014). Así mismo, se ha observado que la 11 β -HSD1 es responsable de la liberación de cortisol del tejido adiposo (Stimson et al., 2008).

Las alteraciones del eje HPA a cualquier nivel o en el metabolismo del cortisol hepático y/o la acumulación de cortisol intrahepático de la circulación pueden ser críticas en la patogénesis de diversas enfermedades hepáticas, incluida la enfermedad inflamatoria del intestino, colitis y síndrome metabólico (Webster et al., 2002; Tarantino and Finelli, 2013; Zoppini et al., 2004). Así mismo, el cortisol media los efectos antiinflamatorios y

la muerte celular programada en enfermedades hepáticas como hepatitis colestásica, shock y sepsis (Gönç et al; 2006; Honda et al., 2008).

Además, se debe tener en cuenta que, en los estados patológicos, el tejido adiposo también puede mostrar una actividad endocrina considerable, que secreta un rango de hormonas, incluido el cortisol, que puede ser absorbido por el hígado desde la circulación (Targher et al., 2005; Kershaw and Flier et al., 2004; Livingstone et al., 2003).

En diferentes patologías que cursan con desórdenes hepáticos y respuesta sistémica se ha observado una asociación entre los niveles de cortisol y el daño hepático (Webster et al., 2002; Tarantino and Finelli, 2013; Zoppini et al., 2004; Gönç et al; 2006; Honda et al., 2008). Hasta la fecha, no se ha descrito ni los niveles ni el papel del cortisol en hígados esteatósicos y no esteatósicos sometidos a PH con I/R- condición quirúrgica comúnmente utilizada en la práctica clínica de las resecciones. Teniendo en cuenta que el tejido adiposo puede ser fuente de diversos mecanismos relacionados con el metabolismo del cortisol, no se puede descartar la implicación del tejido adiposo en el metabolismo del cortisol bajo condiciones de PH+I/R, lo cual ha sido también una de las vías de investigación de la presente tesis.

8. ACETILCOLINA

8.1. Generalidades y síntesis

La acetilcolina (ACh) fue la primera sustancia identificada como neurotransmisor en el nervio vago. Los neurotransmisores son pequeñas sustancias químicas encargadas, como su nombre indica, de transmitir información de una neurona emisora a una neurona receptora. La ACh ejerce sus efectos principalmente en las uniones neuromusculares del músculo esquelético, en las sinapsis de los ganglios del sistema motor visceral y en otros sitios del sistema nervioso central (Purves et al., 2004). Las neuronas sensibles a la acción de ACh se denominan colinérgicas.

La ACh se sintetiza en las terminaciones de neuronas eferentes a partir de colina y acetil-CoA en una reacción catalizada por la enzima colina acetiltransferasa (ChAT). Esta ACh es transportada en vesículas transportadoras hasta la membrana de la neurona emisora y excretada al espacio intersináptico. El acetil-CoA se obtiene a partir del piruvato generado en la glicolisis, mientras que la colina se recicla a partir de la degradación de la ACh por la acetilcolinesterasa (AChE), en acetato y colina, que es devuelta a la neurona emisora mediante unos canales transportadores dependientes de Na⁺ (Fig. 8.1) (Squire et al., 2012).

El mecanismo de acción de los neurotransmisores viene dado por la unión de éstos con sus respectivos receptores. Existen dos tipos de receptores: (i) ionotrópicos, son

los receptores que a la vez son canales iónicos. Normalmente transmiten señales muy rápidamente, los efectos de las cuales duran pocos milisegundos. Y (ii) los metabotrópicos, en los que el receptor y el canal iónico son moléculas diferentes. Éstos producen un efecto postsináptico más duradero (Purves et al., 2004).

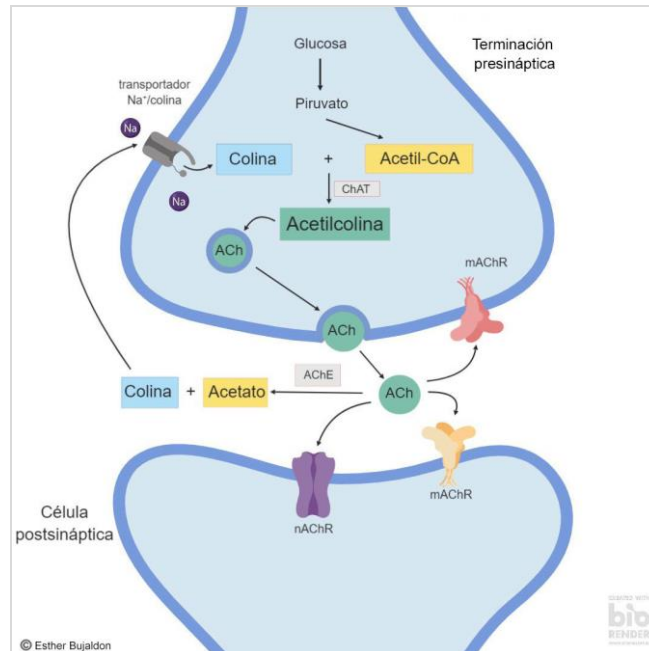


Figura 8.1. Síntesis y metabolismo de la ACh

8.2. Receptores

En el caso de la ACh, existen dos tipos de receptores colinérgicos:

- Receptores nicotínicos (nAChR)

Los receptores nicotínicos reciben su nombre por la reactividad que presentan a la nicotina, un estimulante del sistema nervioso central. Son los receptores ionotrópicos más estudiados. Estructuralmente son canales de cationes no selectivos formados por 5 subunidades dispuestas alrededor de un poro en la membrana (Figura 8.2). En el caso del músculo esquelético, el pentámero se compone de 4 subunidades distintas (α , β , γ , δ), en una relación de $2\alpha:\beta:\gamma:\delta$. (Tiwari et al., 2013). Cada subunidad está formada por 4 dominios transmembrana, uno de los cuales es el que forma la pared del poro. En total pues, el canal se compone de 20 dominios transmembrana, 5 de los cuales dispuestos directamente alrededor del poro. En neuronas, en cambio, el pentámero se compone de los tipos

α y β , en proporción 3:2, respectivamente. Adicionalmente, se han identificado 10 tipos de subunidad α y 5 tipos de subunidad β diferentes. La región N-terminal larga de los dominios forma el sitio de unión del ligando (Purves et al., 2004).

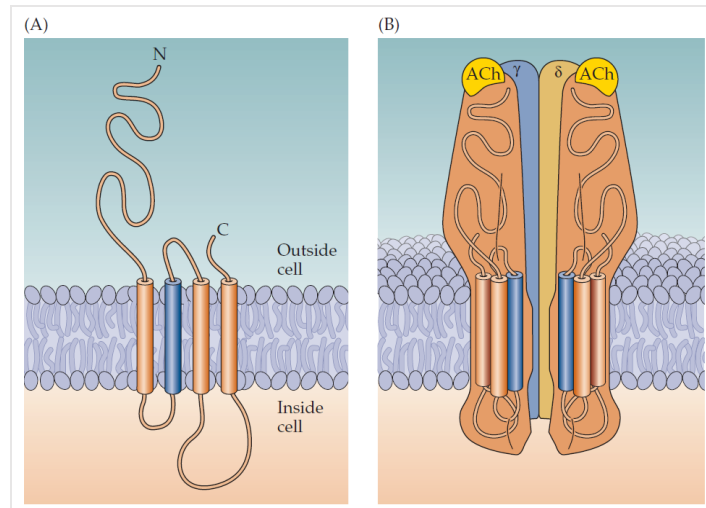


Figura 8.2. Estructura del receptor nicotínico de acetilcolina. (A) Dominios transmembrana, el azul corresponde al dominio que forma parte del canal. (B) Dominios formando el canal y su apertura con la unión del ligando. Fuente: Purves et al., 2004.

La ACh liberada por la neurona motora difunde por la hendidura sináptica hasta la membrana de la neurona postsináptica o miocito, donde dos moléculas de ACh se unen a los dos sitios de unión en las subunidades α . Esta unión provoca un cambio de conformación en el receptor que abre el canal iónico permitiendo el paso de Na^+ y Ca^{2+} . Este paso de iones provoca la despolarización de la membrana de célula receptora y la transmisión de la señal (Nelson and Cox, 2006) (Figura 8.3).

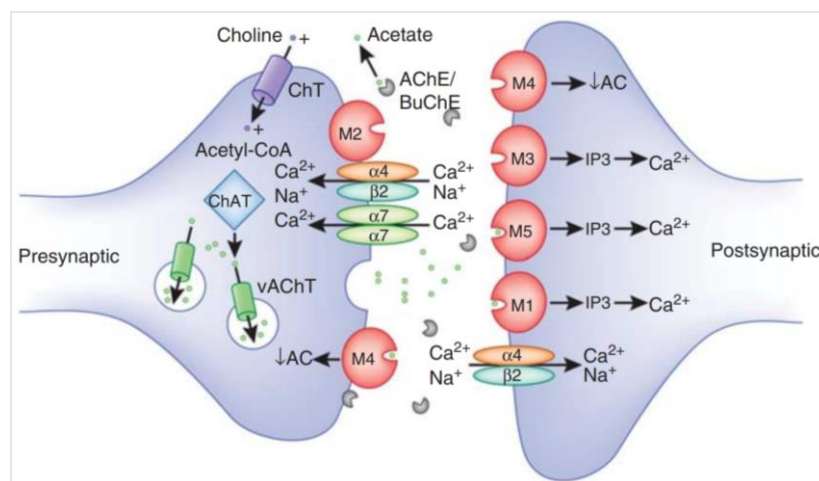


Figura 8.3. Posibles mecanismos de señalización de los receptores nicotínicos y muscarínicos de la acetilcolina. Fuente: Jones et al., 2012.

La estimulación de estos receptores puede incrementar la liberación de glutamato, GABA, dopamina, ACh, norepinefrina y serotonina (Piciotto et al., 2012). En sistemas periféricos, estos receptores pueden mediar respuestas inflamatorias en células epiteliales, modificando la actividad de las vías PI3K/Akt, ERK, MEK y JAK y apoptosis; y en tejido adiposo, donde el tratamiento de adipocitos con nicotina reduce la producción de TNF- α , ácidos grasos libres (FFA) y adiponectina (Albuquerque et al., 2009).

- Receptores muscarínicos (mAChR)

Estos receptores, a diferencia de los nicotínicos, se activan con la muscarina, de la cual reciben su nombre. Este tipo de receptores son metabotrópicos que se encuentran tanto en neuronas presinápticas como postsinápticas del cerebro y en los ganglios del sistema nervioso periférico, actuando de activadores e inhibidores de las señales colinérgicas. Estos receptores median la respuesta de los órganos periféricos (corazón, músculo liso, glándulas exocrinas) (Purves et al., 2004).

Estructuralmente son proteínas monoméricas que contienen 7 dominios transmembrana; el dominio N terminal se extiende al espacio extracelular mientras que el dominio C terminal es intracelular. Cuando la ACh se une al dominio de unión, en el centro de los 7 dominios, provoca la activación de la proteína G acoplada (Figura 8.4). Se conocen cinco subtipos de receptores muscarínicos: M1, M2, M3, M4 y M5. Los tipos M1, M3 y M5, después de activarse la proteína G, activa la fosfolipasa C (PLC). La PLC a su vez promueve la formación de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol. El IP3 se une a un receptor específico en el RE, liberando Ca^{2+} , mientras que el diacilglicerol, junto al calcio liberado, activan la PKC en la superficie de la membrana plasmática, que fosforilará proteínas diana específicas, MAPKs, etc. (Nelson and Cox, 2006). En cambio, los tipos M2 y M4, después de activar la proteína G, inhiben la acción de adenilato ciclasa, que participa en una gran variedad de vías de señalización (Figura 8.3). (Piciotto et al., 2012).

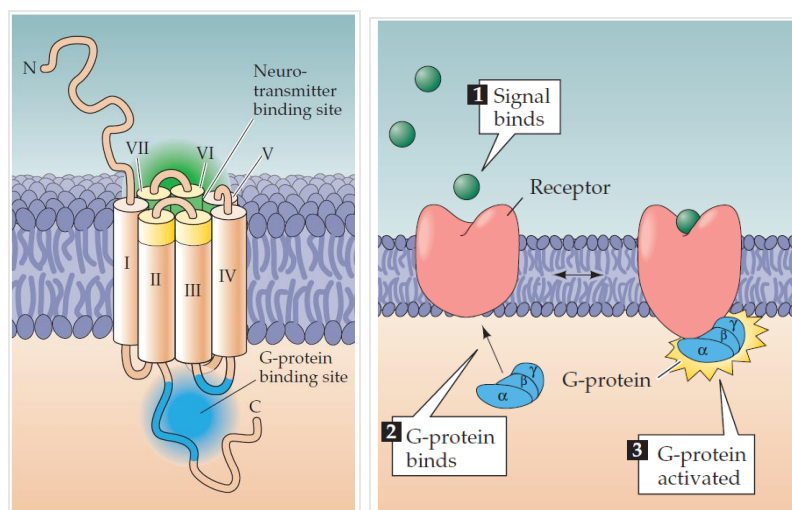


Figura 8.4. Izquierda: Estructura del receptor muscarínico de acetilcolina, con los siete dominios transmembrana y el sitio de unión de la proteína G. Derecha: Mecanismo de acción del receptor. *Fuente: Purves et al., 2004.*

Los tipos M2/M4 presinápticos actúan como autorreceptores inhibidores en terminaciones colinérgicas y reducen la liberación de glutamato en sinapsis cortico-corticales. En cambio, los tipos M1/M3/M5 estimulan la producción de dopamina, y los postsinápticos pueden incrementar la excitabilidad de las neuronas piramidales corticales (Piciotto et al., 2012).

El hígado contiene ramificaciones nerviosas parasimpáticas. Las células hepáticas expresan tanto los receptores nicotínicos como los muscarínicos y desencadenan una gran variedad de funciones.

8.3. ACh y sus receptores en diversas patologías

La ACh estaría involucrada en la llamada vía antiinflamatoria colinérgica, regulada por el nervio vago. La ACh se une a los nAChR tipo $\alpha 7$ para inhibir la liberación de TNF- α (Bonaz et al., 2016), además de IL-1, IL-6, IL-8 y HMGB1 (Tracey, 2007). Esta vía antiinflamatoria colinérgica también actuaría en casos de shock hemorrágico e infección por endotoxina. La ACh reduce significativamente la liberación de citoquinas inflamatorias en cultivos de macrófagos a los que se les indujo sepsis por LPS (Borovikova et al, 2000). Adicionalmente, en un modelo de shock por oclusión de la arteria esplácnica en rata, la estimulación de las ramificaciones eferentes del nervio vago revierte la hipotensión, contrarresta la activación de NF-kB y mejora la supervivencia (Altavilla et al., 2006).

En I/R, la estimulación de nAChR tipo $\alpha 7$ por la nicotina tiene efectos citoprotectores en hepatocitos vía la inducción de la hemo oxigenasa 1 (HO-1), además de reducir la producción de citoquinas inflamatorias en la reperfusión (Park et al., 2013, Li et al., 2013). Los receptores nAChR en la membrana de las mitocondrias regulan la liberación de factores proapoptóticos como el Cyt c. Después de PH, diversos subtipos de nAChR están sobreexpresados y la susceptibilidad de las células hepáticas a los efectos apoptóticos de Ca^{2+} y RLO aumenta (Uspenska et al., 2018). Por el contrario, también hay estudios contrarios a la teoría de la vía antiinflamatoria colinérgica. Estos estudios indican efectos citotóxicos y fibrogénicos de la nicotina vía nAChR tipo $\alpha 7$ (Hajiasgharzadeh and Baradaran, 2017). El papel de los receptores muscarínicos de la ACh en desórdenes hepáticos y particularmente en procesos que cursan con PH con I/R es desconocido.

8.4. ACh y cortisol

Un estudio reciente describe los corticosteroides como inhibidores directos de los nAChR musculares. El tratamiento con cortisol inhibiría estos receptores y contribuiría a la patofisiología de la debilidad muscular prolongada, aunque el mecanismo no está aún establecido (Dworakowska et al., 2018). Adicionalmente, el cortisol puede alterar la cinética de los receptores nicotínicos, no necesariamente uniéndose al receptor, pero alterando la conformación para reducir el tiempo de apertura del canal iónico e influyendo así negativamente en la respuesta desencadenada por la ACh (Bouzat and Barrantes, 1993; Garbus et al., 2001; Nurowska and Ruzzier, 2002). El papel de la ACh y su posible regulación por el cortisol en condiciones de PH con oclusión vascular forman parte de las investigaciones realizadas en la presente Tesis doctoral.

9. FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR TIPO A (VEGFA)

9.1. Generalidades

El factor de crecimiento endotelial vascular tipo A (VEGFA) es una glicoproteína homodimérica codificada por el gen VEGFA (localización cromosómica: 6p21.1). La región codificante comprende unas 14 kb y contiene 8 exones. El *splicing* alternativo del pre-mRNA produce cuatro isoformas diferentes en humanos: VEGFA₁₂₁, VEGFA₁₆₅, VEGFA₁₈₉, VEGFA₂₀₆. De estas, las formas VEGFA₁₂₁ y VEGFA₁₆₅ son las más abundantes. Estas isoformas difieren en el número de aminoácidos y en sus propiedades biológicas: VEGFA₁₆₅ es la forma predominante y contiene dominio de unión a heparán sulfato extracelular, mientras que la forma VEGFA₁₂₁ no contiene este dominio por lo que difunde libremente por la membrana. Las otras formas restantes están completamente secuestradas en la matriz extracelular. La pérdida del dominio de unión con heparina resulta en la pérdida significativa de la capacidad mitogénica de VEGFA, por lo que la forma VEGFA₁₆₅ sería la que presenta actividad biológica óptima (Ferrara et al., 2003; Cross et al., 2003).

El VEGFA, es producido en la mayoría de células parenquimales y actúa de forma paracrina en las células endoteliales adyacentes uniéndose a los receptores correspondientes. La acción autocrina puede ser crucial para la supervivencia de las ECs (Koch and Claesson-Welsh, 2012). En ratas sanas, se ha detectado la expresión de VEGFA en macrófagos activados y hepatocitos. Factores como la lesión por I/R, shock

térmico, prostaglandinas y citoquinas como TGF- β , IL-1 β y IL-6 regulan la expresión y producción de VEGFA (Boros et al., 2001).

El VEGFA induce una potente respuesta angiogénica, tiene efectos antiapoptóticos y antiinflamatorios en diferentes desórdenes hepáticos (Ferrara et al., 2003; Wu et al; 2010).

9.2. Receptores

Se han identificado tres tipos de receptores para los miembros de la familia VEGF: VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3. Son receptores tipo tirosina-quinasa localizados en la superficie de las células endoteliales y células derivadas de la médula ósea (Ferrara et al., 2003). Además, algunos los miembros de de la familia VEGF también se unen al correceptor Neuropilin-1 (NRP-1), que estabiliza la unión VEGF-VEGFR, especialmente en el receptor 2 (Figura 9.1) (Vempati et al., 2014).

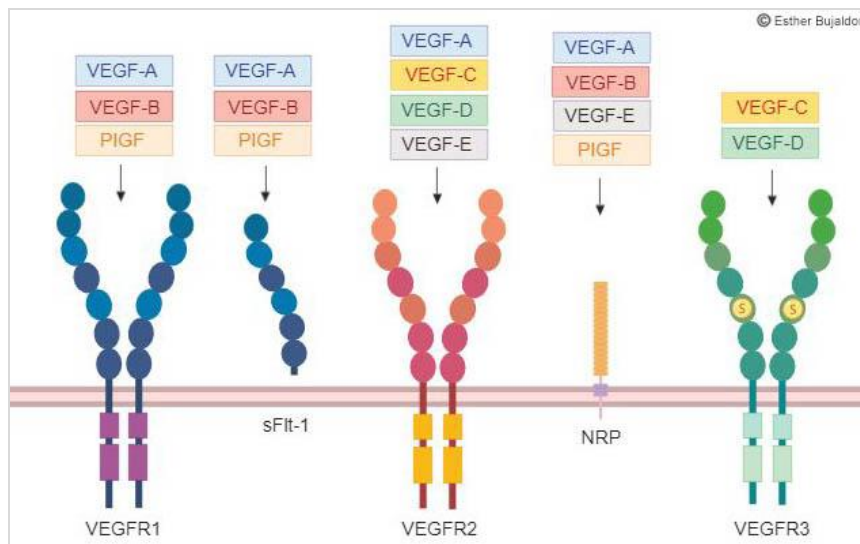


Figura 9.1. Esquema resumen de los receptores de VEGF y sus ligandos.

Estructuralmente, los receptores son muy similares. Contienen 7 dominios inmunoglobulina extracelulares (con el correspondiente sitio de unión al ligando en los dominios 2 y 3), una región transmembrana, el dominio tirosina-quinasa separado en dos partes y la región C terminal (Claesson-Welsh, 2016). La unión del ligando se lleva a cabo en la región N-terminal del dominio extracelular del receptor. La dimerización de los receptores para formar homo- o heterodímeros es necesaria pero no suficiente para su activación. Los dímeros se estabilizan con otras moléculas que actúan como correceptores. La dimerización se acompaña de cambios en el dominio intracelular, que dejan al descubierto el sitio de unión de ATP. La unión de ATP provoca la auto- o trans-

fosforilación de los residuos de tirosina que desencadena la vía de señalización correspondiente (Koch et al., 2011).

9.2.1. Receptor VEGFR1

El receptor de VEGF tipo 1 (VEGFR1 o Flt1) fue el primer VEGFR identificado. Este receptor de 180 kDa se encuentra principalmente en células endoteliales, células pluripotentes hematopoyéticas, monocitos y macrófagos. La expresión de este receptor está regulada por hipoxia (Cross et al., 2003).

Como ligandos, el VEGFR1 se une a VEGFA, VEGFB y PlGF con alta afinidad. La función de este receptor aún genera debate. No está claro qué efectos regula su activación ya que la señalización por VEGFR1 puede variar en función de la etapa de desarrollo del organismo o de la célula. VEGFR1 tiene una baja actividad quinasa, por lo que se cree que su capacidad señalizadora en las ECs es pobre comparado con VEGFR2. Sin embargo, se ha demostrado que VEGFR1, mediante la unión con VEGFB y/o PlGF es vital durante el desarrollo temprano, por lo que su capacidad de producir respuestas biológicas no se descarta (Claesson-Welsh, 2016). De hecho, estudios con ratones que no expresan VEGFR1 han demostrado que la actividad quinasa de este receptor promueve la metástasis y se relacionaría con procesos inflamatorios (Shibuya, 2014).

A parte del receptor anclado en la membrana, existe una variante soluble de 110 kDa, sVEGFR1 o sFlt1, originada principalmente por *splicing* alternativo, pero también por proteólisis del receptor de membrana y que comprende sólo el dominio extracelular, por tanto, sin actividad quinasa. Se ha propuesto que el sFlt1 es capaz de unirse al VEGFA, secuestrándolo y determinando así sus niveles circulantes, previniendo las señales de transducción del VEGFA (Kendall et al., 1996; Denizot et al., 2007; Aryal et al., 2016). La sobreexpresión de sFlt1 inducida por hipoxia y su capacidad de secuestrar PlGF se ha relacionado con la preeclampsia (Wu et al., 2010).

9.2.2. Receptor VEGFR2

El siguiente receptor es el VEGFR2, también llamado Flk1 o KDR, una molécula de unos 200-230 kDa de peso. Al igual que VEGFR1, se expresa principalmente en células endoteliales de la mayoría de tejidos de embriones murinos y humanos.

VEGFR2 también se expresa en células no endoteliales como células del ducto pancreático, células progenitoras retinales, megacariocitos y células hematopoyéticas (Matsumoto and Claesson-Welsh, 2001).

Los ligandos de VEGFR2 son VEGFA, VEGFC, VEGFD. El VEGFA se une con más afinidad a VEGFR1 que VEGFR2, pero la actividad tirosina-quinasa de VEGFR2 es 10 veces más alta que en VEGFR1 (Shibuya, 2014). Está ampliamente aceptado que VEGFR2 es el mediador principal del efecto mitogénico, angiogénico e inductor de permeabilidad vascular de VEGFA.

La activación de VEGFR2 es un proceso complejo que involucra a muchas vías de señalización relacionadas entre ellas (Figura 9.2). La unión con el ligando y dimerización del receptor conlleva un cambio conformacional en la región extracelular, reorientando los dominios y provocando la rotación de las hélices transmembrana. Entonces la región intracelular también sufre sus correspondientes alteraciones conformacionales en los extremos N y C, liberando el dominio de unión de ATP que permite la autofosforilación del receptor. Estas fosforilaciones crean sitios de unión para el reclutamiento de proteínas adaptadoras citoplasmáticas que inician las vías de señalización. Estas vías incluyen la vía proliferativa de PLC- γ , que regularía las vías de señalización de PKC, MEK, ERK1/2 encargadas de la proliferación de células endoteliales, activación de la migración celular vía FAK; activación de vías antiapoptóticas y de supervivencia mediante la vía PI3K/Akt (Gerber et al., 1998; Peach et al., 2018).

El VEGFA se ha descrito como una citoquina proinflamatoria, ya que puede inducir una respuesta inflamatoria vía VEGFR2. Esta respuesta consistiría en la elevación de Ca^{2+} intracelular, la siguiente activación de PLA2 y la síntesis de PAF, responsable del aumento de la permeabilidad vascular y reclutamiento de células y moléculas inflamatorias (Archambault et al., 2001, Garrido-Urbani et al., 2008). El VEGFR2 también promueve la permeabilidad vascular por el reclutamiento de FAK, reorganización de la actina del citoesqueleto regulada por p38-MAPK y activación de eNOS. (Ferrara et al., 2003; Sakurai et al., 2005; Claesson-Welsh., 2016; Peach et al., 2018).

La activación de VEGFR2 conlleva la disociación de las proteínas de membrana y su translocación a endosomas, donde puede ser degradado o reciclado de vuelta a la membrana. La degradación del receptor se debe a una serie de modificaciones

post-transcripcionales como ubiquitinaciones o fosforilación de determinados residuos en la región C-terminal. El receptor puede seguir dando señal incluso estando internalizado en la vesícula hasta que llega a su destino final. Además, el VEGFR2, a diferencia de los otros receptores tirosina-quinasa, se almacena en vesículas en células endoteliales inactivas, desde las cuales puede ser reclutado a la membrana plasmática en respuesta a VEGFA (Gampel et al., 2006; Koch et al., 2011).

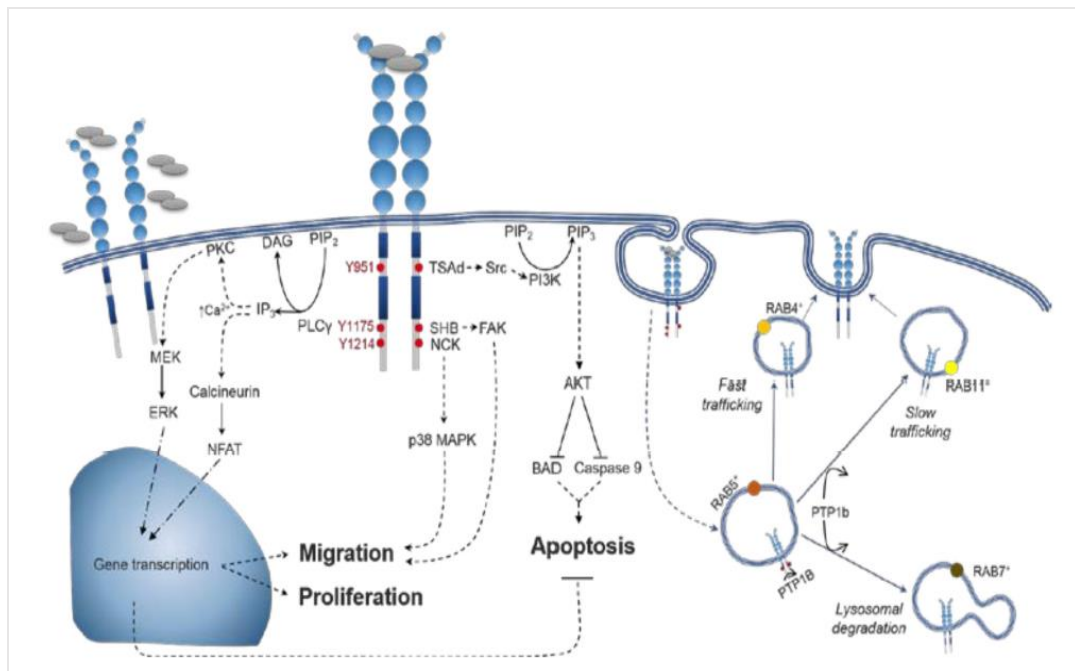


Figura 9.2. Principales vías de señalización de VEGFR2 activadas por VEGFA. Fuente: Peach et al., 2018.

9.2.3. Receptor VEGFR3

El último tipo de receptor es VEGFR3 o Flt4. Los ligandos de VEGFR3 son VEGFC y VEGFD. A diferencia de los otros receptores, en este caso la parte amino-terminal del dominio extracelular está unida a la región C-terminal por un puente disulfuro (Matsumoto and Claesson-Walsh, 2001). El VEGFR3 se expresa principalmente en células endoteliales linfáticas, donde ejerce su papel principal, pero su expresión puede ser inducida en otras células endoteliales con alta tasa angiogénica como en tumores, las ECs de los extremos de los vasos en retinas o en arterias en desarrollo. Adicionalmente, osteoblastos, progenitores neuronales y macrófagos también expresan VEGFR3 (Koch et al., 2011).

9.3. VEGFA en el contexto de I/R hepática y regeneración

La expresión de VEGFA se ve aumentada en hígados de rata sometidos a isquemia parcial del 70% (Tamagawa et al., 2008) o isquemia total (Knudsen et al., 2011).

La administración de VEGFA recombinante tiene un efecto positivo en la lesión por I/R en un modelo de isquemia parcial del 70% en hígados de ratón, disminuyendo la inflamación y la necrosis. Este efecto beneficioso podría deberse a la inducción de iNOS y/o eNOS, ya que las dos están aumentadas tras el tratamiento con VEGFA (Tsurui et al., 2005).

Otro estudio comprueba la implicación de VEGFA en la patofisiología de la I/R. Sin embargo, en este caso, el tratamiento con un antagonista de VEGFA protege frente a la lesión y respuesta inflamatoria inducida por I/R (Tsuchihashi et al., 2006). Esta inconsistencia en los efectos del VEGFA sugiere la necesidad de llevar a cabo nuevas investigaciones con la finalidad de valorar su relevancia en la lesión inducida por I/R.

La expresión de VEGFA se detecta principalmente en los hepatocitos periportales en hígados de rata sometidos a PH del 70% sin isquemia. En este contexto, la inactivación de VEGFA inhibe la proliferación de LSECs y hepatocitos, mientras que la administración la promueve, lo que demostraría que el VEGFA afecta positivamente la regeneración hepática (Taniguchi et al., 2001; Shimizu et al., 2001; Bockhorn et al., 2007). En la misma línea, un estudio donde se realizó una PH del 90% en ratas con hígados esteatósicos inducidos por dieta, la administración de VEGFA aumentó la supervivencia de los animales (Gu et al., 2013).

Diferentes estudios indican que la PH estimularía la producción de VEGFA y la activación de VEGFR2 en la superficie de las LSECs no proliferativas. Esta activación de VEGFR2 conlleva una sobreexpresión del factor Id1 en estas células que, a su vez, estimula la producción de Wnt2 y HGF como factores angiocrinos principales. De este modo se desencadena la proliferación de hepatocitos, vía activación del factor NF-kB (Ding et al., 2010; Rafii et al., 2016).

Hasta la fecha, no se ha descrito el papel del VEGFA en hígados esteatósicos y no esteatósicos sometidos a PH con I/R ni en la lesión inducida por I/R ni en el fallo en la regeneración hepática.

OBJETIVOS

La esteatosis hepática es un factor de riesgo en PH con I/R, situación quirúrgica que se utiliza normalmente en la práctica clínica para reducir el sangrado asociado a las resecciones hepáticas. Teniendo en cuenta tal problemática clínica, los objetivos planteados en la presente tesis son los siguientes:

Estudio 1:

- Investigar el metabolismo y la señalización de cortisol en hígados con severa esteatosis (60-70%) y no esteatósicos sometidos a PH con I/R y la relevancia del tejido adiposo sistémico como fuente importante de cortisol.
- Evaluar el efecto de la administración de cortisol sobre la lesión y fallo en regeneración de hígados con severa esteatosis y no esteatósicos sometidos a PH con I/R.
- Analizar la posible relación entre el cortisol y la ACh en hígados con severa esteatosis y no esteatósicos sometidos a PH con I/R.
- Investigar si los efectos del cortisol y la ACh están presentes también en hígados con esteatosis moderada (20-30%, esteatosis).

Estudio 2:

- Evaluar en un modelo de esteatosis inducida genéticamente, los niveles de VEGFA en hígados con severa esteatosis (60-70%) y no esteatósicos sometidos a PH con I/R y el posible efecto de la modulación de la acción del VEGFA frente al daño y fallo en la regeneración como consecuencia de la cirugía hepática.
- Investigar la implicación del tejido adiposo en los niveles circulantes del sFlt1 cuando los hígados esteatósicos y no esteatósicos son sometidos a PH con I/R.
- Investigar el posible papel de la vía VEGFR2-Id1-Wnt2 en los mecanismos de acción del VEGFA en hígados con severa esteatosis y no esteatósicos sometidos PH con I/R.
- Analizar si los niveles y el papel del VEGFA en el daño y fallo regenerativo que sigue a la cirugía de PH bajo oclusión vascular es el mismo en modelos de esteatosis inducida genéticamente o por dieta.

MATERIALES y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Para los estudios experimentales realizados en esta tesis se utilizaron diferentes modelos experimentales de esteatosis.

- Para el modelo experimental de esteatosis genética, se utilizaron ratas macho de la cepa Zucker (Charles River, Paris, Francia). Las ratas Zucker presentan dos fenotipos diferentes: las ratas Zucker heterocigotas (fa/-) de fenotipo delgado (Lean, Ln), que tienen receptores cerebrales de leptina y mantienen un fenotipo delgado siempre; y las ratas Zucker homocigotas (fa/fa) de fenotipo obeso (Obese, Ob), que carecen de estos receptores cerebrales de leptina y desarrollan obesidad a partir de las 8 semanas de edad debido al incremento en la ingesta de comida y a la disminución del gasto calórico (Bray, 1977). Se utilizaron:
 - Animales homocigotos (Ob) con infiltración de grasa hepática macro- y microvesicular severa (400–450 g, 60–70% steatosis).
 - Animales homocigotos (Ob) con infiltración de grasa hepática leve a moderada (250–300 g, 20–30% steatosis).
 - Animales heterocigotos (Ln) sin infiltración de grasa (350–400 g).
- Para el modelo experimental de esteatosis inducida por dieta deficiente en colina (CDD), se utilizaron ratas macho Sprague Dawley (SD) de peso entre 200–220 g (Charles River, Paris, Francia).

Los animales fueron mantenidos en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, como mínimo durante dos semanas 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. Las ratas Zucker fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta con una composición del 12% de grasa, un 28% de proteína y un 60% de hidratos de carbono (5001 rodent diet; PMI Inc., Brentwood, MO, USA). Las ratas SD fueron alimentadas con dieta deficiente en colina o estándar semipurificada con niveles adecuados de colina durante 10 días (Vendemiale et al., 2001; Mendes-Braz et al., 2014). Ambas dietas fueron compradas de Dyets (Bethlehem, PA). La dieta estándar fue enriquecida con 14.48 g/Kg en lugar de Azúcar. 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 en el cual la esteatosis hepática que presentan no está asociada con inflamación (Selzner et al., 2000; Koteish, 2001). Por otra parte, las ratas SD alimentadas con una dieta deficiente en colina durante 7-10 días constituyen un modelo bien definido de esteatosis inducida nutricionalmente en el cual la presencia de infiltración de grasa hepática tampoco está asociada con inflamación (Ghoshal and Farber, 1993; Taneja et al., 1998; Caraceni et al., 1999; Grattagliano et al., 2000; Vendemiale et al., 2001; Caraceni et al., 2005; Jiménez-Castro et al., 2012; Mendes-Braz et al., 2014).

2. Modelo experimental

2.1. Anestesia

Los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia inhalatoria de isoflurano (Fluorane Abbot Laboratories, Madrid) mediante un vaporizador para uso veterinario (McKinley Anesthetic Machines, Everest Veterinary Technology, Barcelona). La inducción anestésica se realizó al 4% y con un flujo de oxígeno de 2,5 a 3 l/min, mientras que el mantenimiento del estado anestésico consistió en la inhalación de isoflurano al 1,5 - 2 y flujo de oxígeno de 1,5 - 2 l/min.

2.2. Procedimiento quirúrgico

Se realizó el procedimiento quirúrgico de hepatectomía parcial (PH) del 70% bajo oclusión vascular de 60 minutos tal y como describe el modelo de Selzner M. et al. (1999). Una vez comprobado que la rata está completamente anestesiada (falta de respuesta a estímulos externos como pellizco en la cola o pata trasera), se rasuró el abdomen, se colocó en posición decúbito supino y se inmovilizó sobre la mesa de operaciones. El campo quirúrgico se lavó con povidona iodada. Seguidamente se realizó una incisión en la línea media umbilical de aproximadamente 5 centímetros partiendo del apéndice xifoides. A continuación, se seccionaron los ligamentos hepáticos y se apartaron los intestinos para mejorar la visibilidad del hígado, manteniéndolos hidratados constantemente con suero Ringer Lactado (Grífol S.A., Barcelona).

En primer lugar, se pinzó el lóbulo derecho triangular con unas pinzas Statinsky, manteniéndolo isquémico. A continuación, se pinzó mediante un *clamp* tipo “bulldog” la ramificación de la vena porta que irriga los lóbulos mediano e izquierdo durante 60 minutos. Se ligó y reseccionó además el lóbulo izquierdo y derecho triangular.

Transcurridos los 60 minutos de isquemia, se reseccionaron el lóbulo inferior derecho y los caudados. Para finalizar el procedimiento, se cerró el animal mediante sutura continua de la capa muscular y cutánea.

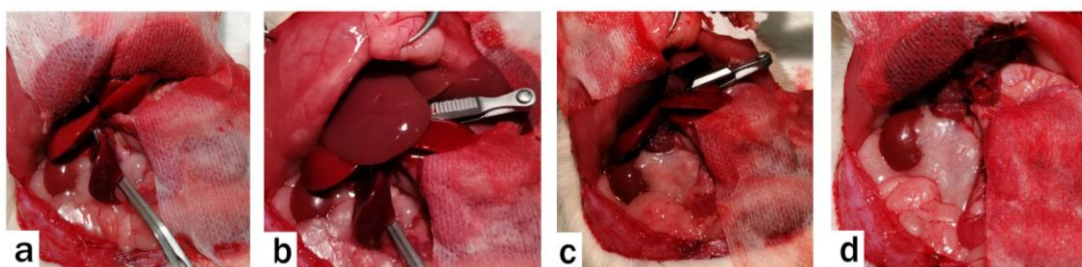


Figura 10.1. Fases del proceso quirúrgico llevado a cabo. a) Isquemia del lóbulo triangular (60 min). b) Isquemia del lóbulo mediano y lateral izquierdo (60 min). c) Resección del lóbulo lateral izquierdo y triangular d) Resección del lóbulo inferior derecho y caudados (Hepatectomía del 70 %).

3. Diseño Experimental

3.1. ESTUDIO 1: Impacto del cortisol en cirugía hepática de hígados estatósicos y no esteatósicos.

3.1.1. Protocolo 1: Metabolismo y señalización de cortisol y efectos del cortisol en hígados no esteatósicos y esteatósicos (60-70% de esteatosis)

En este protocolo examinamos los niveles de cortisol y los cambios en las enzimas implicadas en su metabolismo. Así mismo, determinamos la relevancia del tejido adiposo sistémico como fuente importante de cortisol en el contexto de PH bajo I/R.

Los grupos experimentales que se realizaron con de animales Zucker Ln y Ob son los siguientes.

- 1) Sham (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): los animales se sometieron a anestesia, incisión en la línea media umbilical y disección de los vasos del hilio hepático.
- 2) PH (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): Los animales se sometieron a hepatectomía parcial del 70% (Elias-Miró et al., 2014).
- 3) PH + I/R (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): Los animales se sometieron a hepatectomía parcial del 70% bajo oclusión vascular (isquemia) de 60 minutos, siguiendo la técnica de Selzner M. et al. (1999).
- 4) PH + I/R + LPT (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): igual que el grupo 3, pero el tejido adiposo mesentérico, perirenal, retroperitoneal y epididimal fue reseccionado y extraído antes de iniciar la PH+I/R (Mendes-Braz et al., 2014).
- 5) PH + I/R + cortisol (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): igual que el grupo 3, pero los animales fueron tratados con cortisol a una dosis de 5 mg/kg, mediante inyección intraperitoneal (i.p.), 10 minutos antes de la intervención quirúrgica. (Nadal, 1995).
- 6) PH + I/R + ACh (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): igual que el grupo 3, pero los animales fueron tratados con ACh a una dosis de 500 µg/kg, mediante inyección intravenosa (i.v.), 10 minutos antes de la intervención quirúrgica (Jiménez-Castro et al., 2015).
- 7) PH + I/R + $\alpha 7$ nAChR Antag (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): igual que el grupo 3, pero los animales fueron tratados con un antagonista del receptor nicotínico $\alpha 7$ de la acetilcolina a una dosis de 5 mg/kg, i.p., 30 minutos antes de la intervención quirúrgica (Jiménez-Castro et al., 2015).
- 8) PH + I/R + M3 mAChR Antag (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): igual que el grupo 3, pero los animales fueron tratados con un antagonista del receptor muscarínico M3 de la acetilcolina a una dosis de 1 mg/kg, i.p., 30 minutos antes de la intervención quirúrgica (Andersson et al., 2011).

9) PH + I/R + cortisol + M3 mAChR Antag (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): igual que el grupo 3, pero los animales fueron tratados con cortisol a una dosis de 5 mg/kg, i.p., 10 minutos antes de la intervención quirúrgica y con un antagonista del receptor muscarínico M3 de la acetilcolina a una dosis de 1 mg/kg, i.p., 30 minutos antes de la intervención quirúrgica (Nadal, 1995; Andersson et al., 2011).

3.1.2. Protocolo 2: Efectos del cortisol y la ACh en hígados esteatósicos (20-30% esteatosis)

En este protocolo se evaluó el papel del cortisol hepático en ratas con una infiltración lipídica moderada (esteatosis del 20 - 30%) sometidas a PH bajo I/R. Con tal finalidad se realizaron en animels Ob los mismos procedimientos quirúrgicos que los especificados en los grupos 1, 3, 5 y 6, descritos anteriormente.

Para evaluar la supervivencia tras la cirugía, se monitorizaron los animales Ln y Ob de los grupos 3 al 9 durante 14 días. Las dosis y tiempos de los diferentes tratamientos se basan en estudios anteriores y en resultados preliminares realizados por el grupo de investigación (Nadal, 1995; Jiménez-Castro et al., 2015; Mendes-Braz et al., 2014; Andersson et al., 2011).

A continuación, se presentan esquemas resumiendo los grupos experimentales en cada uno de los protocolos y las determinaciones realizadas (Figura 10.2).

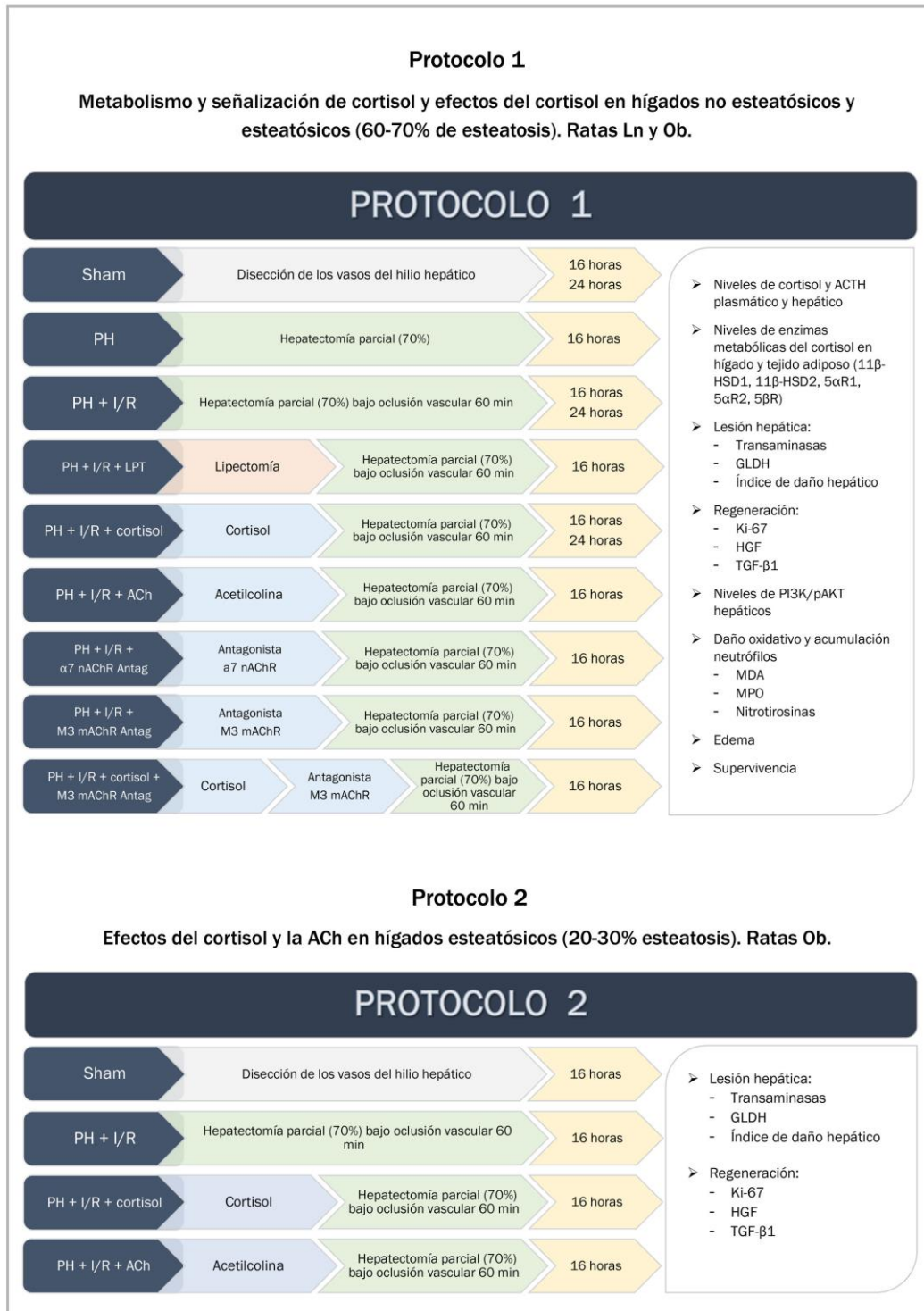


Figura 10.2. Esquema descriptivo de los protocolos y determinaciones comprendidos en el Estudio 1

3.2. ESTUDIO 2: Relevancia del VEGFA en hígados sometidos a hepatectomía parcial bajo oclusión vascular.

3.2.1. Protocolo 1: Estudio de los niveles de VEGFA en ratas Zucker Ln y Ob sometidos a PH con I/R y del papel del VEGFA frente al daño y fallo regenerativo que sigue a la cirugía.

Los grupos de animales que se realizaron son los siguientes:

- 1) Sham (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): los animales se sometieron a anestesia, incisión en la línea media umbilical y disección de los vasos del hilio hepático.
- 2) PH + I/R (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): Los animales se sometieron a hepatectomía parcial del 70% bajo oclusión vascular (isquemia) de 60 minutos (Mendes-Braz et al., 2014; McCormack et al., 2007).
- 3) PH + I/R + VEGFA (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): igual que el grupo 2, pero los animales fueron tratados con VEGFA a una dosis de 5 µg/kg, i.v. (Bockhorn et al., 2007).
- 4) PH + I/R + VEGFA + anti-sFlt1 (6 ratas Ob): igual que el grupo 3, pero los animales fueron tratados además con un anticuerpo contra el receptor soluble del receptor 1 del VEGFA (sFlt1), a una dosis de 0.6 mg/kg, i.v. (Kommareddy and Amiji, 2007).

3.2.2. Procolo 2: Implicación del tejido adiposo en los niveles circulantes del sFlt1 en ratas Zucker Ln y Ob sometidas a PH bajo I/R.

Además de los grupos 1-3, se realizaron los grupos experimentales siguientes:

- 5) Sham + LPT (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): Igual que el grupo 1, pero el tejido adiposo mesentérico, perirrenal, retroperitoneal y epidídimo fue reseccionado y extraído (McCormack et al., 2007).

- 6) PH+I/R + LPT (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): igual que el grupo 2, pero el tejido adiposo mesentérico, perirenal, retroperitoneal y epididimal fue reseccionado y extraído antes de iniciar la PH+I/R (McCormack et al., 2007).
- 7) PH + I/R + LPT + VEGFA (6 ratas Ln y 6 ratas Ob): Igual que el grupo 3 pero tejido adiposo mesentérico, perirenal, retroperitoneal y epididimal fue reseccionado y extraído antes de iniciar la PH+I/R (McCormack et al., 2007).

3.2.3. Protocolo 3: Posible papel de la vía VEGFR2–Id1- Wnt2 en los mecanismos de acción subyacentes del VEGFA en ratas Zucker Ln y Ob en el contexto de PH+I/R.

Además de los grupos 1-4 anteriormente descritos, se realizaron los siguientes adicionales:

- 8) PH + I/R + VEGFA + anti-VEGFR2 (6 ratas Ln): igual que el grupo 3, pero los animales fueron tratados además con ZD6474, un potente inhibidor del receptor 2 de VEGFA, a una dosis de 2.5 mg/kg, i.v. (Wedge et al., 2002).
- 9) PH + I/R + Wnt2 (6 ratas Ln): igual que el grupo 2, pero los animales fueron tratados además con Wnt2, a una dosis de 5 ng/kg, i.v. (Launay et al. 2011).
- 10) PH + I/R + VEGFA + anti-sFlt1 + anti-VEGFR2 (6 ratas Ob): igual que el grupo 4, pero los animales fueron tratados además con ZD6474, un potente inhibidor de VEGFR2, a una dosis de 2.5 mg/kg, i.v. (Wedge et al., 2002).
- 11) PH + I/R + VEGFA + anti-sFlt1 + PI3K/Akt-inh (6 ratas Ob): igual que el grupo 4, pero los animales fueron tratados además con LY294002, un potente inhibidor de Akt, a una dosis de 0.5 mg/kg, i.p., y Wortmannin, un potente inhibidor de PI3K, a una dosis de 1 mg/kg, i.p. (Cornide-Petronio et al., 2016).

3.2.4. Protocolo 4: Estudio de los niveles de VEGFA en ratas Sprague-Dawley en un modelo experimental de obesidad nutricional sometidos a PH con I/R y del papel del VEGFA frente al daño y fallo regenerativo asociado a la cirugía hepática.

12) Sham (6 ratas SD y 6 ratas CDD-SD): los animales se sometieron a anestesia, incisión en la línea media umbilical y disección de los vasos del hilio hepático.

13) PH + I/R (6 ratas SD y 6 ratas CDD-SD): Los animales se sometieron a hepatectomía parcial del 70% bajo oclusión vascular (isquemia) de 60 minutos, siguiendo el mismo porcedimiento quirúrgico que el grupo 2 del protocolo 1.

14) PH + I/R + VEGFA (6 ratas SD y 6 ratas CDD-SD): Como el grupo 13 pero tratadas con VEGFA (5 µg/kg i.v.) (Bockhorn et al., 2007).

15) PH + I/R + VEGFA + anti-sFlt1 6 ratas CDD-SD): Como el grupo 14 pero tratadas con un anticuerpo contra el receptor soluble de VEGF tipo 1 (sVEGFR1 o sFlt1) (0.6 mg/kg i.v.) (Kommareddy and Amiji, 2007).

Para evaluar la supervivencia tras la cirugía, se monitorizaron los animales Ln y Ob de los grupos 3 al 9 durante 14 días. Las dosis y tiempos de los diferentes tratamientos se basan en estudios anteriores y en resultados preliminares realizados por el grupo de investigación (Nadal, 1995; Jiménez-Castro et al., 2015; Mendes-Braz et al., 2014; Andersson et al., 2011).

A continuación, se presentan esquemas resumiendo los grupos experimentales en cada uno de los protocolos y las determinaciones realizadas (Figura 10.3).

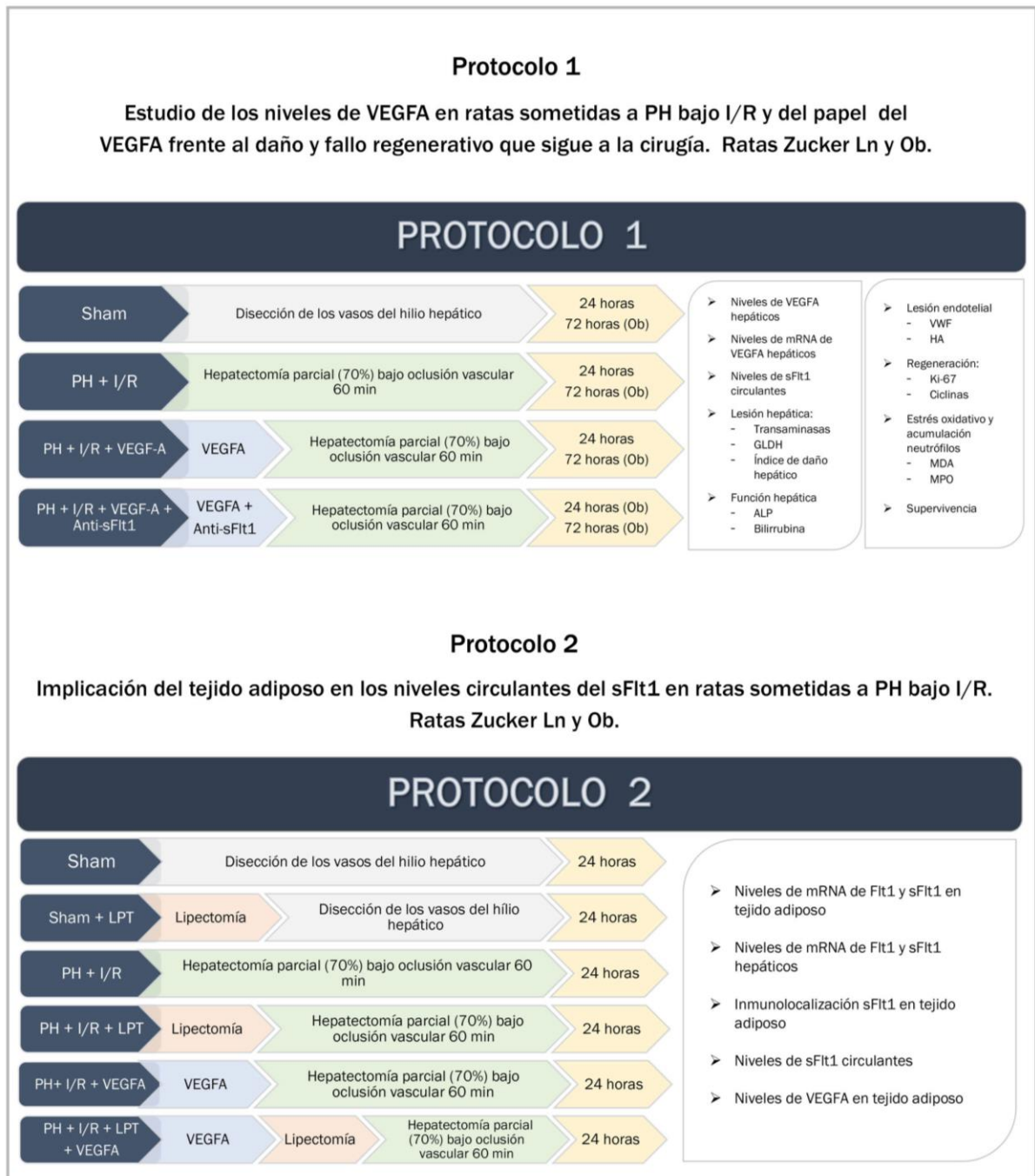
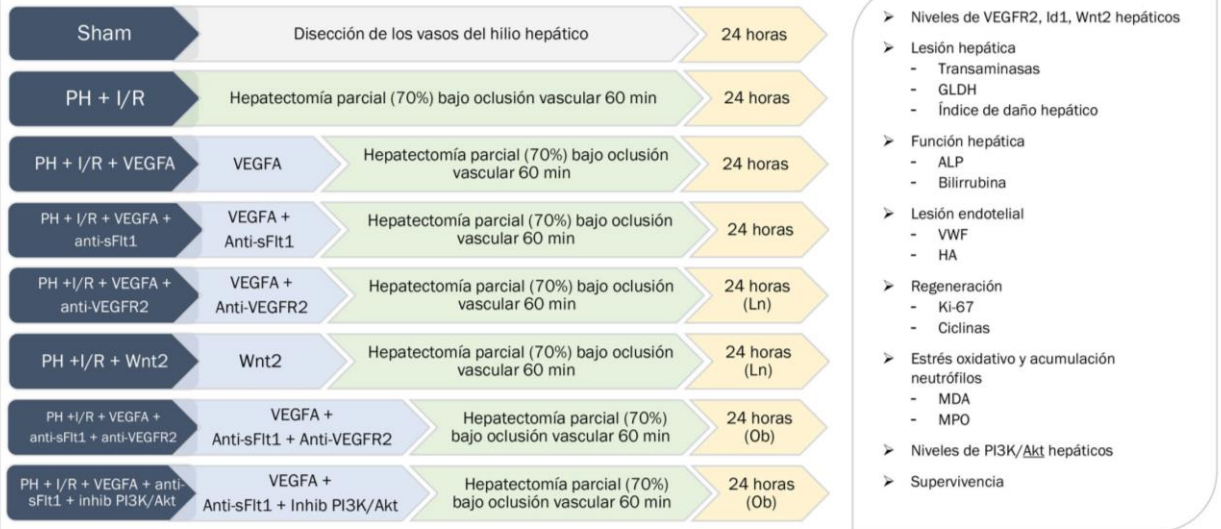


Figura 10.3. Esquema descriptivo de los protocolos y determinaciones comprendidos en el Estudio 2.

Protocolo 3

Posible papel de la vía VEGFR2–Id1- Wnt2 en los mecanismos de acción subyacentes del VEGFA en el contexto de PH+I/R. Ratas Zucker Ln y Ob.

PROCOLO 3



Protocolo 4

Estudio de los niveles de VEGFA en un modelo experimental de obesidad nutricional sometidos a PH+I/R y del papel del VEGFA frente al daño y fallo regenerativo asociado a la cirugía hepática. Ratas Sprague-Dawley.

PROCOLO 4



Cont. Figura 10.3. Esquema descriptivo de los protocolos y determinaciones comprendidos en el Estudio 2.

4. Recogida y procesamiento de las muestras

Se recogieron muestras de tejido hepático, plasma y tejido adiposo gonadal y retroperitoneal de los animales descritos en cada grupo experimental a las horas postcirugía que se especifican en los protocolos correspondientes de cada estudio (Figura 10.2 y 10.3).

Los animales fueron sacrificados por exanguinación después de ser anestesiados. Se obtuvo la sangre a través de la vena cava infrahepática, utilizando heparina como anticoagulante. Esta sangre se mantuvo a 4°C y después se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min para obtener el plasma, que se congeló a -80°C para realizar las correspondientes determinaciones bioquímicas.

El tejido hepático se obtuvo del lóbulo mediano remanente, que se extirpó por completo. Una parte del tejido hepático obtenido fue fijado en formaldehído tamponado al 4% durante 24 horas y posteriormente preservado en una solución PBS 1X para realizar las pruebas de histología e inmunohistoquímica. El resto del tejido fue inmediatamente congelado en nieve carbónica y guardado a -80°C para las determinaciones bioquímicas posteriores. Las muestras de tejido adiposo se trataron del mismo modo que las de tejido hepático.

5. Determinaciones bioquímicas

5.1. Determinación de proteínas totales

La concentración de proteínas totales de todos los homogenados de tejido hepático se determinó con el método colorimétrico de Bradford y se utilizó un reactivo comercial de BioRad (Richmond, CA, USA). Este ensayo se basa en la reacción de una solución ácida del colorante azul de Coomassie con las proteínas de la muestra. La concentración de proteínas es directamente proporcional a la absorbancia observada a una longitud de onda de 595 nm, es decir, cuanto más azul sea la reacción, más proteínas tiene la muestra. Como recta patrón se utilizó una solución de albúmina de suero bovino (BSA).

5.2. Marcadores de lesión hepática

5.2.1. Transaminasas

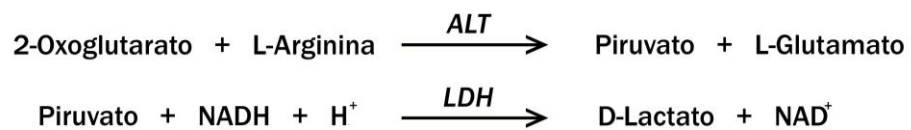
Las transaminasas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) son enzimas citoplasmáticas muy abundantes en el hígado que se encargan de realizar la conversión de un aminoácido en un ácido carboxílico y participan en el metabolismo de los aminoácidos. En condiciones normales estas enzimas se encuentran en el citoplasma, pero cuando ocurre una lesión hepática son liberadas a la circulación sanguínea. De este modo, la determinación de los niveles de estas enzimas resulta útil como parámetro de la lesión hepática.

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

Para la AST:



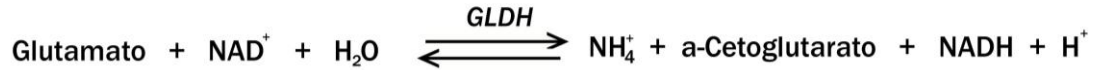
Para la ALT:



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

5.2.2. Glutamato deshidrogenasa (GLDH)

La detección de GLDH en muestras de plasma se realizó mediante un kit colorimétrico comercial (BioVision Inc., CA, USA). El kit se basa en el consumo de glutamato como sustrato y la producción estequiométrica de NADH.

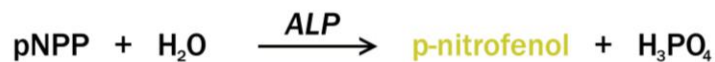


La actividad de GLDH se determina con una lectura cinética de la absorbancia a 405 nm cada 5 minutos durante un mínimo de 30 minutos y el posterior cálculo a partir de la recta de estándares.

5.2.3. Fosfatasa alcalina (ALP)

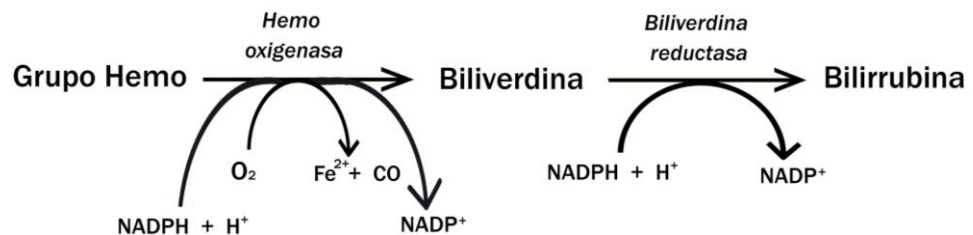
La fosfatasa alcalina es una enzima que cataliza la hidrólisis de ésteres de fosfato en condiciones alcalinas para formar fosfato orgánico e inorgánico. Los cambios en los niveles y actividad de esta enzima están asociados a varios estados patológicos del hígado y a desórdenes biliares.

La actividad de la ALP se determinó con un kit colorimétrico comercial (Abcam, UK) basado en el cambio de color que sufre el p-nitrofenil fosfato (pNPP) al ser desfosforilado a p-nitrofenol (pNP) por la ALP. Este color puede ser medido a 405 nm y la actividad cuantificada por extrapolación a una recta patrón.



5.2.4. Bilirrubina

La bilirrubina es un producto formado por la degradación del grupo hemo en el hígado, donde conjuga con el ácido glucurónico y es segregada a la bilis. Su elevación es un indicativo de lesión hepática y obstrucción de los conductos biliares. En el torrente sanguíneo, la bilirrubina puede circular en forma no conjugada insoluble (forma indirecta) o conjugada con ácido glucurónico soluble (forma directa).



Para detectar la bilirrubina en muestras de plasma se usó un kit comercial (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), basado en el método de Jendrassik-Grof, por el cual la bilirrubina reacciona con el ácido sulfanílico diazoado, dando lugar a un compuesto pigmentado. La absorbancia del pigmento resultante se mide espectrofotométricamente a 530 nm.

5.3. Marcadores de regeneración hepática

5.3.1. Ensayo inmunoenzimático de HGF

El HGF es un factor de crecimiento paracrino involucrado en procesos de regeneración y un potente mitógeno.

Las muestras de hígado fueron homogenizadas en un tampón fosfato salino (PBS) 1X, pH 7, con un disruptor celular tipo Polytron durante 60 segundos. Posteriormente se sometieron a 3 ciclos de congelación-descongelación en nieve carbónica y se centrifugaron a 5000 g a una temperatura de 4°C durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante, del que se calculó la concentración de proteínas según el protocolo descrito en el apartado 5.1, y se guardaron a -80°C para su posterior uso.

Para la determinación del HGF se usó un kit comercial (Elabscience Biotechnology, USA) en los homogenados hepáticos. EL kit se basa en la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA). En esta técnica, los pocillos de la placa están cubiertos por anticuerpos específicos para HGF. A estos pocillos de los cuales se añade la muestra y los estándares correspondientes, el HGF de las cuales se unirá a estos anticuerpos inmovilizados en la placa. A continuación, se añade una solución de anticuerpo biotinilado específico que contiene la enzima y que se unirá al HGF de la muestra que su vez se ha unido al anticuerpo inmovilizado del pocillo, formando un "sandwich". Seguidamente se añade el conjugado avidina-HRP, que se unirá al anticuerpo biotinilado mediante la interacción avidina-biotina, y se añade la solución sustrato que dará la coloración azul directamente proporcional a la cantidad de HGF presente en la muestra. Para detener la reacción se usa una solución Stop que da una coloración amarilla y puede leerse espectrofotométricamente la densidad óptica a 450 nm.

La concentración de HGF se obtiene con la comparación de los resultados al ajuste de la curva patrón de 4 parámetros. El protocolo que se siguió fue el facilitado por el fabricante del kit comercial.

5.3.2. Ensayo inmunoenzimático de TGF- β 1

El TGF- β 1 activo es considerado el principal inhibidor de la proliferación hepatocelular, además de ser una citoquina involucrada en procesos de inflamación entre otros.

Para la determinación de TGF- β se usó un kit comercial (Elabscience Biotechnology, USA) con los mismos homogenados descritos en el apartado 5.3.1. El kit se basa en la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) descrita también en este apartado.

5.4. Marcadores de lesión endotelial

5.4.1. Ensayo inmunoenzimático de HA

El Ácido Hialurónico (HA) es un glucosaminoglicano no sulfatado presente en la matriz extracelular, donde es importante por la hidratación de dicha matriz, adhesión y migración celular e interacción con sustancias extracelulares. Niveles aumentados de HA plasmático son indicativos de daño endotelial y disfunciones vasculares.

Para determinar los niveles de HA plasmáticos, se utilizó un kit inmunoenzimático comercial (R&D Systems, MN, USA). La densidad óptica se midió a 570 nm. Se calculó la concentración de ácido hialurónico extrapolando las lecturas a una curva patrón logística de 4 parámetros.

5.4.2. Ensayo inmunoenzimático de vWF

El factor de von Willebrand (vWF) es una glicoproteína involucrada en procesos de homeostasis. Su aumento en el torrente sanguíneo es indicativo de daño endotelial.

Para determinar los niveles de vWF en muestras de plasma usamos un kit inmunoenzimático (Elabscience Biotechnology, USA). La densidad óptica se leyó espectrofotométricamente a 450 nm y la concentración se obtuvo extrapolando las lecturas a una curva logística de 4 parámetros.

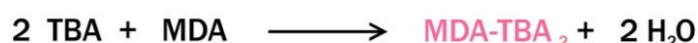
5.5. Marcadores de estrés oxidativo

5.5.1. 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 tal motivo, la determinación de los niveles de nitrotirosinas se utiliza como marcador indirecto de la formación de peroxinitrito. 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 (Jiménez-Castro et al., 2012; Cornide-Petronio et al., 2016). 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.

5.5.2. Determinación del malondialdehído (MDA)

El MDA es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica y se utilizó como parámetro indirecto de estrés oxidativo. Los niveles de MDA se determinaron en muestras de tejido hepático mediante el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Jiménez-Castro et al., 2012; Cornide-Petronio et al., 2016). En condiciones ácidas y a altas temperaturas el MDA reacciona con el TBA para dar lugar a un complejo MDA-TBA de color rosa, cuantificable por espectrofotometría.



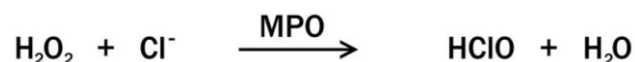
Las muestras de hígado congelado se homogenizaron en 2 ml de tampón Tris Base 0.1 M a pH=7 y se determinó la concentración de proteínas totales en el mismo, siguiendo el procedimiento descrito previamente en el apartado 5.1. A 250 µl de este homogenado se le añadieron 250 µl de ácido tricloroacético (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 una coloración rosada directamente proporcional a la cantidad de MDA presente en las muestras (Serafín et al., 2004a).

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 y se mantuvo a 4°C hasta el día siguiente.

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 hizo una lectura espectrofotométrica de la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm para determinar la intensidad de la coloración rosa que fue proporcional a la concentración de MDA de las muestras.

5.5.3. Determinación de la mieloperoxidasa (MPO)

La MPO es un enzima que se encuentra en el interior de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos polimorfonucleares; y se utiliza como marcador de la infiltración y actividad de neutrófilos en el tejido hepático inflamado (Jiménez-Castro et al., 2012; Cornide-Petronio et al., 2016). Este enzima cataliza la formación de ácido hipocloroso a partir de peróxido de hidrógeno:



El método se basa en la reacción de la tetrametilbencidina (TMB) catalizada por la MPO. Es importante conseguir una buena extracción de la enzima; para ello las muestras se homogenizaron en tampón fosfato (KH₂PO₄ 0,05 M, pH=6; Hexadeciltrimetilamonio de bromuro 0,5%) y posteriormente se sonicaron durante 30 segundos al 20% de potencia y pasaron por tres ciclos

de congelación/descongelación en nieve carbónica. Después, las muestras se incubaron durante 2 horas a 60°C para eliminar los inhibidores de la MPO que pudieran afectar a la determinación. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras durante 12 minutos a 3000-4000g a 4°C y se recuperó el sobrenadante (Peralta et al., 2001).

A 5 µl del sobrenadante se le añadieron 10 µl de reactivo de TMB (5mg/ml disuelto en dimetilsulfóxido). A tiempo t=0 se añadió 70 µl de tampón fosfato (KH₂PO₄ 8 mM, pH=5.4) con H₂O₂ al 0,05% y se determinó la cinética de la MPO, leyendo la absorbancia durante 3 min cada 15 segundos a una longitud de onda de 630 nm.

5.6. Ensayo inmunoenzimático para cortisol

Se determinaron los niveles de cortisol en plasma y tejido hepático mediante la técnica del ELISA (el fundamento de la cual ya se describió en el apartado 5.3.1). Se usó un kit comercial (Bionova Científica, Madrid, España). En este caso, la concentración de cortisol se determinó mediante la lectura espectrofotométrica de la densidad óptica a 450 nm tras añadir el sustrato de TMB. La absorbancia de la muestra es directamente proporcional a la cantidad de cortisol presente. El cálculo cuantitativo se obtuvo extrapolando a una recta de calibración con un ajuste logístico de 4 parámetros.

5.7. Ensayo inmunoenzimático para ACTH

Se determinaron los niveles de ACTH en muestras de plasma mediante la técnica del ELISA (el fundamento de la cual ya se describió en el apartado 5.3.1). Se usó un kit comercial (Bionova Científica, Madrid, España) que se une a los aminoácidos 34-39 de la región C-terminal de la ACTH mediante un anticuerpo biotinilado junto a otro que se une a la zona media y los residuos 1-24 de la región N-terminal unido a HRP. Como sustrato se usa TMB. La intensidad de la coloración se mide con la ayuda de un espectrofotómetro a 450 nm y es directamente proporcional a la cantidad de ACTH que contiene la muestra. Se calcula la concentración mediante extrapolación con una curva de calibración con un ajuste 4 parámetros.

5.8. Determinación de ACh

Para la determinación de la concentración de ACh en hígado se utilizó un kit comercial (BioVision Inc., CA, USA). Las muestras de tejido hepático fueron homogenizadas con el tampón del kit comercial (Assay Buffer), posteriormente centrifugadas 10 min a 15000g a 4°C y recuperado el sobrenadante.

El kit se basa en la reacción de oxidación de la colina a betaína. Al añadir AChE a la reacción, la colina se convierte en ACh. El kit comercial detecta colorimétricamente, mediante la lectura de la densidad óptica a 570 nm, la cantidad de colina libre y total. La cantidad de ACh se obtiene restando la colina libre de la total.

5.9. Ensayo inmunoenzimático para sFlt1

Se determinaron los niveles de receptor 1 de VEGF (o Flt1) en circulación, que corresponde a la forma soluble de este receptor (sFlt1). Se empleó un kit inmunoenzimático comercial (Elabscience Biotechnology, USA). La densidad óptica se leyó espectrofotométricamente a 450 nm y la concentración se obtuvo extrapolando las lecturas a una curva logística de 4-parámetros.

5.10. Western Blot

Se detectó mediante la técnica de western blot la presencia de las proteínas resumidas en la tabla 2 mediante el protocolo descrito a continuación en este apartado.

Las muestras de tejido hepático y adiposo fueron homogenizadas en un disruptor celular tipo Polytron en frío durante 45 segundos en un tampón RIPA con la siguiente composición: 50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% SDS 20%, 1% Deoxicolato de sodio, 1% Igepal (Np-40), 5mM EDTA, 1mM Na₃VO₄ 0.1 M, 50mM NaF, 1mM DTT e inhibidores de proteasas por cada 50 ml de tampón (Complete, Roche) a un pH 7.5. El homogenado se incubó en hielo durante 20 minutos y se centrifugó a 10000g durante 30 min. Se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de proteínas (Jiménez-Castro et al., 2012).

Alternativamente, para las determinaciones de proteínas fosforiladas, utilizamos un tampón con la siguiente composición (MAPK): Las muestras de tejido hepático fueron homogenizadas en un Polytron en frío durante 45 segundos en un tampón con la siguiente composición: 50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1mM PMSF, 50mM NaF, 0,1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,05% Tritón X-100 e inhibidores de proteasas por cada 50 ml de tampón (Complete, Roche) a un pH 7.5. El homogenado se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 15000g durante 20 min. Se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de proteínas (Jiménez-Castro et al., 2012).

Se mezclaron 25 uL del homogenado anterior con la misma cantidad de tampón de carga (95% Laemli/ 5% β-mercaptoetanol) y se procedió a desnaturalizar las proteínas calentando la mezcla a 95°C durante 5 min en un Termoblock. A continuación, se cargó el volumen equivalente a 100 µg de proteína en un gel de poliacrilamida/SDS, el porcentaje del cual se ajustó al peso molecular de la proteína que se desea detectar y se procedió a la electroforesis a un voltaje de 56 V para el upper gel y 105 V para el lower, en un tampón de electroforesis de composición 25 mM Tris base, 192 mM glicina y SDS 20%, pH 7,5. Las proteínas se separaron según su peso molecular en el gel. Posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF (0,2 µm) con una intensidad de 370 mA durante 70 minutos en un tampón 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 20% metanol. Las membranas se sumergieron en una solución de bloqueo con un 5% de BSA (200 mM Tris base, 3 M NaCl, 2% Tween 20 - pH 7,5) durante 60 minutos y después se incubaron durante toda la noche a 4°C con cada uno de los correspondientes anticuerpos descritos en este apartado.

A las 24h las membranas se lavaron con un tampón 200 mM Tris base, 3 M NaCl, 2% Tween 20 (pH 7.5), 3 veces durante 10 minutos, y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con peroxidasa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Después de sucesivos lavados, la detección de las proteínas se llevó a cabo mediante un kit de quimioluminiscencia (Clarity Max™, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del mismo. Un estándar pre-teñido se utilizó como marcador de peso molecular (Kaleidoscope™, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

La estimación cuantitativa de las proteínas en las membranas se realizó por análisis densiométrico de las bandas de proteínas mediante el Programa Quantity One™, (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se corrigió mediante la cantidad de β -actina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), que se utilizó como control. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (Mayoral et al., 1999, Atkinson et al., 2002, Vázquez-Gil et al., 2004).

Proteína	% acril	Muestra Tampón	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución	Peso molecular
<i>11β-HSD1</i>	12%	hígado RIPA	Anti-11 β -HSD1 (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti-Conejo policlonal	1:2000	34 kDa
<i>11β-HSD2</i>	12%	hígado RIPA	Anti-11 β -HSD2 (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti-Conejo policlonal	1:2000	40 kDa
<i>5α-R1</i>	12%	hígado RIPA	Anti-5 α -R1 (Santa Cruz Biotech., USA)	1:200	Anti-Cabra policlonal	1:5000	26 kDa
<i>5α-R2</i>	12%	hígado RIPA	Anti-5 α -R2 (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti-Conejo policlonal	1:2000	29 kDa
<i>5βR</i>	12%	hígado RIPA	Anti-5 β R (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti-Ratón policlonal	1:5000	37 kDa
<i>α7-nAChR</i>	10%	hígado RIPA	Anti- α 7-nAChR (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti- Conejo policlonal	1:2000	55 kDa
<i>M3 mAChR</i>	8%	hígado RIPA	Anti- M3 mAChR (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti- Conejo policlonal	1:2000	75 kDa
<i>PI3K</i>	7.5%	hígado MAPK	Anti-PI3K (Cell Signling, USA)	1:500	Anti- Conejo policlonal	1:2000	85 kDa
<i>pAkt</i>	7.5%	hígado MAPK	Anti-pAkt (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti- Conejo policlonal	1:2000	63 kDa
<i>tAkt</i>	7.5%	hígado MAPK	Anti-tAkt (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti- Conejo policlonal	1:2000	56-62 kDa

Tabla 2. Proteínas determinadas por western blot en el estudio 1 y las condiciones correspondientes.

<i>Proteína</i>	% acril	Muestra	Anticuerpo primario	Dil.	Anticuerpo secundario	Dil.	Peso molecular
VEGFA	10%	hígado RIPA	Anti-VEGF-A (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti-Ratón monoclonal	1:5000	21 kDa
	10% no reductor	Plasma	Anti-VEGF-A (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti-Ratón monoclonal	1:5000	Unido: 100-130 kDa Libre: 45-50 kDa
	10% no reductor	Hígado PBS	Anti-VEGF-A (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti-Ratón monoclonal	1:5000	Unido: 100-130 kDa Libre: 45-50 kDa
VEGFR2 fosforilado	10%	hígado MAPK	Anti-pFik (Santa Cruz Biotech., USA)	1:200	Anti-Conejo policlonal	1:2000	200-230 kDa
Id1	15%	hígado RIPA	Anti-Id1 (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti-Ratón monoclonal	1:5000	15 kDa
Wnt2	10%	Hígado PBS	Anti-Wnt2 (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti-Ratón monoclonal	1:5000	34 kDa
Ciclina A	10%	Hígado RIPA	Anti-Cyclin A (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti-Conejo policlonal	1:2000	54 kDa
Ciclina E	10%	Hígado RIPA	Anti-Cyclin E (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti-Conejo policlonal	1:2000	53 kDa
Ciclina D1	10%	Hígado RIPA	Anti-Cyclin D1 (Sigma Aldrich., USA)	1:500	Anti-Conejo policlonal	1:2000	36 kDa
PI3K	7.5%	hígado MAPK	Anti-PI3K (Cell Signaling, USA)	1:500	Anti- Conejo policlonal	1:2000	85 kDa
pAkt	7.5%	hígado MAPK	Anti-pAkt (Santa Cruz Biotech., USA)	1:500	Anti- Conejo policlonal	1:2000	63 kDa

Tabla 3. Proteínas determinadas por western blot en el estudio 2 y las condiciones correspondientes.

5.11. PCR a tiempo real (RT-PCR)

La extracción de RNA de tejido hepático y tejido adiposo se realizó usando el reactivo TRIzol™ (Thermofisher Scientific, USA) siguiendo con las especificaciones del fabricante. Posteriormente se cuantificó el RNA mediante espectrofotometría con NanoDrop™ y se llevó a cabo su retrotranscripción a cDNA usando el kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermofisher, USA) siguiendo sus indicaciones.

Finalmente se realizó la PCR a tiempo real usando el kit comercial PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Thermofisher, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las sondas utilizadas se resumen en la tabla 3.

Gen	Sondas
<i>Vegfa</i>	5'-CAAACCTCACCAAAGCCAGC-3' (forward)
	5'-TTCTCCGCTCTGAACAAGGC-3' (reverse)
<i>Flt1</i>	5'-GGTGTCTATAGGTGCCGAGC-3' (forward)
	5'-GGGTGATCAGCTCCAGGTTT-3' (reverse)
<i>sFlt1</i>	5'-GAAGACTCGGGCACCTATGC-3' (forward)
	5'-GCAGTGCTCACCTCTAACGA-3' (reverse)
<i>Gadph</i> (control)	5'-AGTGCCAGCCTCGTCTCATA-3'(forward)
	5'-TAACCAGGCGTCCGATACG-3' (reverse)

Tabla 3. Sondas utilizadas en la RT-PCR.

Para la evaluación de los resultados se llevaron a cabo experimentos control de eficiencia y se aplicó el método de $\Delta\Delta C_t$ usando la GADPH como gen de referencia y el grupo Sham como calibrador (Livak and Schmittgen, 2001). La PCR se llevó a cabo en un termociclador iCycler Thermal Cycler de la casa Bio-Rad.

5.12. Estudio histológico

5.12.1. Técnicas de inmunohistoquímica

Las muestras de tejido hepático y tejido adiposo se fijaron en paraformaldehído tamponado al 4% durante 24 horas y posteriormente se mantuvieron en PBS 1X, hasta su inclusión en parafina. En el micrótopo se realizaron los cortes histológicos de 3 μm de grosor, que posteriormente se desparafinaron con xilol y se hidrataron con soluciones de etanol de concentraciones decrecientes para ser sometidos al método inmunohistoquímico.

La inmunohistoquímica se llevó a cabo mediante un kit comercial (DAKO Envision + System, peroxidase; Alemania) siguiendo las instrucciones del

fabricante. En primer lugar, se bloqueó la peroxidasa interna de la muestra. Se incubó con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche.

Seguidamente, y después de una serie de lavados con tampón Tris, se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario correspondiente y se trataron con diaminobenzidina, el sustrato cromógeno que da un precipitado marrón en las células positivas. Se tiñeron los cortes con hematoxilina para dar una tinción de contraste y se montaron los portaobjetos. El índice de marcaje determinó mediante el conteo de núcleo teñido en 30 campos de gran aumento. Y los datos se expresaron como el porcentaje de células teñidas respecto al número total de hepatocitos.

Las proteínas determinadas mediante inmunohistoquímica fueron las siguientes:

- Como prueba para estudiar la regeneración tisular, los cortes de tejido hepático fueron incubados con el anticuerpo primario Ki-67 (clon SP6; Abcam, Cambridge, UK), a una dilución 1:50. Diversos estudios indican que es un marcador fiable de la actividad regenerativa (Kaita et al., 1997).
- También se determinó la inmunolocalización de VEGFA en tejido hepático usando un anticuerpo monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology, USA) a una dilución de 1:600.
- Para el análisis inmunohistoquímico de Flt1 y sFlt1, el tejido adiposo se incubó con un anticuerpo monoclonal de conejo contra sFlt1 y Flt1 (Abcam, UK), a una dilución 1:100.

Para todas las inmunohistoquímicas, se examinaron al menos cuatro secciones por muestra de tejido hepático y de tejido adiposo.

5.12.2. Estudio histológico de daño hepático

Las muestras se procesaron según procedimientos estándar para su estudio mediante microscopía óptica. Inmediatamente después de la extracción de las muestras se fijaron al menos durante 24 horas en formol tamponado al 10%. Tras la inclusión en parafina, las muestras se cortaron con un micrótopo en

secciones de 3-5 μm . Se realizó una tinción con hematoxilina eosina siguiendo los procedimientos convencionales.

Para evaluar la severidad de la lesión hepática, los cortes se clasificaron atendiendo a la siguiente escala: 0, lesión mínima o sin evidencia de lesión; grado 1, lesión consistente en vacuolización citoplasmática e pérdida del contorno celular; 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; grado 4, necrosis muy severa con desaparición de los cordones de hepatocitos, hemorragias e infiltrados de neutrófilo. Para evaluar el porcentaje de necrosis se valoraron 40 campos de aumento alto elegido de manera aleatoria por sección (Cottart et al., 1999). El índice mitótico se valoró por hematoxilina-eosina siguiendo protocolo previamente descrito (Veteläinen et al., 2007a) y se determinó mediante el conteo de núcleos teñidos en 30 campos de gran aumento. Los datos se expresan como el porcentaje de células teñidas respecto al número total de hepatocitos.

5.12.3. Estudio histológico del grado de esteatosis

El grado de esteatosis hepática se evaluó por la técnica de tinción de microcortes de tejido hepático con Oil Red. Las muestras se procesaron según procedimientos estándar para su estudio mediante microscopía óptica. Brevemente, después de la extracción las muestras se fijaron al menos durante 24 horas en formol tamponado al 10%. Tras la inclusión en parafina, las muestras se cortaron con un micrótopo en secciones de 3-5 μm . La tinción de los microcortes de tejido hepático se realizó con Oil Red siguiendo los procedimientos convencionales (Jiménez-Castro et al., 2017). Se contaron al menos 30 campos de gran aumento y al menos cuatro secciones por muestra de hígado.

5.13. Edema

Tras la resección, las muestras hepáticas fueron pesadas y colocadas en un horno de secado a una temperatura de 55°C, donde fueron pesadas periódicamente hasta que se obtuvo un peso constante. El edema hepático se

representa como el incremento en la relación peso húmedo/peso seco (Peralta et al., 1999).

5.14. Estudio estadístico

La significancia estadística entre las variables se determinó vía el test no-paramétrico de Kruskal-Wallis. Se aplicó el U-test de Mann-Whitney para los grupos que mostraban diferencias significativas, y los *P-values* ajustados fueron calculados usando el método del índice de falsos descubrimientos (FDR). Las tasas de supervivencia se estimaron por el método de Kaplan Meier y comparadas mediante los test de Log Rank y Gehan-Breslow-Wilcoxon, ya que el test Gehan-Breslow-Wilcoxon enfatiza diferencias tempranas (Guerrero et al., 2016).

Los datos están expresados con valor de la media \pm error estándar de la media. Los datos se consideraron significativamente diferentes cuando la $p < 0,05$.

RESULTADOS

ESTUDIO 1:

Impacto del cortisol en cirugía hepática de hígados esteatósicos y no esteatósicos.

El objetivo de este estudio fue examinar los efectos de la regulación de los niveles de cortisol en el daño y la regeneración en hígados con y sin esteatosis sometidos a hepatectomía parcial con isquemia-reperfusión.


Nuestros resultados indicaron que en los animales no obesos sometidos a resección hepática no se observaron cambios en los niveles de cortisol, mientras que los niveles de cortisol en plasma, hígado y tejido adiposo se elevaron en animales obesos (60-70% de esteatosis) sometidos a tal cirugía. Tales elevaciones se atribuyeron a un aumento en la expresión de enzimas encargadas de la producción de cortisol y una reducción en aquellas que se encargan de eliminar el cortisol.

En ausencia de esteatosis, la administración de cortisol exógeno aumentó el cortisol circulante, pero no se observaron niveles altos de cortisol en hígado. En tales condiciones se activaron en hígados no esteatósicos los mecanismos encargados de mantener niveles bajos de cortisol para evitar en consecuencia sus efectos nocivos sobre la lesión y regeneración. En presencia de esteatosis, la administración de cortisol resultó en niveles hepáticos elevados de cortisol exacerbando así el daño y el fallo en la regeneración asociado a la cirugía hepática. Los hígados esteatósicos fueron incapaces de regular los niveles de cortisol.

Los efectos perjudiciales del cortisol en los hígados esteatósicos se asociaron a niveles hepáticos elevados de acetilcolina. Al administrar un antagonista del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$, no hubo cambios en términos de daño tisular o fallo regenerativo en los hígados esteatósicos. Sin embargo, la administración de un antagonista del receptor muscarínico M3 protegió a los hígados frente a la lesión, mejoró la regeneración del parénquima y la tasa de supervivencia tras la cirugía.

Estos resultados proporcionan, por primera vez, el papel del cortisol en hígados esteatósicos y no esteatósicos en condiciones de PH bajo oclusión vascular y establece el potencial terapéutico de la vía cortisol-acetilcolina-receptores muscarínicos M3 en la cirugía con hígados esteatósicos y no esteatósicos.

The impact of cortisol in steatotic and non-steatotic liver surgery

María Eugenia Cornide-Petronio ^{a, #}, Esther Bujaldon ^{a, #}, Mariana Mendes-Braz ^a,
Cindy G. Avalos de León ^a, Mónica B. Jiménez-Castro ^b, Ana I. Álvarez-Mercado ^a,
Jordi Gracia-Sancho ^c, Juan Rodés ^{a, d}, Carmen Peralta ^{a, e, *} 

^a Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

^b Transplant Biomedicals S.L., Barcelona, Spain

^c Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain

^d Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^e Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain

Received: November 15, 2016; Accepted: February 12, 2017

Abstract

The intent of this study was to examine the effects of regulating cortisol levels on damage and regeneration in livers with and without steatosis subjected to partial hepatectomy under ischaemia–reperfusion. Ultimately, we found that lean animals undergoing liver resection displayed no changes in cortisol, whereas cortisol levels in plasma, liver and adipose tissue were elevated in obese animals undergoing such surgery. Such elevations were attributed to enzymatic upregulation, ensuring cortisol production, and downregulation of enzymes controlling cortisol clearance. In the absence of steatosis, exogenous cortisol administration boosted circulating cortisol, while inducing clearance of hepatic cortisol, thus maintaining low cortisol levels and preventing related hepatocellular harm. In the presence of steatosis, cortisol administration was marked by a substantial rise in intrahepatic availability, thereby exacerbating tissue damage and regenerative failure. The injurious effects of cortisol were linked to high hepatic acetylcholine levels. Upon administering an $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor antagonist, no changes in terms of tissue damage or regenerative lapse were apparent in steatotic livers. However, exposure to an M3 muscarinic acetylcholine receptor antagonist protected livers against damage, enhancing parenchymal regeneration and survival rate. These outcomes for the first time provide new mechanistic insight into surgically altered steatotic livers, underscoring the compelling therapeutic potential of cortisol–acetylcholine–M3 muscarinic receptors.

Keywords: Partial hepatectomy • ischaemia–reperfusion • cortisol • acetylcholine • liver • steatosis

Introduction

In clinical settings, partial hepatectomy (PH) under ischaemia–reperfusion (I/R) is a common strategy in use to limit bleeding during parenchymal dissection [1]. More than 20% of patients destined for liver resection present with some degree of steatosis, a condition typically linked to obesity [1–3], and this figure is expected to rise in the near future. Hepatic steatosis is a major risk factor for surgery, associated with high rates of complications and postoperative mortality [1, 2, 4]. By identifying mechanisms responsible for the failure of steatotic livers in this setting, discovery of new pharmacologic therapeutics may thus be advanced.

Cortisol is the main active hormone of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, released by the adrenal gland in response to

adenocorticotrophic hormone (ACTH) [5, 6]. Cortisol concentration in liver is regulated by the following enzymes: (i) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1), generating cortisol from inactive cortisone; (ii) 11 β -HSD2, converting cortisol to cortisone; and (iii) 5 α - and 5 β -reductase enzymes, involved in cortisol clearance [5, 7]. In pathologic states, adipose tissue may also display considerable endocrine activity, secreting a range of hormones including cortisol which may be taken up from the circulation by the liver [8–10]. Disturbances of the HPA axis at any level or in hepatic cortisol metabolism and/or intrahepatic cortisol accumulation from circulation may be critical in the pathogenesis of various liver diseases and inflammatory disorders, including inflammatory bowel disease, colitis, atherosclerosis and metabolic syndrome [11–13].

Cortisol mediates anti-inflammatory effects and programmed cell death in liver diseases such as cholestatic hepatitis, shock and sepsis [14, 15]. It also stimulates hepatocellular proliferation in instances of

[#]These authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: Dr. Carmen PERALTA.

E-mail: cperalta@clinic.ub.es

doi: 10.1111/jcmm.13156

© 2017 The Authors.

Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

PH without vascular occlusion [16]. Hence, benefits may be anticipated if cortisol is given in surgical conditions requiring both liver regeneration and protection against I/R.

Several studies have suggested that in cultured human cells, the effects of cortisol rely upon the acetylcholine (ACh) signalling pathway [17, 18]. ACh is the major neurotransmitter of vagus nerve and has proved beneficial in experimental models of sepsis, liver transplantation, haemorrhagic shock, myocardial ischaemia and pancreatitis [19–21]. In addition, *in vitro* studies indicate that ACh stimulates an array of cell lines to proliferate [22, 23]. However, it is not known whether such effects are exerted *via* binding to $\alpha 7$ nicotinic or M3 cellular receptors.

In this study, we examined hepatic cortisol levels, assessed changes in hepatic cortisol metabolic enzymes and determined the relevance of systemic adipose tissue as a major source of cortisol in the context of PH under I/R. We also evaluated the role of hepatic cortisol in rats with and without steatosis, subjected to PH under I/R, by investigating underlying ACh-driven molecular effects.

Materials and methods

Experimental animals

The following groups of male Zucker rats were used: homozygous obese (Ob) animals with severe macro- and microvesicular hepatic fatty infiltration (400–450 g, 60–70% steatosis) or with mild-to-moderate hepatic fatty infiltration (250–300 g, 20–30% steatosis) and heterozygous lean (Ln) animals (350–400 g). All procedures were performed under isoflurane anaesthesia and were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona. European Union regulations (Directive 86/609 EEC) for animal experiments were respected.

Surgical procedure

Experimentation involved a rat model of PH (70%) under 60 min. of ischaemia (standard duration in liver surgery), as described elsewhere [24, 25]. Briefly, once isoflurane anaesthesia was achieved and the left hepatic lobe resected, a microvascular clamp was applied across portal triad (supplying median lobe) for 60 min. Bowel congestion (due to clamping) was avoided by maintaining portal flow through right and caudate lobes. At the end of the ischaemic period, both right and caudate lobes were resected, and the median lobe was reperused by releasing the clamp [24, 25].

Experimental design

Protocol 1: Cortisol metabolism/signalling and effects of cortisol in non-steatotic and steatotic livers (60–70% steatosis)

Procedural subsets were as follows: (i) dissection of hepatic hilar vessels (sham); (ii) PH (70%); (iii) PH (70%) + I/R (60-min. ischaemic period), standard throughout; (iv) PH + I/R after initial lipectomy of retroperitoneal and epididymal white adipose tissue (PH + I/R + LPT) [25]; (v) PH + I/R + cortisol [5 mg/kg, intraperitoneal (IP)] 10 min. preoperatively [16]; (vi)

PH + I/R + ACh [500 μ g/kg, intravenous (IV)] 10 min. preoperatively [19]; (vii) PH + I/R + $\alpha 7$ nAChR antagonist (5 mg/kg, IP) 30 min. preoperatively [19]; (viii) PH + I/R + M3 mAChR antagonist (1 mg/kg, IP), 30 min. preoperatively [26]; and (ix) PH + I/R + cortisol (5 mg/kg, IP) 10 min. preoperatively [16] and M3 mAChR antagonist (1 mg/kg, IP) 30 min. preoperatively (PH + I/R + cortisol + M3 mAChR antagonist) [26].

Protocol 2: Effects of cortisol and ACh in steatotic livers (20–30% steatosis)

Procedural subsets (1–4) duplicated subsets 1, 3, 5 and 6, respectively, of Protocol 1.

In all instances, plasma, liver (median lobe) and white adipose tissue were sampled 16 and 24 hrs postoperatively, freezing specimens on dry ice for biochemical, molecular biology and oil red staining or immersing in formalin for histologic studies. Hepatic injury (assessed by transaminase levels and damage score) and regeneration [per cent Ki 67-positive hepatocytes as well as hepatocyte growth factor (HGF) and transforming growth factor (TGF- β) expression] were gauged at these time-points. To address survival times, select Ln and Ob rats subjected to Protocol 1 (subsets 3–9) were monitored for 14 days [25]. Doses and treatment times were based on prior studies [16, 19, 25, 26] and on preliminary experimentation done by our group.

Biochemical determinations

Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glutamate dehydrogenase (GLDH), HGF and total and active TGF- β levels were quantified as described elsewhere [25, 27]. HGF is a potent mitogen, and active TGF- β is considered the principal inhibitor of hepatocellular proliferation [25]. Cortisol and ACTH levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Bionova Cientifica, Madrid, Spain). Commercial kits (BioVision Inc, Mountain View, CA, USA) were used for ACh determinations. Myeloperoxidase (MPO), an index of neutrophilic influx; malondialdehyde (MDA); nitrotyrosines (reflecting oxidative stress); and hepatic oedema were measured as described elsewhere [28, 29].

Western blotting

Hepatic tissues were processed to obtain cytosolic fractions [25]. Western blotting was conducted as described elsewhere [15, 19], using antibodies directed against the following proteins: 11 β -HSD1, 11 β -HSD2, 5 α R1, 5 α R2, 5 β R, $\alpha 7$ nAChR, M3 AChR and phosphoinositide-3-kinase (PI3K; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); total and phosphorylated Akt (T-Akt and p-Akt, respectively; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA); and β -actin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Immunoreactive protein bands were visualized through chemiluminescence, and densitometric quantification relied on standard software (Quantity One; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Histology, Oil Red O staining and immunohistochemistry

To gauge severity of hepatic injury, haematoxylin and eosin (H&E)-stained sections were graded as follows: (0) no or minimal injury; (1)

mild injury (*i.e.* cytoplasmic vacuolation and focal nuclear pyknosis); (2) moderate or severe injury with extensive nuclear pyknosis, cytoplasmic hyper eosinophilia and loss of intercellular bridges; (3) severe necrosis, marked by hepatic cord disintegration, haemorrhage and neutrophilic infiltrates; and (4) very severe necrosis, showing the latter manifestations to extreme degree [25]. Hepatic steatosis was assessed *via* Oil Red O staining of frozen sections, with percentages rendered from standard image analysis [25]. Hepatic samples analysed for regeneration were immunostained using rabbit monoclonal antibody to Ki 67 (clone SP6; Abcam, Cambridge, UK), diaminobenzidine (for colorization) and haematoxylin counterstain [25]. At least 30 high-power fields were counted per slide.

Statistics

Statistical significance of differing variables was determined *via* non-parametric Kruskal–Wallis test. Mann–Whitney *U*-test was applied to groups showing significant differences, and adjusted *P*-values were

calculated using false discovery rate (FDR) method ($P_{adj} < 0.05$ considered significant). Survival estimates, obtained by Kaplan–Meier method, were then compared using log-rank test, with statistical significance set at $P < 0.05$.

Results

Cortisol levels in livers with and without steatosis (60–70%) 16 hrs postoperatively

In Ln and Ob rats, cortisol and ACTH levels and enzymatic expression involved in cortisol metabolism were similar for PH and sham procedural subsets (Fig. 1A and B). Plasma cortisol and ACTH levels (Fig. 1A) and hepatic cortisol levels (Fig. 1B) in the PH + I/R subset of Ln (non-steatotic) rats were similar to those of sham procedural counterparts. Although enzymes regulating cortisol inactivation or

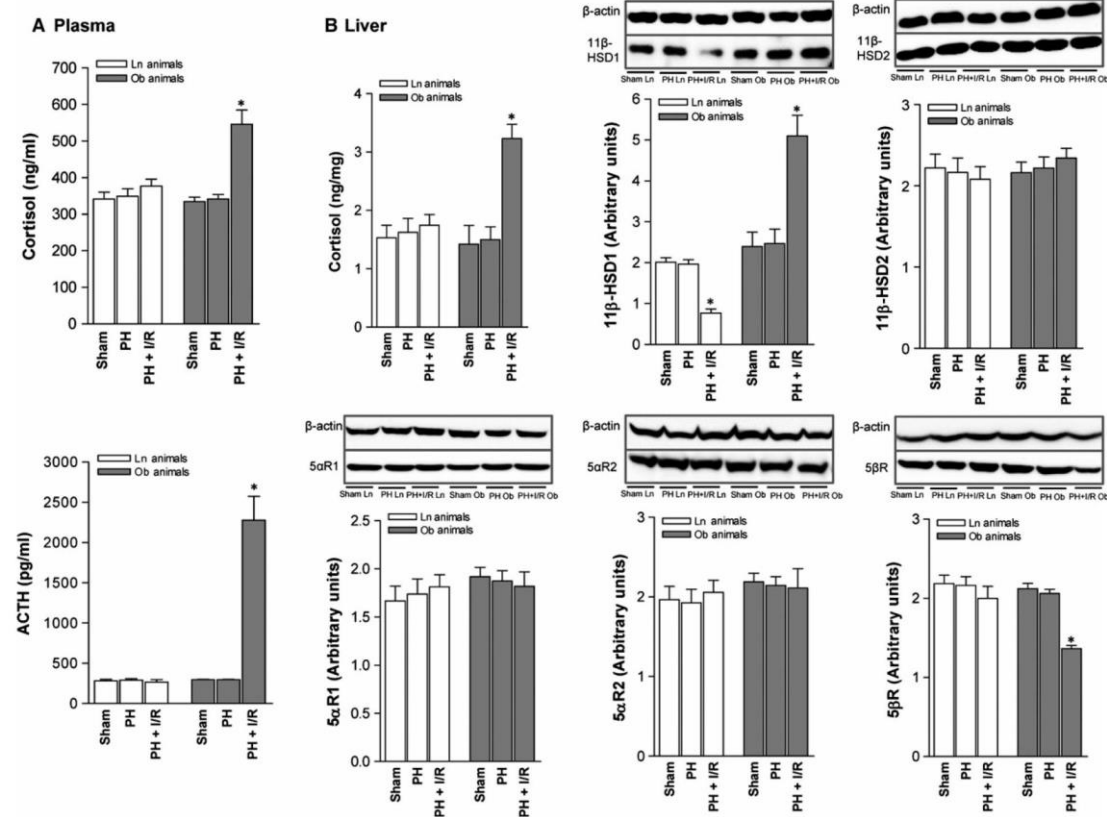


Fig. 1 Cortisol levels in non-steatotic and steatotic livers (60–70% steatosis) 16 hrs postoperatively: **(A)** cortisol and ACTH levels in plasma and **(B)** assay of cortisol and enzymes regulating cortisol metabolism in liver (representative Western blots, top; densitometric analysis, bottom). Data from six lean and six obese animals, per group, * $P < 0.05$ versus sham.

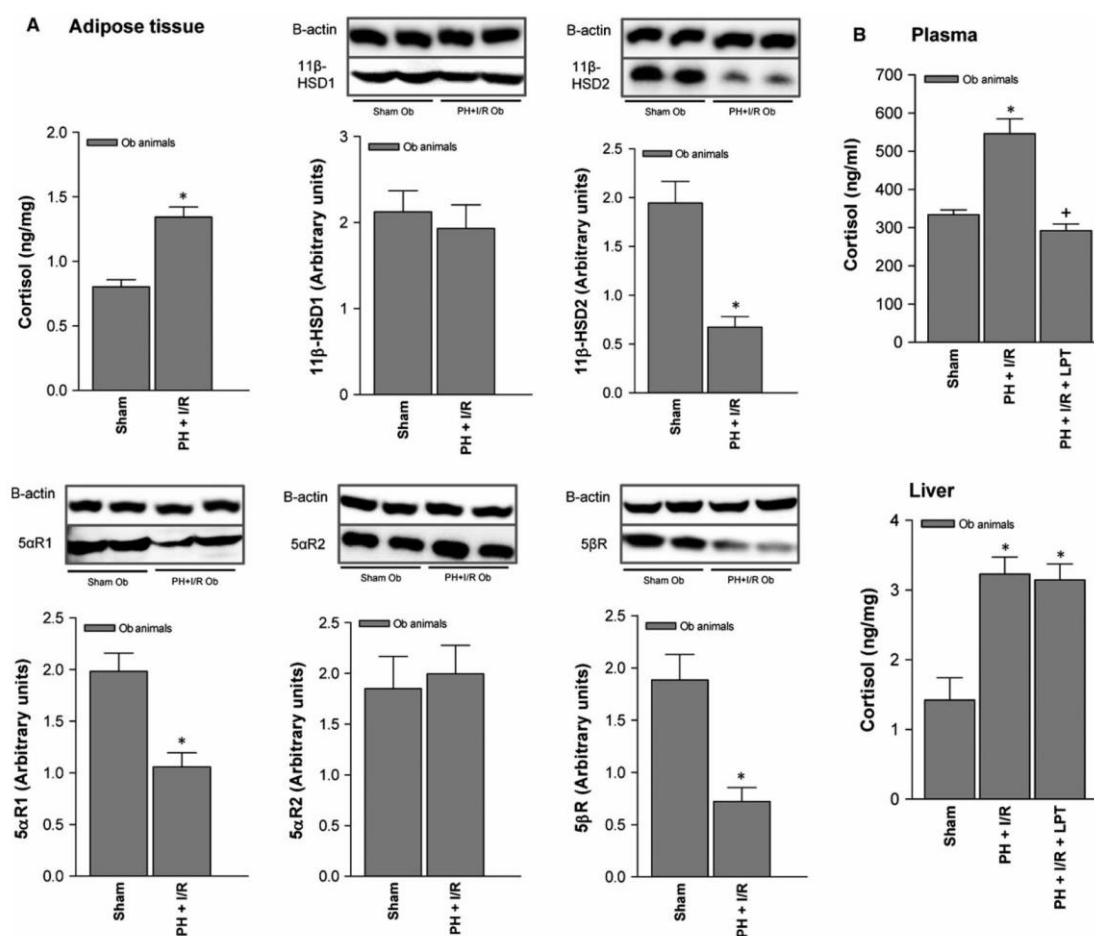


Fig. 2 Cortisol levels in adipose tissue of Ob Zucker rats (60–70% steatosis) 16 hrs postoperatively: **(A)** assay of cortisol and enzymes regulating cortisol metabolism in adipose tissue (representative Western blots, top; densitometric analysis, bottom) and **(B)** cortisol levels in plasma and liver after lipectomy. Data from six obese animals per group. * $P < 0.05$ versus sham; + $P < 0.05$ versus PH + I/R.

clearance (i.e. 11β-HSD2, 5αR and 5βR) also were unchanged post-operatively, 11β-HSD1 (generating cortisol) declined (Fig. 1B). However, plasma cortisol and ACTH levels in the PH + I/R subset of steatotic rats were higher than those found in the sham subset (Fig. 1A), as were hepatic cortisol levels (Fig. 1B). Under these conditions, enzymes regulating cortisol production (11β-HSD1 specifically) were overexpressed, and those involved in cortisol clearance (such as 5βR) were downregulated (Fig. 1B).

Given that adipose tissue may be a real source of various hormones, including cortisol in certain pathologic states [8–10], we examined whether high circulating and hepatic cortisol levels found in Ob rats subjected to PH under I/R may have originated from systemic adipose tissue. Cortisol levels in adipose tissue of the Ob PH + I/R subset were higher than corresponding levels in the sham subset

(Fig. 2A), but enzymes engaged in cortisol inactivation or clearance, including 11β-HSD2, 5αR1 and 5βR, were decreased (Fig. 2A). Surgical removal of adipose tissue in Ob rats (PH + I/R + LPT) reduced cortisol levels in plasma (but not in liver), relative to the PH + I/R subset (Fig. 2B).

Impact of cortisol on hepatic damage and regenerative failure, with and without steatosis (60–70%) 16 and 24 hrs postoperatively

Although cortisol given prior to PH under I/R increased plasma cortisol levels in Ln rats, ACTH levels were unchanged (Fig. 3A), and relative to PH under I/R alone, cortisol levels in non-steatotic livers were

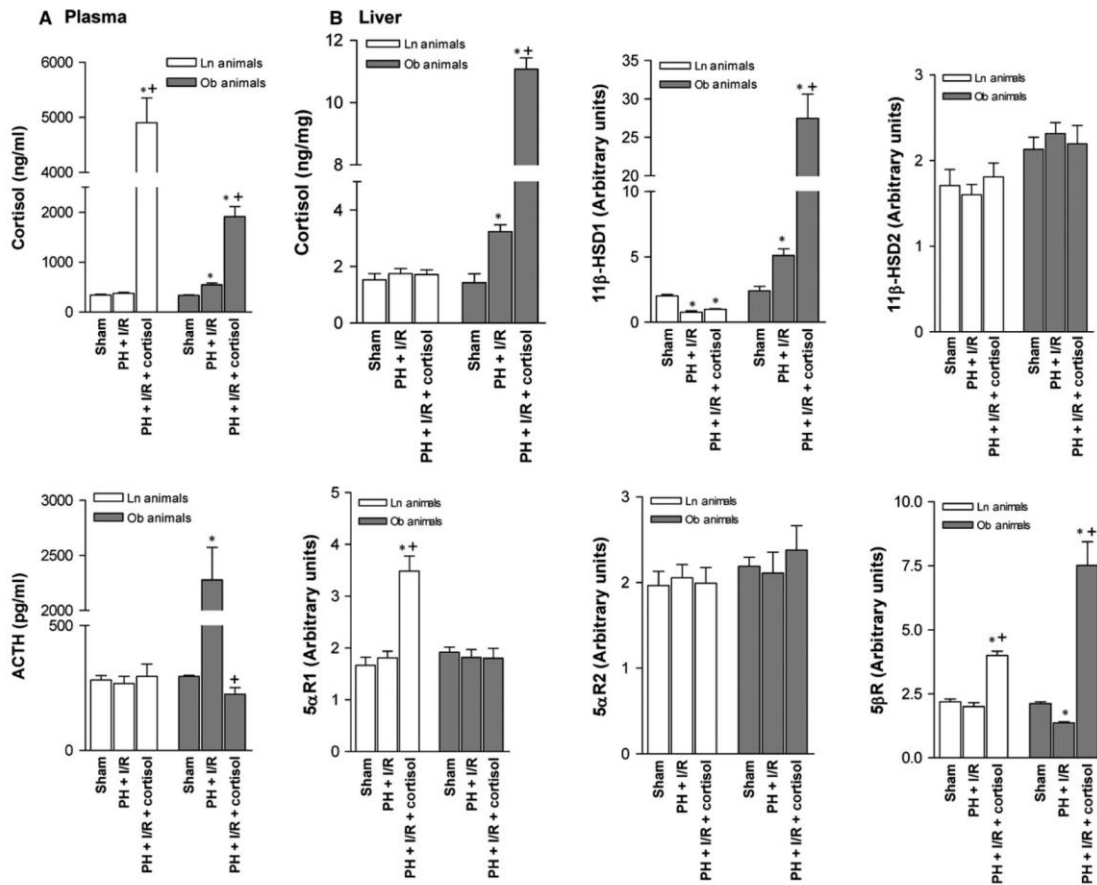


Fig. 3 Effects of cortisol administration on cortisol metabolism in liver (non-steatotic and steatotic) 16 hrs postoperatively: (A) cortisol and ACTH levels in plasma and (B) assay of cortisol and enzymes regulating cortisol metabolism in liver, non-steatotic and steatotic. Data from six lean and six obese animals, per group; * $P < 0.05$ versus sham; ** $P < 0.05$ versus PH + I/R.

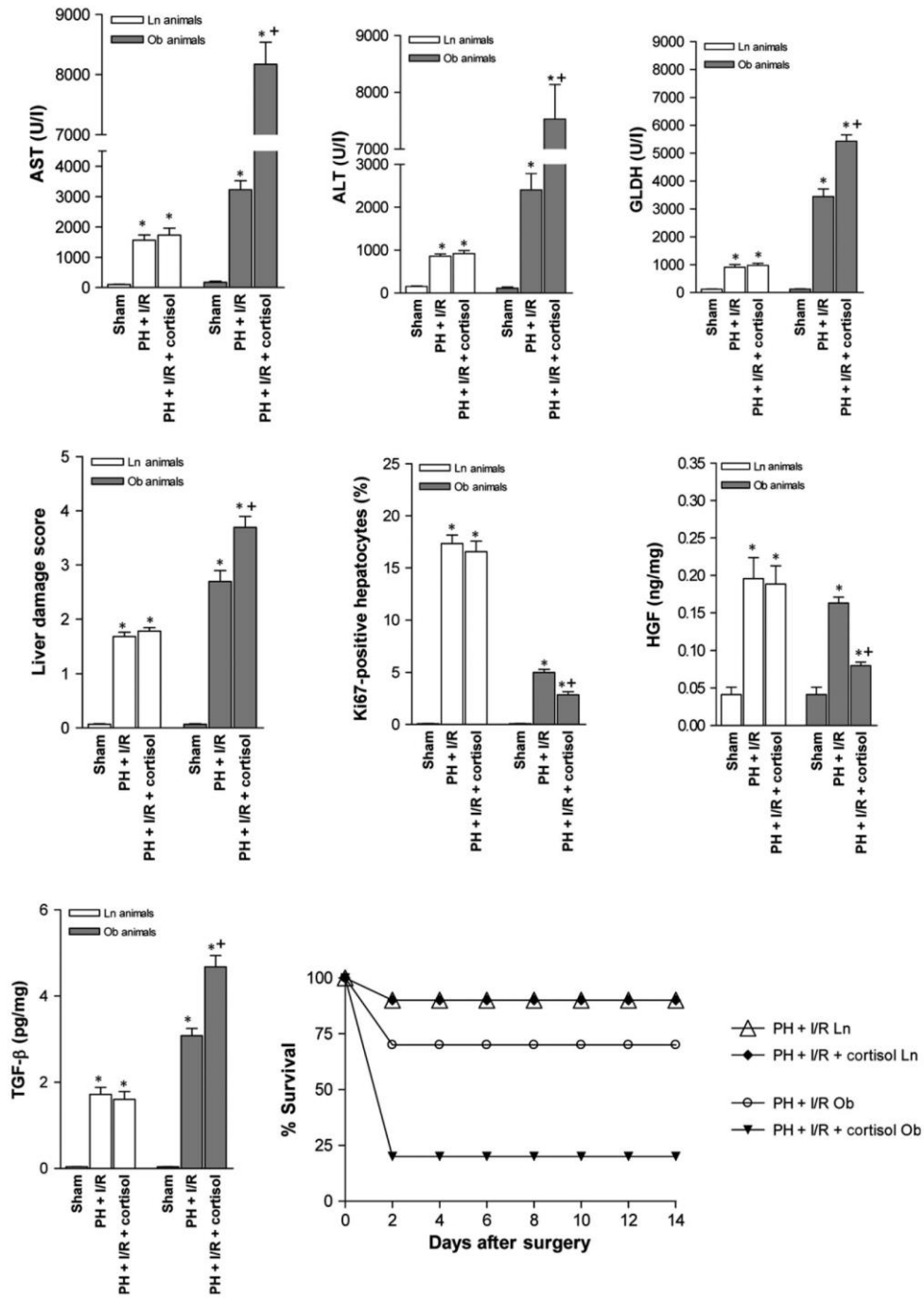
unaffected (Fig. 3B). Enzymes involved in cortisol clearance (including 5 α R1 and 5 β R) were elevated in this setting (Fig. 3B). Adding cortisol to PH under I/R in Ob rats increased plasma cortisol levels but reduced ACTH levels, relative to PH under I/R alone (Fig. 3A). Cortisol levels in steatotic livers were boosted by cortisol administration (PH + I/R + cortisol; Fig. 3B). Under these conditions, expression of 11 β -HSD1 (promoting cortisol generation) increased, as did expression of enzymes such as 5 β R (involved in cortisol clearance).

Cortisol administration prior to PH under I/R in Ln rats did not alter either liver damage or regeneration (Fig. 4). In fact, transaminase concentrations, GLDH levels and damage scores were similar to those for PH

under I/R alone, as were Ki-67 positivity assessments, levels of HGF and active TGF- β and animal survival rates. All groups had similar total hepatic TGF- β levels (data not shown). However, in steatotic livers, cortisol injection (PH + I/R) increased transaminase and GLDH levels and raised damage scores, extending necrotic areas ordinarily seen after PH under I/R (Figs 4 and 5A). Extensive, confluent areas of coagulative necrosis developed postoperatively, with neutrophilic infiltration (Fig. 5A), and there were significantly fewer Ki 67-positive hepatocytes by comparison (Figs 4 and 5B). This reduction in proliferative cells was also associated with low levels of HGF and high levels of active TGF- β (Fig. 4). Subsequent analysis showed a 70% survival rate (3 of 10 dead) for the PH + I/

Fig. 4 Effects of cortisol administration on tissue damage and regeneration in liver (non-steatotic and steatotic) 16 hrs postoperatively: hepatic injury (plasma AST, ALT and GLDH levels; damage score) and hepatic regeneration (per cent Ki-67 positivity; HGF and TGF- β levels). Data from six lean and six obese animals, per group. Survival of 10 lean and 10 obese animals, per group was monitored (postoperative day 14). * $P < 0.05$ versus sham; + $P < 0.05$ versus PH + I/R.

Hepatic injury and liver regeneration



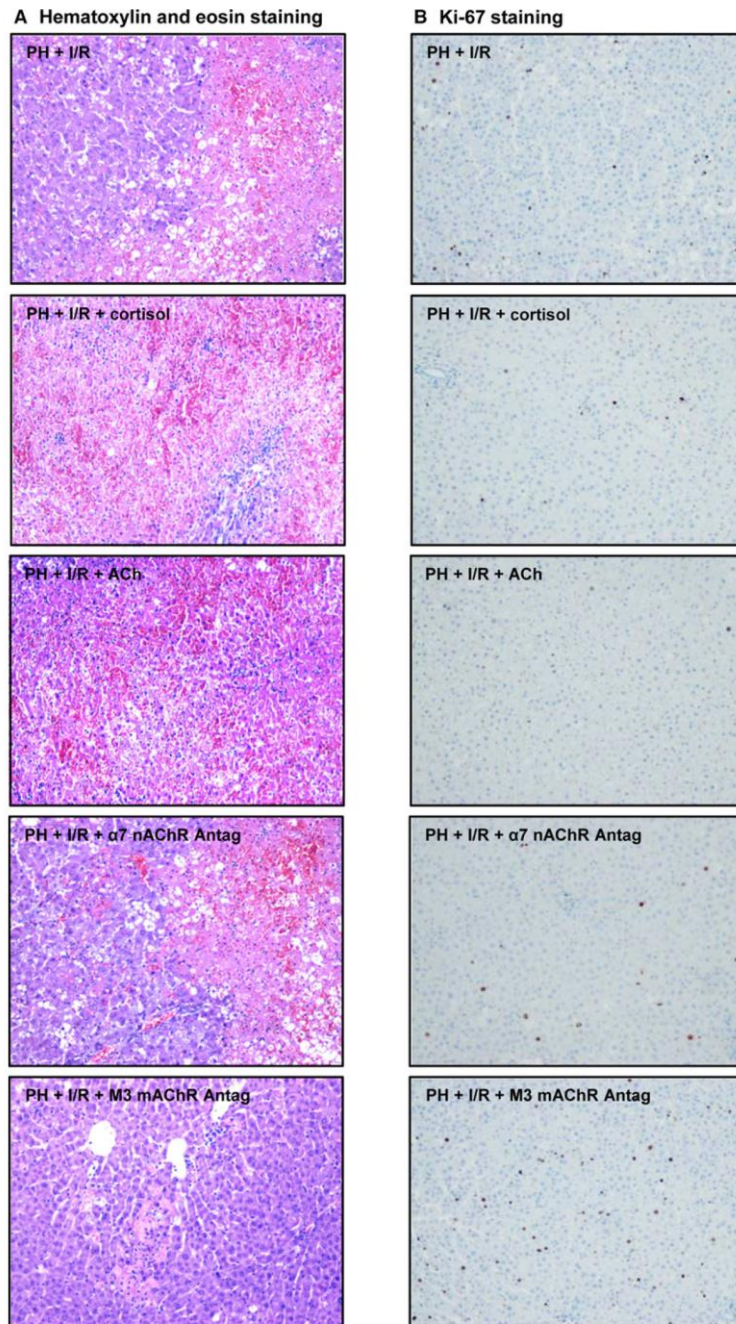


Fig. 5 Histologic features and Ki-67 positivity in steatotic livers (60–70%) 16 hrs postoperatively: **(A)** representative photomicrographs of extensive coagulative necrosis seen in most procedural subsets but very limited in subset PH + I/R + M3 mAChR antagonist (H&E stain, 10 \times) and **(B)** representative photomicrographs of Ki-67 immunohistochemical positivity, strongest in hepatocytes of PH + I/R + M3 AChR antagonist procedural subset (10 \times).

R subset of Ob rats at 14 days (Fig. 4), compared with 20% survival (8 of 10 dead) at 14 days for the PH + I/R + cortisol subset of Ob rats.

Given that markers of hepatic damage peak relatively early (16 hrs) after reperfusion, followed by signs of hepatocyte

proliferation (24 hrs), we then confirmed that hepatic injury and regeneration due to cortisol were similar for both time frames (Figs 4 and 6 - 16 and 24 hrs, respectively).

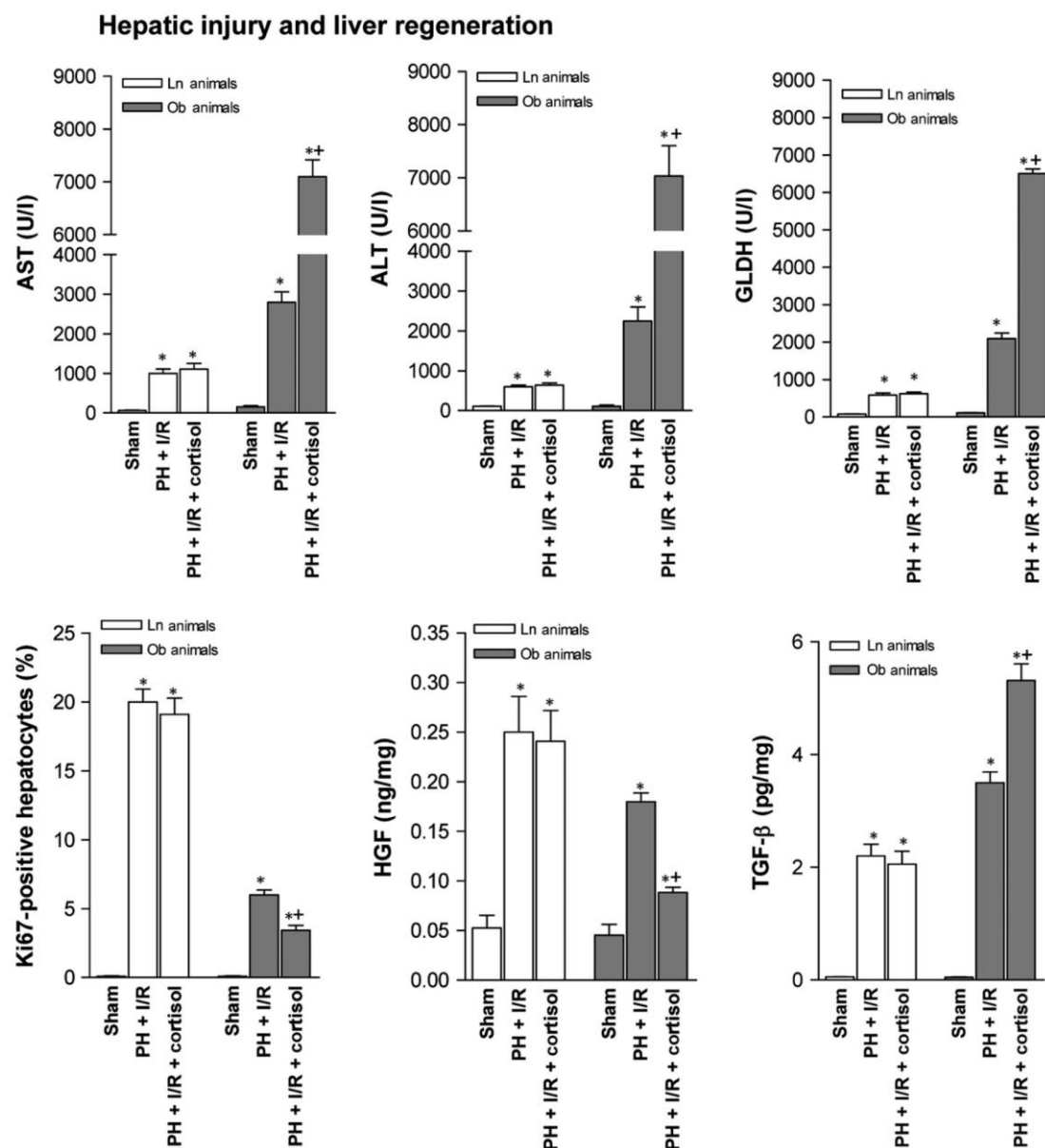


Fig. 6 Effects of cortisol administration on tissue damage and regeneration in non-steatotic and steatotic livers (60–70%) 24 hrs postoperatively: hepatic injury (plasma AST, ALT and GLDH levels) and hepatic regeneration (per cent Ki-67 positivity; HGF and TGF-β levels). Data from six lean and six obese animals, per group; **P* < 0.05 versus sham; +*P* < 0.05 versus PH + I/R.

Effects of cortisol-induced ACh accumulation on tissue damage and regeneration in steatotic livers (60–70%) 16 hrs postoperatively

Acetylcholine levels in non-steatotic livers of the PH + I/R subset were similar to those of the sham subset (40.73 ± 15.33 versus 39.44 ± 9.55 ng/g tissue, $P > 0.05$, data not shown in graphs). As confirmed in Figure 7A, PH under I/R (not PH alone) increased ACh levels in steatotic livers, compared with sham surgery. An attempt was made to discern whether ACh levels might account for the harmful hepatocellular effects of cortisol in steatotic livers subjected to PH under I/R. Cortisol administration produced a relative rise in ACh levels of steatotic livers, thereby increasing hepatic expression of both $\alpha 7$ nicotinic and M3 muscarinic AChR (Fig. 7A). However, ACh administration prior to PH under I/R (versus PH under I/R alone) also increased hepatic injury, with fewer Ki 67-positive hepatocytes, low levels of HGF and high active TGF- β levels (Fig. 7B). Mortality in Ob rats (8 of 10 dead, 20% survival rate at 14 days) was also increased by adding ACh to PH under I/R (Fig. 7B). Still, an $\alpha 7$ nAChR antagonist (PH + I/R + $\alpha 7$ nAChR antagonist) did nothing to mitigate manifestations of hepatic damage or regeneration in this setting, indicating a lesser role for $\alpha 7$ nAChR. In contrast, administering a M3 mAChR antagonist alone or in combination with cortisol (PH + I/R + M3 mAChR antagonist or PH + I/R + cortisol + M3 mAChR antagonist) did confer protection in steatotic livers, reducing transaminase and GLDH levels, limiting the frequency and extent of necrotic areas and lowering damage scores, relative to corresponding markers for PH under I/R (Figs 5 and 7B). Likewise, Ki 67-positive hepatocytes showed a proportionate increase, associated with high HGF and low TGF- β levels. Consequently, the survival rate in Ob rats rose to 90% (1 of 10 dead) at 14 days (Fig. 7B).

Based on published insights into the mechanisms of action for ACh [30], we chose to evaluate whether ACh affects the PI3K/Akt pathway in resected steatotic livers. Hepatic levels of proteins PI3K and pAkt (the primary target of PI3K-initiated signalling) were lowered by adding ACh to PH under I/R (Fig. 8A), inducing relative increases in MDA, nitrotyrosine and MPO levels and fostering hepatic oedema (Fig. 8B). Addition of an M3 mAChR antagonist instead, with or without cortisol administration (PH + I/R + M3 mAChR antagonist or PH + I/R + cortisol + M3 mAChR antagonist), was associated with PI3K/Akt overexpression, thus protecting steatotic livers from oxidative stress, neutrophil influx and oedema.

Effects of cortisol and ACh on tissue damage and regeneration in steatotic livers (20–30%) 16 hrs postoperatively

As in highly steatotic livers (60–70% steatosis), added cortisol or ACh increased biochemical markers of hepatic damage, relative to PH

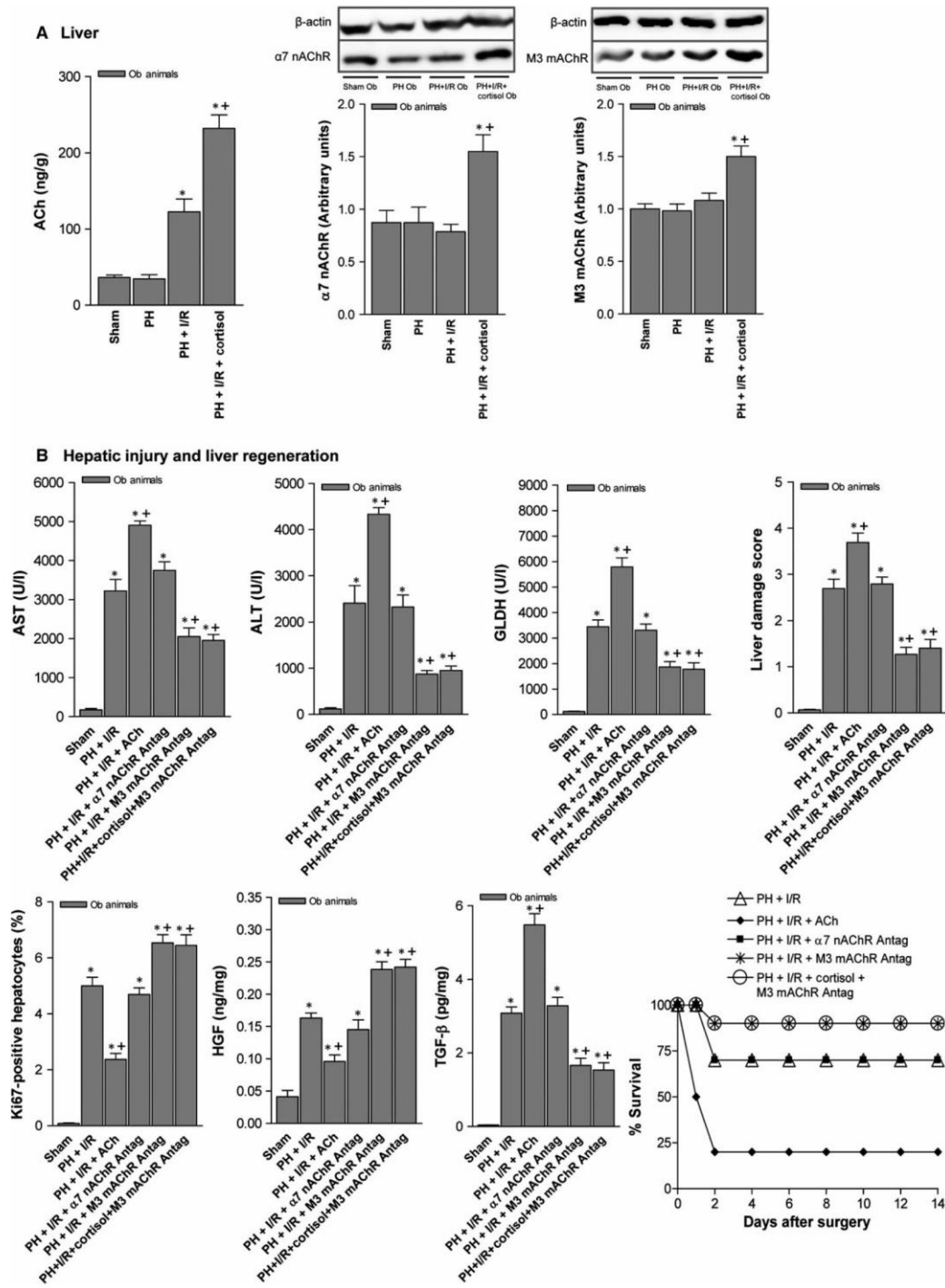
under I/R alone (Fig. 9). Significantly fewer Ki 67-positive hepatocytes resulted from cortisol or ACh injection as well, with low levels of HGF and high levels of active TGF- β .

Discussion

The findings reported here are the first to suggest that, in the context of PH under I/R, cortisol administration has no virtually impact on non-steatotic livers, whereas steatotic livers are actually harmed by added cortisol. This is in sharp contrast with the known therapeutic benefits of cortisol in cholestatic hepatitis, shock and sepsis [14, 15]. However, such pathologic states differ fundamentally [14, 15] from surgical intervention, so this is not entirely surprising, and as with other treatments [4, 31, 32], both surgical strategy (PH alone or with vascular occlusion) and baseline liver status (steatotic versus non-steatotic) may ultimately dictate the hepatocellular effects of cortisol. Studies of non-steatotic livers subjected to PH without I/R indicate that cortisol dosage < 6.25 mg/kg stimulates hepatocytic proliferation, whereas higher cortisol dosing impairs the regenerative process [16, 33]. Our experimental model of PH was adapted accordingly, using a therapeutic cortisol dosage of 5 mg/kg. Of note, we found that low-dose cortisol (< 5 mg/kg) did not raise either circulating or hepatic cortisol levels in the setting of PH + I/R surgical procedures (data not shown). On the other hand, the benefits of cortisol in event of PH [16] were reversed by implementing vascular occlusion (PH + I/R). Furthermore, the changes in cortisol metabolism/signalling that we observed in steatotic livers subjected to PH under I/R were not primarily attributable to PH. The nature of hepatic and surgical conditions, through specific mechanisms of hepatic I/R injury and regeneration, resulted in differing outcomes for the various therapeutic strategies evaluated.

From our perspective, cortisol-induced ACh accumulation may partly explain the harmful effects of administering cortisol prior to resecting steatotic liver. ACh (via M3 muscarinic receptors) reduced PI3K/Akt expression and exacerbated the inflammatory response, thus worsening tissue damage and encouraging regenerative failure. Indeed, the role of ACh does differ in various pathologic states, proving advantageous in haemorrhagic shock, myocardial ischaemia and pancreatitis [19–21], but promoting inflammation and damage in chronic obstructive pulmonary disease [34]. Our results for PH under I/R are nonetheless unlike than those detailed in previous reports of liver transplants from brain-dead donors, whereby steatotic grafts were protected by ACh during prolonged (6-hrs) cold ischaemia [35]. This is expected because the systemic alterations induced by brain death (absent during PH under I/R), the extent and type of ischaemia (*i.e.* cold or warm) and the presence of regeneration all lead to differences in the mechanisms of

Fig. 7 Effects of cortisol-induced ACh accumulation on tissue damage and regeneration in steatotic livers (60–70%) 16 hrs postoperatively: **(A)** ACh, $\alpha 7$ nicotinic and M3 muscarinic acetylcholine receptor levels in liver (representative Western blots, top; densitometric analysis, bottom) and **(B)** hepatic injury (plasma AST, ALT and GLDH levels; damage score) and regeneration (per cent Ki-67 positivity; HGF and TGF- β levels). Data from six obese animals per group; survival of 10 obese animals per group **(B)**, postoperative day 14; * $P < 0.05$ versus sham; + $P < 0.05$ versus PH + I/R.



hepatic I/R injury and in the effects of the therapeutic strategies evaluated.

Regarding the changes in cortisol levels and cortisol metabolism/signalling in the surgery of hepatic resections, we report by the first time that, unlike Ln rats, whose cortisol levels were

unchanged by liver surgery, hepatic and circulating cortisol levels increased in Ob rats subjected to PH under I/R. Hence, a net increase in secretory activity of HPA axis was displayed by Ob rats only. The low levels of cortisol observed postoperatively in non-steatotic livers were associated with reduced 11 β -HSD1, and upon

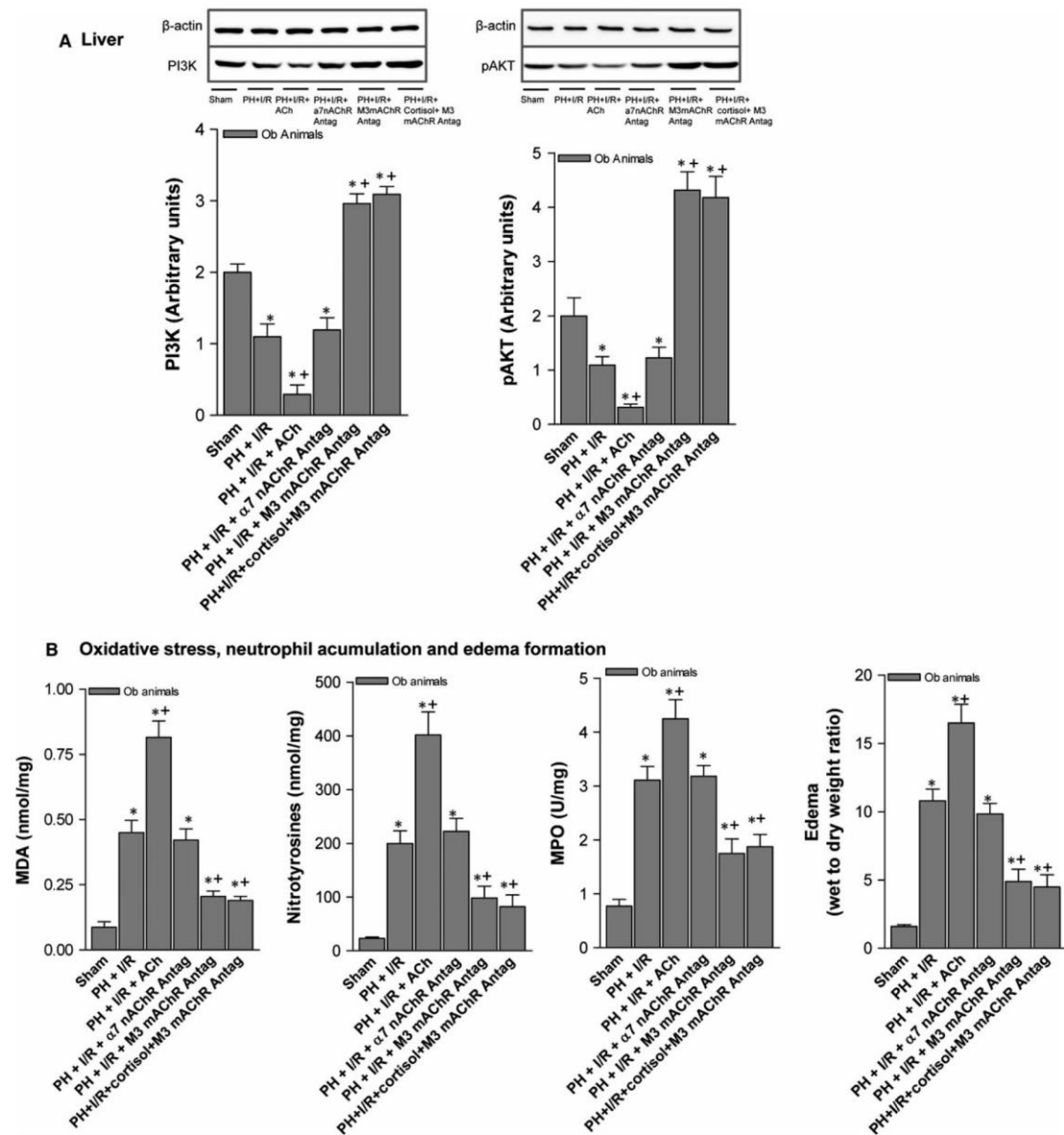


Fig. 8 ACh mechanisms of action in steatotic livers (60–70%) 16 hrs postoperatively: **(A)** hepatic PI3K/pAkt expression (representative Western blots, top; densitometric analysis, bottom) and **(B)** MDA, nitrotyrosine and MPO levels and hepatic oedema. Data from six obese animals, six per group. * $P < 0.05$ versus sham; + $P < 0.05$ versus PH + I/R.

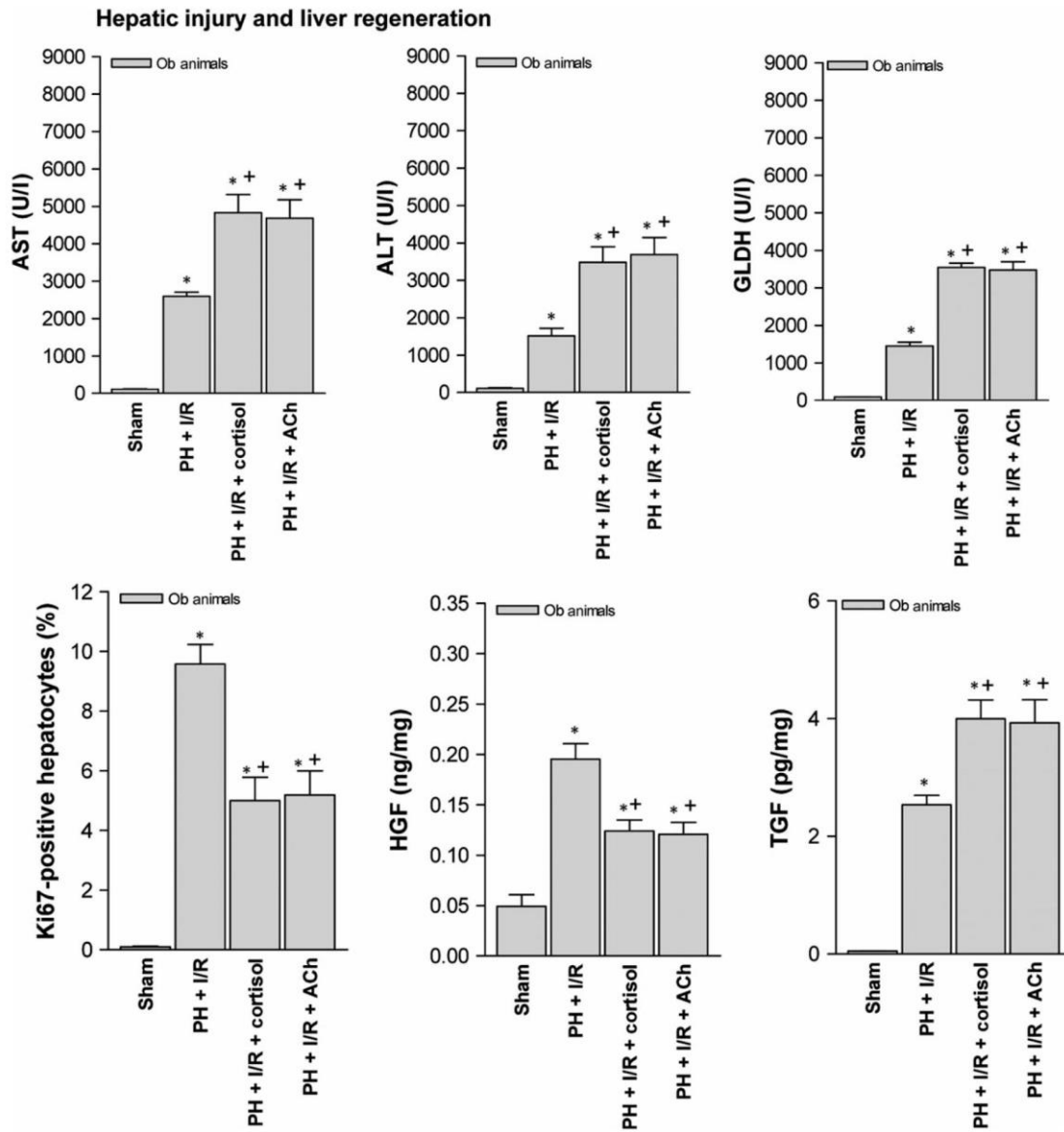


Fig. 9 Effects of cortisol and ACh on tissue damage and regeneration in steatotic livers (20–30%) 16 hrs postoperatively: hepatic injury (plasma AST, ALT and GLDH levels) and hepatic regeneration (per cent Ki-67 positivity; HGF and TGF-β levels). Data from six obese animals, six per group; * $P < 0.05$ versus sham; + $P < 0.05$ versus PH + I/R.

cortisol administration, clearance of hepatic cortisol predominated in such livers, driven by increased reductase expression. Therefore, a compensatory mechanism is apparently operant, preventing intra-hepatic cortisol overload and its deleterious hepatocellular effects. Postoperative cortisol accumulation in remnant steatotic livers

seemed to occur independently, unrelated to peripheral adipose tissue sources, perhaps due in part to altered enzymatic regulation of cortisol metabolism. As in some chronic inflammatory conditions, such as non-alcoholic steatohepatitis, inflammatory bowel disease and colitis [12, 36], overexpression of 11β-HSD1 and reductase

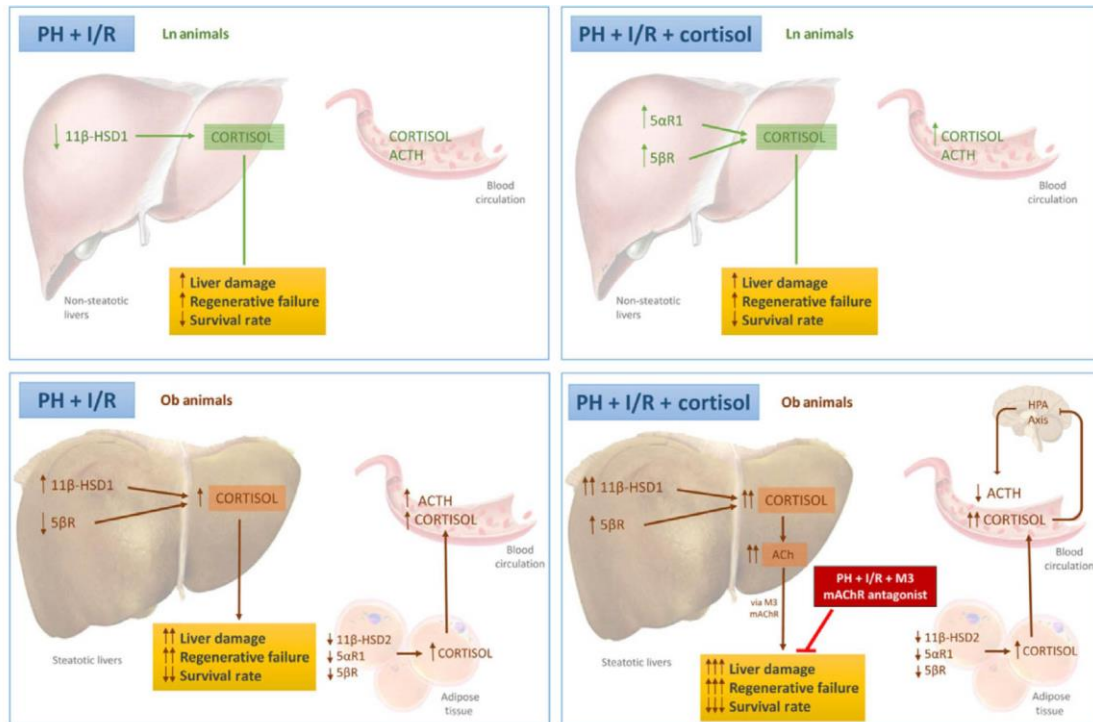


Fig. 10 Schematic of various procedural and pharmacologic interventions conducted (PH + I/R; PH + I/R + cortisol; and PH + I/R + M3 mAChR antagonism), depicting outcomes and proposed signalling pathways.

downregulation have been confirmed in steatotic livers subjected to surgery. Administration of cortisol prompts overexpression of 5βR (ostensibly to eliminate excess hepatic cortisol), which may be offset by high levels of 11β-HSD1. Hence, accumulated cortisol reaped its harmful effects in steatotic livers.

In the event of deficient 11β-HSD1 secretion (impairing cortisol replenishment), the tendency for plasma cortisol to decline is preempted through enhanced ACTH-dependent cortisol production [5]. Conversely, impaired peripheral inactivation of cortisol (e.g. 11β-HSD2 deficiency) is balanced *via* HPA axis, reducing cortisol production sufficiently to maintain normal plasma levels [5]. It then appears that enzymatic fluctuations important in determining intracellular cortisol levels of steatotic livers do not lessen the importance of regulating circulating cortisol concentrations by HPA axis. The cortisol given to our Ob rats (prior to PH under I/R) triggered a negative feedback loop through HPA axis, lowering circulating ACTH levels (and ACTH-dependent cortisol secretion by default) to counteract a surge in circulating cortisol. However, hepatic cortisol levels were not similarly modulated, with adverse parenchymal consequences. In non-steatotic livers, endogenous cortisol metabolism seemed to prevail, modulating intracellular cortisol locally, whereas the role played by HPA axis (regulating circulating cortisol levels) was minor. Cortisol administration did not

alter circulating ACTH levels. It is quite feasible that endogenous hepatic enzymes regulate cortisol metabolism independently, keeping cortisol levels low and limiting any harmful effects.

Investigations aimed at identifying prognostic factors in liver surgery are both necessary and relevant. Data presented here indicate that not only is there no direct association between circulating levels and extent of hepatic damage or regeneration failure, but also hepatic enzymes governing cortisol metabolism may vary, without corresponding changes in plasma cortisol levels. For this reason, it is unlikely that cortisol will become an important prognostic factor in liver surgery.

Further studies beyond present scope are needed to determine why circulating cortisol levels were lower in Ob (*versus* Ln) rats after cortisol administration. We feel that differential effects of cortisol on the HPA axis may explain the disparities of this animal model, rooted in baseline liver status. However, potential contributions by adipose tissue or liver in Ob rats (through either increased uptake of cortisol from circulation or by reduced circulatory release) after cortisol administration cannot be discounted. Ultimately, hepatic cortisol levels were higher in Ob (*versus* Ln) rats following cortisol injection.

Here, we report that in instances of PH under I/R, HPA axis fundamentals, hepatic cortisol levels, enzymatic shifts in hepatic cortisol metabolism and the contributory potential of adipose tissue (as a

cortisol source) are all dependent on baseline liver status. Non-steatotic livers seem capable of limiting cortisol excess, preventing adverse manifestations that otherwise ensue. In steatotic livers, the opposite is true. Cortisol levels are poorly controlled, culminating in worse tissue damage and regenerative failure postoperatively (Fig. 10). Strategies to block cortisol activity are probably worthwhile to protect steatotic livers in this setting, given that cortisol in hepatic remnants may favour accumulation of ACh. It is our contention that in the presence of hepatic steatosis, blockade of M3 mAChR may reduce the incidence of postoperative complications following PH under vascular occlusion.

Acknowledgements

This research was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (SAF-2015-64857-R) Madrid, Spain, by the European Union (Fondos Feder, 'una manera de hacer Europa'), by CERCA Program/Generalitat de Catalunya, and by the Secretaria d'Universitats i Recerca (SGR2014-144) Barcelona, Spain. MECP has received a Sara Borrell postdoctoral contract from ISCIII, Madrid, Spain, and CGAL is the recipient of a fellowship from CONACYT, México. MBJC also has a contract from EMPLEA Program-MINECO, Madrid,

Spain, and JGS has a contract from the Programa Ramón y Cajal-MINECO, Madrid, Spain. We thank Michael Maudsley of the Language Advisory Service at the University of Barcelona and our copy editor at Bioscience Writers for English text revisions. We are indebted to the Bioinformatics core facility of the IDIBAPS for the technical help.

Author contributions

MECP and EB contributed to acquisition of experimental data and data analysis/interpretation. MMB, CGAL, MBJC and AIAM all contributed to acquisition of experimental data. JGS and JR contributed to data analysis/interpretation and critical revision of this article. CP contributed to the study concept/design, acquisition of experimental data, data analysis/interpretation and drafting and critical revision of this article. All authors have approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. **McCormack L, Petrowsky H, Jochum W, et al.** Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann Surg.* 2007; 245: 923–30.
2. **Veteläinen R, van Vliet A, Gouma DJ, et al.** Steatosis as a risk factor in liver surgery. *Ann Surg.* 2007; 245: 20–30.
3. **Wree A, Kahraman A, Gerken G, et al.** Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion.* 2011; 83: 124–33.
4. **Ramalho FS, Alfany-Fernandez I, Casillas-Ramirez A, et al.** Are angiotensin II receptor antagonists useful strategies in steatotic and non-steatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion? *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 329: 130–40.
5. **Walker BR, Seckl JR.** Cortisol metabolism. In: Bjorntorp P, editor. *International textbook of obesity.* New York: Wiley; 2001. pp. 241–68.
6. **Gathercole L, Stewart P.** Targeting the pre-receptor metabolism of cortisol as a novel therapy in obesity and diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 122: 21–7.
7. **Nixon M, Upreti R, Andrew R.** 5 α -Reduced glucocorticoids: a story of natural selection. *J Endocrinol.* 2012; 212: 111–27.
8. **Targher G, Bertolini L, Zoppini G, et al.** Relationship of non-alcoholic hepatic steatosis to cortisol secretion in diet-controlled Type 2 diabetic patients. *Diabet Med.* 2005; 22: 1146–50.
9. **Kershaw EE, Flier JS.** Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 2548–56.
10. **Livingstone DE, Walker BR.** Is 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 a therapeutic target? Effects of carbenoxolone in lean and obese Zucker rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 305: 167–72.
11. **Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM.** Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 125–63.
12. **Tarantino G, Finelli C.** Pathogenesis of hepatic steatosis: the link between hypercortisolism and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2013; 19: 6735–43.
13. **Zoppini G, Targher G, Venturi C, et al.** Relationship of nonalcoholic hepatic steatosis to overnight low-dose dexamethasone suppression test in obese individuals. *Clin Endocrinol.* 2004; 61: 711–5.
14. **Gönc EN, Kandemir N, Andiran N, et al.** Cholestatic hepatitis as a result of severe cortisol deficiency in early infancy: report of two cases and review of literature. *Turk J Pediatr.* 2006; 48: 376–9.
15. **Honda Y, Ohno S, Nakajin S.** Leydig cells from neonatal pig testis abundantly express 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) type 2 and effectively inactivate cortisol to cortisone. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008; 108: 91–101.
16. **Nadal C.** Dose-related opposite effects of hydrocortisone on hepatocyte proliferation in the rat. *Liver.* 1995; 15: 63–9.
17. **Bouzat C, Barrantes FJ.** Hydrocortisone and 11-desoxycortisone modify acetylcholine receptor channel gating. *NeuroReport.* 1993; 4: 143–6.
18. **Braun S, Askanas V, Engel WK, et al.** Long-term treatment with glucocorticoids increases synthesis and stability of junctional acetylcholine receptors on innervated cultured human muscle. *J Neurochem.* 1993; 60: 1929–35.
19. **Jiménez-Castro MB, Meroño N, Mendes-Braz M, et al.** The effect of brain death in rat steatotic and non-steatotic liver transplantation with previous ischemic preconditioning. *J Hepatol.* 2015; 62: 83–91.
20. **Mioni C, Bazzani C, Giuliani D, et al.** Activation of an efferent cholinergic pathway produces strong protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Crit Care Med.* 2005; 33: 2621–8.
21. **Tracey KJ.** Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Clin Invest.* 2007; 117: 289–96.
22. **Turner R, Lozoya O, Wang Y, et al.** Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *Hepatology.* 2011; 53: 1035–45.
23. **Cassiman D, Libbrecht L, Sinelli N, et al.** The vagal nerve stimulates activation of the hepatic progenitor cell compartment via

- muscarinic acetylcholine receptor type 3. *Am J Pathol.* 2002; 161: 521–30.
24. **Elias-Miró M, Mendes-Braz M, Cereijo R, et al.** Resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. *J Hepatol.* 2014; 60: 87–95.
 25. **Mendes-Braz M, Elias-Miró M, Kleuser B, et al.** The effects of glucose and lipids in steatotic and non-steatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischaemia-reperfusion. *Liver Int.* 2014; 34: e271–89.
 26. **Andersson M, Aronsson P, Giglio D, et al.** Pharmacological modulation of the micturition pattern in normal and cyclophosphamide pre-treated conscious rats. *Auton Neurosci.* 2011; 159: 77–83.
 27. **O'Brien PJ, Slaughter MR, Polley SR, et al.** Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. *Lab Anim.* 2002; 36: 313–21.
 28. **Carrasco-Chaumel E, Roselló-Catafau J, Bartrons R, et al.** Adenosine monophosphate-activated protein kinase and nitric oxide in rat steatotic liver transplantation. *J Hepatol.* 2005; 43: 997–1006.
 29. **Serafin A, Roselló-Catafau J, Prats N, et al.** Ischemic preconditioning increases the tolerance of Fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am J Pathol.* 2002; 161: 587–601.
 30. **Resende RR, Adhikari A.** Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation. *Cell Commun Signal.* 2009; 7: 20.
 31. **Casillas-Ramirez A, Amine-Zaouali M, Massip-Salcedo M, et al.** Inhibition of angiotensin II action protects rat steatotic livers against ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med.* 2008; 36: 1256–66.
 32. **Watanabe M, Chijiwa K, Kameoka N, et al.** Gadolinium pretreatment decreases survival and impairs liver regeneration after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion in rats. *Surgery.* 2000; 127: 456–63.
 33. **Rizzo AJ, Heilpern P, Webb TE.** Temporal Changes in DNA and RNA Synthesis in the Regenerating Liver of Hydrocortisone-treated Rats. *Cancer Res.* 1971; 31: 876–81.
 34. **Kistemaker LE, van Os RP, Dethmers-Ausema A, et al.** Muscarinic M3 receptors on structural cells regulate cigarette smoke-induced neutrophilic airway inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015; 308: L96–103.
 35. **Cornide-Petronio ME, Negrete-Sánchez E, Mendes-Braz M, et al.** The Effect of High-Mobility Group Box 1 in Rat Steatotic and Nonsteatotic Liver Transplantation From Donors After Brain Death. *Am J Transplant.* 2016; 16: 1148–59.
 36. **Ahmed A, Rabbitt E, Brady T, et al.** A switch in hepatic cortisol metabolism across the spectrum of non alcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2012; 7: e29531.

ESTUDIO 2:

Relevancia del VEGFA en hígados de rata sometidos a hepatectomía parcial bajo oclusión vascular

El objetivo de este estudio fue examinar los efectos de VEGFA frente al daño y al fallo en la regeneración en hígados esteatósicos y no esteatósicos sometidos a PH con I/R. Se investigaron además los mecanismos subyacentes involucrados.

Nuestros resultados indicaron que los niveles de VEGFA disminuyeron en ambos tipos de hígados, esteatósicos y no esteatósicos después de la cirugía. La administración de VEGFA exógeno aumentó los niveles de VEGFA en hígados no esteatósicos, reduciendo la incidencia de complicaciones postoperatorias después de la cirugía a través de la vía VEGFR2-Wnt2, e independientemente de Id1.

Inesperadamente, la administración de VEGFA redujo notablemente los niveles de VEGFA en hígados esteatósicos, exacerbando el daño y el fallo regenerativo asociado a la cirugía. Después de la administración exógena de VEGFA en animales esteatóticos, el VEGFA circulante es secuestrado por los altos niveles de circulación de sFlt1 liberado por el tejido adiposo. En tales condiciones, el VEGFA no puede alcanzar el hígado esteatótico para ejercer sus efectos. En consecuencia, se requirió la administración concomitante de VEGFA y un anticuerpo anti-sFlt1 para secuestrar el sFlt1 y evitar la unión de sFlt1 a VEGFA. Este efecto se asoció con altos niveles de VEGFA en hígados esteatósicos y protección frente al daño y fallo en la regeneración, además de una mejora en la tasa de supervivencia. Los efectos protectores de la combinación de VEGFA con el anticuerpo anti-sFlt1 se asociaron a una activación de la vía de señalización PI3K/Akt y su acción se ejerció independientemente de la vía Id1-Wnt2.

El estudio actual establece los diferentes efectos y vías de señalización de VEGFA en la cirugía del hígado que requieren PH bajo oclusión vascular según el tipo de hígado.



Relevance of VEGFA in rat livers subjected to partial hepatectomy under ischemia-reperfusion

Esther Bujaldon¹ · María Eugenia Cornide-Petronio¹ · José Gulfo² · Floriana Rotondo¹ · Cindy Ávalos de León¹ · Elsa Negrete-Sánchez¹ · Jordi Gracia-Sancho³ · Anna Novials^{4,5} · Mónica B. Jiménez-Castro⁶ · Carmen Peralta Uroz^{1,2,7}

Received: 14 November 2018 / Revised: 13 May 2019 / Accepted: 6 June 2019
© The Author(s) 2019

Abstract

We examined the effects of VEGFA on damage and regeneration in steatotic and non-steatotic livers of rats submitted to PH under I/R, and characterized the underlying mechanisms involved. Our results indicated that VEGFA levels were decreased in both steatotic and non-steatotic livers after surgery. The administration of VEGFA increased VEGFA levels in non-steatotic livers, reducing the incidence of post-operative complications following surgery through the VEGFR2-Wnt2 pathway, independently of Id1. Unexpectedly, administration of VEGFA notably reduced VEGFA levels in steatotic livers, exacerbating damage and regenerative failure. After exogenous administration of VEGFA in steatotic animals, circulating VEGFA is sequestered by the high circulating levels of sFlt1 released from adipose tissue. Under such conditions, VEGFA cannot reach the steatotic liver to exert its effects. Consequently, the concomitant administration of VEGFA and an antibody against sFlt1 was required to avoid binding of sFlt1 to VEGFA. This was associated with high VEGFA levels in steatotic livers and protection against damage and regenerative failure, plus improvement in the survival rate via up-regulation of PI3K/Akt independently of the Id1-Wnt2 pathway. The current study highlights the different effects and signaling pathways of VEGFA in liver surgery requiring PH and I/R based in the presence of steatosis.

Key messages

- VEGFA administration improves PH+I/R injury only in non-steatotic livers of Ln animals.
- VEGFA benefits are exerted through the VEGFR2-Wnt2 pathway in non-steatotic livers.
- In Ob rats, exogenous VEGFA is sequestered by circulating sFlt1, exacerbating liver damage.
- Therapeutic combination of VEGFA and anti-sFlt1 is required to protect steatotic livers.
- VEGFA+anti-sFlt1 treatment protects steatotic livers through a VEGFR2-PI3K/Akt pathway.

Esther Bujaldon and María Eugenia Cornide-Petronio EB and MECP contributed equally to this work (as first author)

Mónica B. Jiménez-Castro and Carmen Peralta MJC and CP contributed equally to this work (as last author)

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00109-019-01811-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Carmen Peralta Uroz
cperalta@clinic.ub.es

¹ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain

³ Liver Vascular Biology Research Group, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain

⁴ Diabetes and Obesity Research Laboratory, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

⁵ Spanish Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Barcelona, Spain

⁶ Transplant Biomedicals S.L., Barcelona, Spain

⁷ Facultat de Medicina, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

Published online: 29 June 2019

Springer

Keywords Ischemia-reperfusion · Vascular endothelial growth factor A · Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 · Liver · Steatosis · Adipose tissue

Introduction

In clinical situations, partial hepatectomy (PH) under ischemia/reperfusion (I/R) is a common strategy to control bleeding during parenchymal dissection [1]. More than 20% of patients destined for liver resection present some degree of steatosis, a condition usually related to obesity [1–3], and the prevalence of steatosis is constantly increasing in society. Importantly, hepatic steatosis represents a major risk factor for liver surgery, being associated with high rates of complications and postoperative mortality after major liver resection [1, 4, 5].

A number of experimental studies on PH without I/R in steatotic and non-steatotic livers have shown that vascular endothelial growth factor A (VEGFA) levels are increased after surgery and that infusion of VEGFA can reduce injury and increase hepatocyte proliferation [6–9]. Furthermore, protective effects on damage have been reported regarding the role of VEGFA in non-steatotic livers in experimental models of I/R without PH [10, 11].

A number of studies have shown that VEGF receptor-2 (VEGFR2) is the principal mediator of several physiological and pathological effects of VEGFA [12–17]. It has also been shown that in non-steatotic livers undergoing PH without I/R, VEGFR2 activation is induced, initiating Id1 up-regulation and secretion of Wnt2 angiocrine factor [7]. Recent studies have suggested an important role of Wnt2 signaling in the proliferative response in non-steatotic livers undergoing I/R without PH [18].

As mentioned above, the role of VEGFA has been evaluated in PH without I/R and in I/R without PH, mainly focusing on non-steatotic livers. Nevertheless, the effect of VEGFA on liver regeneration and damage in conditions of PH under I/R has not been investigated. This scenario is addressed in the present study since PH under I/R is commonly used in the clinical practice to control bleeding during parenchymal dissection. We postulated that the expression and role of VEGFA as well as the mechanisms by which VEGFA might affect damage or regeneration might differ depending on the hepatic surgical conditions as well as the presence or absence of steatosis in the liver submitted to surgery. Consequently, strategies aimed at protecting the liver during surgery might be specific for each surgical procedure and for steatotic and non-steatotic livers.

Herein we examined VEGFA levels in rat steatotic and non-steatotic livers undergoing PH under I/R. We also investigated whether modulating the actions of VEGFA could protect both steatotic and non-steatotic livers against damage and regenerative failure following surgery. Finally, we investigated whether

the VEGFR2-Id1-Wnt2 pathway is involved in the underlying action mechanisms of VEGFA in both steatotic and non-steatotic livers in an experimental model of PH under vascular occlusion, a liver surgery setting of potential clinical and scientific interest. In our opinion, the use of experimental surgical models that resemble as much as possible the clinical conditions in which the strategy is intended to be applied will lead to the translation of those strategies to clinical practice in the short term.

Material and methods

Experimental animals

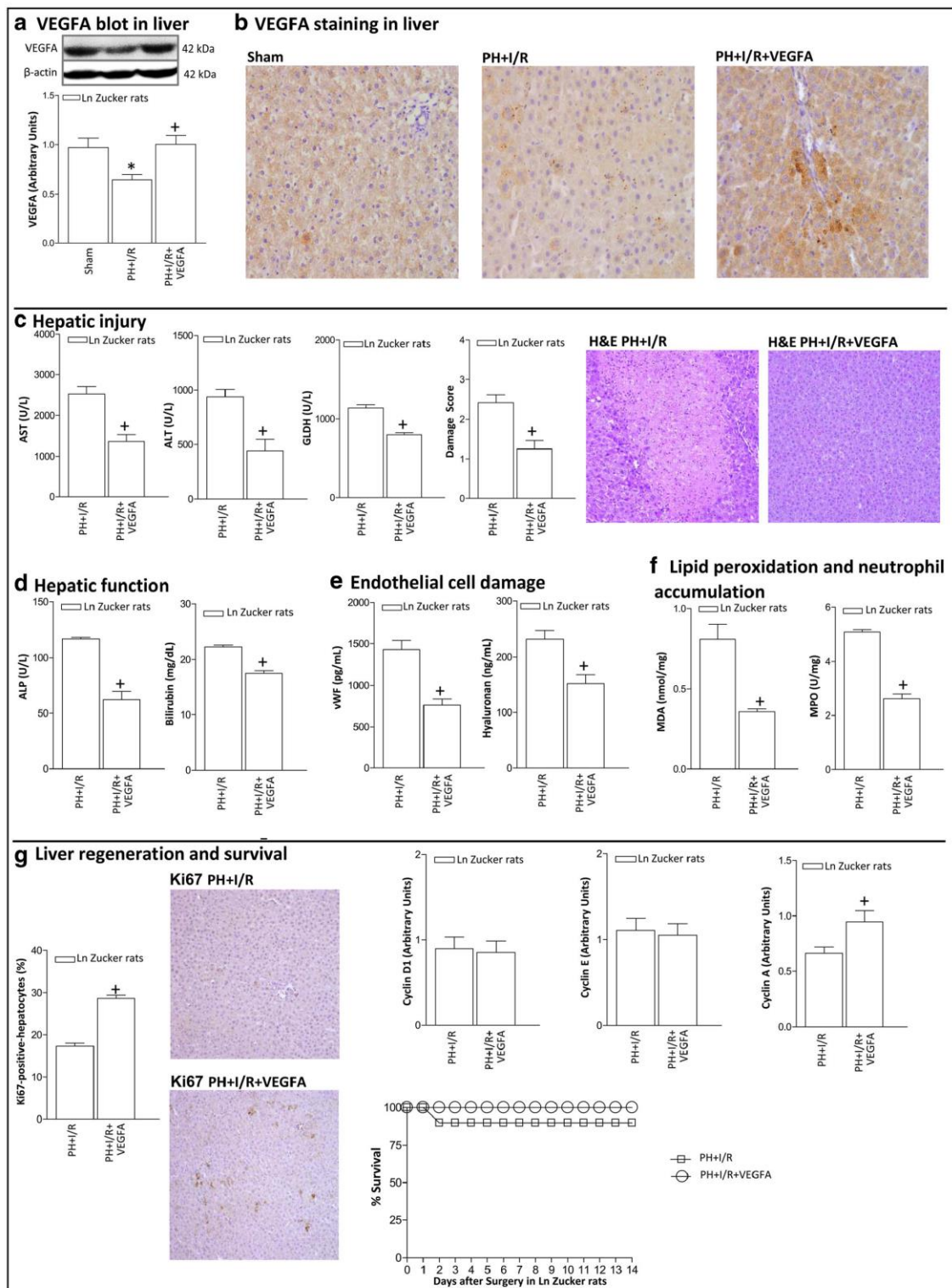
Male homozygous obese (Ob) (400–450 g) and heterozygous lean (Ln) Zucker rats (350–400 g) and male Sprague Dawley (SD) and choline-deficient SD (CDD-SD) rats (350–380 g) were used. Ob Zucker and CDD-SD rats showed severe macrovesicular and microvesicular fatty infiltration in hepatocytes (60–70% steatosis) [19, 20].

Experimental groups

Protocol 1. VEGFA impact and availability in Ln and Ob Zucker rats undergoing PH+I/R

- 1) Sham group (6 Ln and 6 Ob Zucker rats). Hepatic hilar vessels of animals were dissected.
- 2) PH+I/R group (6 Ln and 6 Ob Zucker rats). Animals underwent partial hepatectomy (70%) under 60 min of ischemia [1, 20, 21].
- 3) PH+I/R+VEGFA group (6 Ln and 6 Ob Zucker rats). As in group 2, but treated with VEGFA (5 µg/kg i.v.) [6].
- 4) PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1 group (6 Ob Zucker rats). As in group 3, but treated with an antibody against soluble

Fig. 1 VEGFA protein levels and effects of VEGFA administration on hepatic damage and function, liver regeneration 24 h after surgery, and survival rate in Ln Zucker rats. **A** Protein levels of VEGFA in liver. Representative Western blots at the top and densitometric analysis at the bottom. **B** Representative photomicrographs of VEGFA immunohistochemical positivity in liver ($\times 20$). **C** Hepatic injury (plasma AST, ALT, and GLDH levels; damage score and representative photomicrographs of necrosis (H&E stain, $\times 10$)). **D** Hepatic function (ALP and bilirubin levels). **E** Endothelial cell damage (vWF and HA levels). **F** Lipid peroxidation (MDA levels) and neutrophil accumulation (MPO levels). **G** Hepatic regeneration (percentage of Ki67-positive-hepatocytes and representative photomicrographs of Ki67 immunohistochemical positivity ($\times 10$); cyclin D1, E, and A levels). Survival of Ln Zucker animals was monitored (postoperative day 14) (**G**). * $P < 0.05$ versus sham; + $P < 0.05$ versus PH+I/R



VEGF receptor-1 (sVEGFR1; also known as sFlt1) (0.6 mg/kg i.v.) [22].

soluble VEGF receptor-1 (sVEGFR1; also known as sFlt1) (0.6 mg/kg i.v.) [22].

Protocol 2. Role of adipose tissue in the circulating sFlt1 levels in Ln and Ob Zucker rats undergoing PH+I/R

- 5) Sham+LPT group (6 Ln and 6 Ob Zucker rats). Same as group 1, but mesenteric, perirenal, retroperitoneal, and epididymal adipose tissue were resected and extracted [1].
- 6) PH+I/R+LPT group (6 Ln and 6 Ob Zucker rats). Same as group 2, but mesenteric, perirenal, retroperitoneal, and epididymal adipose tissue were resected and extracted before starting PH+I/R [1].
- 7) PH+I/R+LPT+VEGFA group (6 Ln and 6 Ob Zucker rats). Same as group 3, but mesenteric, perirenal, retroperitoneal, and epididymal adipose tissue were resected and extracted before starting PH+I/R [1].

Protocol 3. Underlying mechanisms of VEGFA in Ln and Ob Zucker rats undergoing PH+I/R

- 8) PH+I/R+VEGFA+anti-VEGFR2 group (6 Ln Zucker rats). As in group 3, but treated with ZD6474, a potent inhibitor of VEGFR2 (2.5 mg/kg i.v.) [23].
- 9) PH+I/R+Wnt2 group (6 Ln Zucker rats). As in group 2, but treated with Wnt2 (5 ng/kg, i.v.) [24].
- 10) PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1+anti-VEGFR2 group (6 Zucker Ob rats). As in group 4, but treated with ZD6474, a potent inhibitor of VEGFR2 (2.5 mg/kg i.v.) [23].
- 11) PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1+PI3K/Akt-inh group (6 Ob Zucker rats). As in group 4, but treated with LY294002, a potent inhibitor of Akt (0.5 mg/kg i.p.), and Wortmannin, a potent inhibitor of PI3K (1 mg/kg i.p.) [25].

Protocol 4. VEGFA impact and availability in SD and CDD-SD rats undergoing PH+I/R

- 12) Sham group (6 SD and 6 CDD-SD rats). Hepatic hilar vessels of animals were dissected.
- 13) PH+I/R group (6 SD and 6 CDD-SD rats). Animals underwent partial hepatectomy (70%) under 60 min of ischemia following the same surgical procedure as in group 2 of protocol 1 [1, 20, 21].
- 14) PH+I/R+VEGFA group (6 SD and 6 CDD-SD rats). As in group 13, but treated with VEGFA (5 µg/kg i.v.) [6].
- 15) PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1 group (6 CDD-SD rats). As in group 14, but treated with an antibody against

The sample collection and the measurements for protocols 1–4 at the corresponding reperfusion times are shown in Online Resource 1.

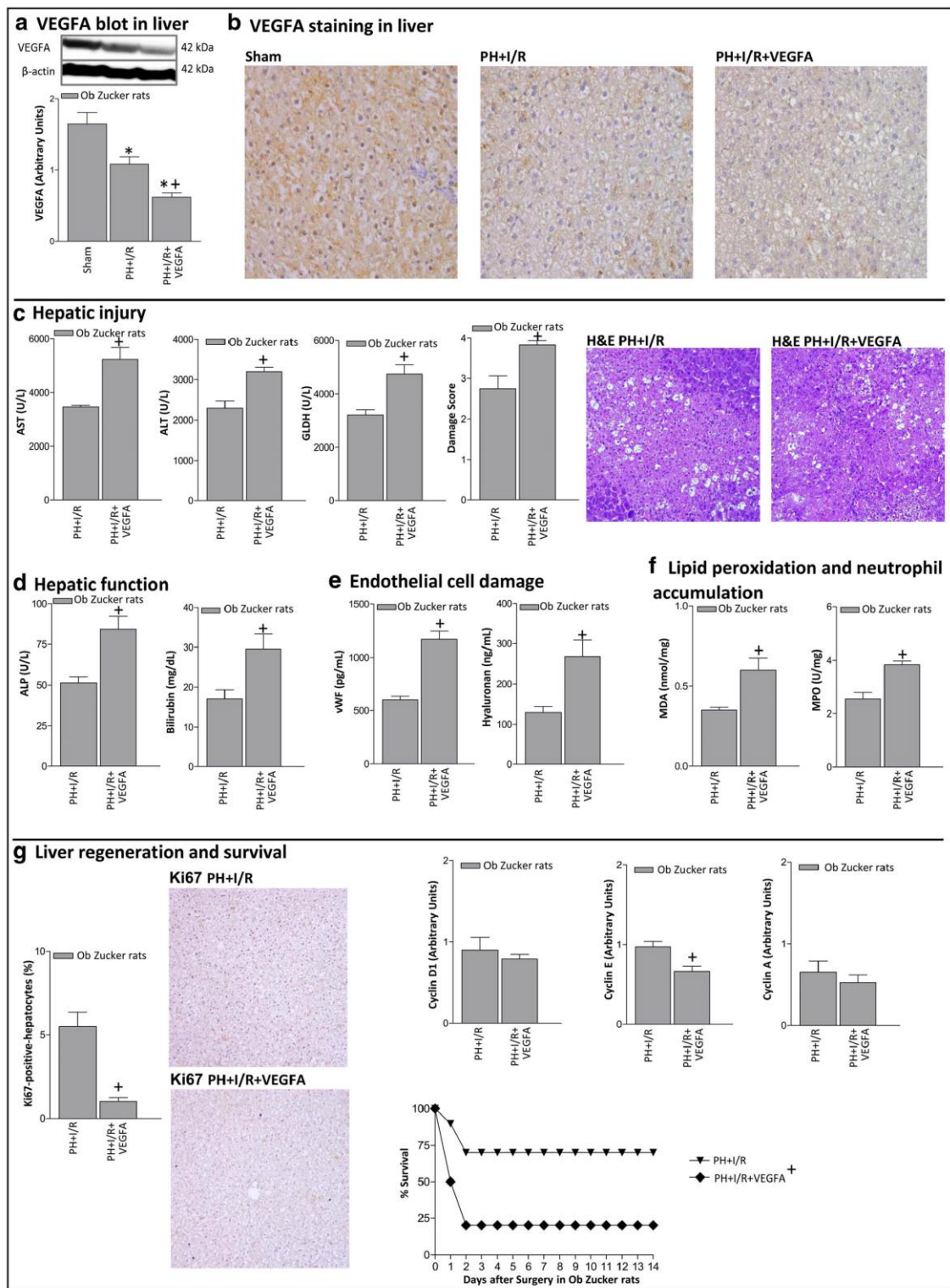
Results

VEGFA impact in Ln and Ob Zucker rats undergoing PH+I/R

In Ln Zucker animals, hepatic VEGFA protein levels were decreased in the PH+I/R group compared to those of the Sham group, as demonstrated by VEGFA immunoblot (Fig. 1A) and immunohistochemistry (Fig. 1B). Administration of VEGFA in Ln animals (PH+I/R+VEGFA group) increased hepatic VEGFA levels compared with the PH+I/R group (Fig. 1A). Accordingly, PH+I/R+VEGFA in non-steatotic livers exhibited higher VEGFA immunohistochemical staining in both hepatocytes and in non-parenchymal cells than that found in the PH+I/R group (Fig. 1B). VEGFA administration (PH+I/R+VEGFA group) protected against hepatic damage as indicated by the reduced transaminases, GLDH, damage score values, and the extent and number of necrotic areas in non-steatotic livers when compared with the PH+I/R group (Fig. 1C). Liver function (measured as ALP and bilirubin levels) and endothelial cell damage (measured by vWF and HA levels) were reduced by VEGFA treatment (Figs. 1D–E). This was associated with a reduction in oxidative stress and neutrophil accumulation (Fig. 1F).

In terms of liver regeneration, the administration of VEGFA (PH+I/R+VEGFA group) increased the percentage of Ki67-positive-hepatocytes in non-steatotic livers (Fig. 1G). The effect of VEGFA on the progression of the cellular cycle was also examined. The levels of cyclin D1, which is necessary for G1 phase progression [26], and cyclin E, which is induced during G1 and mediates transition into the S phase

Fig. 2 VEGFA protein levels and effects of VEGFA administration on hepatic damage and function, liver regeneration 24 h after surgery, and survival rate in Ob Zucker rats. **A** Protein levels of VEGFA in liver. Representative Western blots at the top and densitometric analysis at the bottom. **B** Representative photomicrographs of VEGFA immunohistochemical positivity in liver ($\times 20$). **C** Hepatic injury (plasma AST, ALT, and GLDH levels; damage score and representative photomicrographs of necrosis ($\times 10$)). **D** Hepatic function (ALP and bilirubin levels). **E** Endothelial cell damage (vWF and HA levels). **F** Lipid peroxidation (MDA levels) and neutrophil accumulation (MPO levels). **G** Hepatic regeneration (percentage of Ki67-positive-hepatocytes and representative photomicrographs of Ki67 immunohistochemical positivity ($\times 10$); cyclin D1, E, and A levels). Survival of Ob Zucker animals was monitored (postoperative day 14) (G). * $P < 0.05$ versus sham; + $P < 0.05$ versus PH+I/R



[27] were unchanged in non-steatotic livers of the PH+I/R+VEGFA group with respect to those of the PH+I/R group (Fig. 1G). However, hepatic cyclin A expression, which is necessary for S phase progression [28], was higher in non-steatotic livers of the PH+I/R+VEGFA group when compared with the PH+I/R group (Fig. 1G). The administration of VEGFA (PH+I/R+VEGFA group) reduced lethality in Ln animals when compared with the PH+I/R group (Fig. 1G).

In Ob Zucker animals, reductions in hepatic VEGFA levels were observed in steatotic livers of the PH+I/R when compared with the Sham group (Figs. 2A–B). Unexpectedly, administration of VEGFA in Ob Zucker animals (PH+I/R+VEGFA group) further reduced hepatic VEGFA levels in steatotic livers compared with the PH+I/R group (Figs. 2A–B). With regard to hepatic damage, the administration of

VEGFA in steatotic livers (PH+I/R+VEGFA group) increased transaminases, GLDH, ALP, and bilirubin (Figs. 2C–D). This was associated with high levels of both vWF and HA (Fig. 2E), exacerbated oxidative stress, and neutrophil accumulation (Fig. 2F). This increased the damage score, extending the necrotic areas ordinarily seen after PH+I/R (Fig. 2C). The number of Ki67-positive hepatocytes and cyclin E levels in steatotic livers of the PH+I/R+VEGFA group were lower than in the PH+I/R group (Fig. 2G). These deleterious effects of VEGFA on hepatic damage and regenerative failure in Ob Zucker rats were also observed 72 h after surgery (Online Resource 2). However, the administration of VEGFA (PH+I/R+VEGFA group) reduced the survival rate in Ob Zucker animals at 14 days when compared with the results of the PH+I/R group (Fig. 2G).

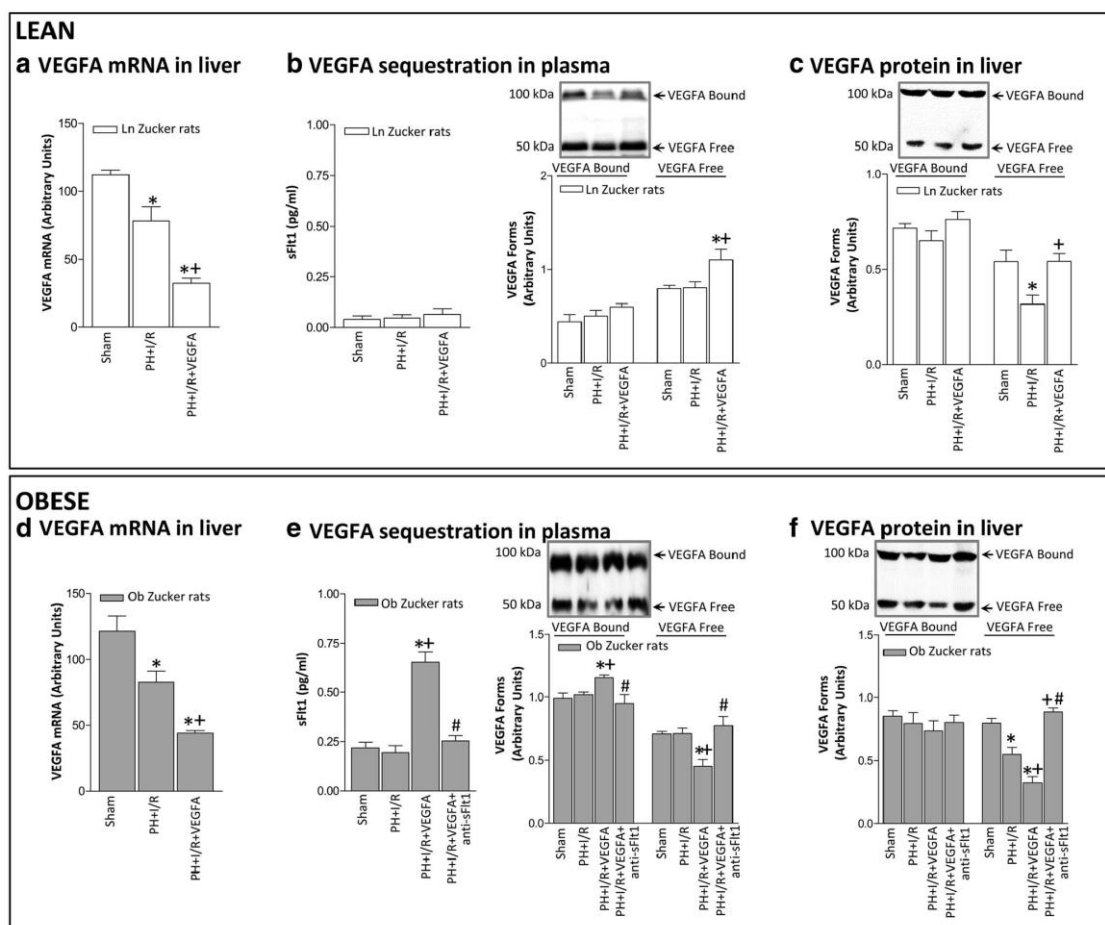


Fig. 3 VEGFA availability in Ln and Ob Zucker rats 24 h after surgery. **A** Hepatic mRNA VEGFA in non-steatotic livers. **B** Plasma levels of sFlt1 and the bound and free forms of VEGFA in Ln Zucker animals. **C** Hepatic protein levels of VEGFA in non-steatotic livers. **D** Hepatic mRNA

VEGFA in steatotic livers. **E** Plasma levels of sFlt1 and the bound and free forms of VEGFA in Ob Zucker animals. **F** Hepatic protein levels of VEGFA in steatotic livers. * $P < 0.05$ versus sham; + $P < 0.05$ versus PH+I/R; # $P < 0.05$ versus PH+I/R+VEGFA

Relevance of VEGFA availability in Ln and Ob Zucker rats undergoing PH+I/R

We next try to explain why, in contrast to non-steatotic livers, the administration of VEGFA reduced VEGFA levels in steatotic livers when compared with the PH+I/R group (Fig. 3). One hypothesis involved a reduction in VEGFA synthesis in steatotic livers compared with non-steatotic livers. However, this did not seem to be the case.

Indeed, our results indicated that VEGFA administration (PH+I/R+VEGFA group) reduced mRNA levels of VEGFA in both non-steatotic and steatotic livers when compared with the PH+I/R group, being its mRNA expression comparable in non-steatotic (Fig. 3A) and steatotic (Fig. 3D) livers ($P > 0.05$, not significant). Since sFlt1 is capable of sequestering and thus determining the circulating levels of VEGFA, and thereby preventing its signal transduction [29–31], and considering that plasma sFlt1

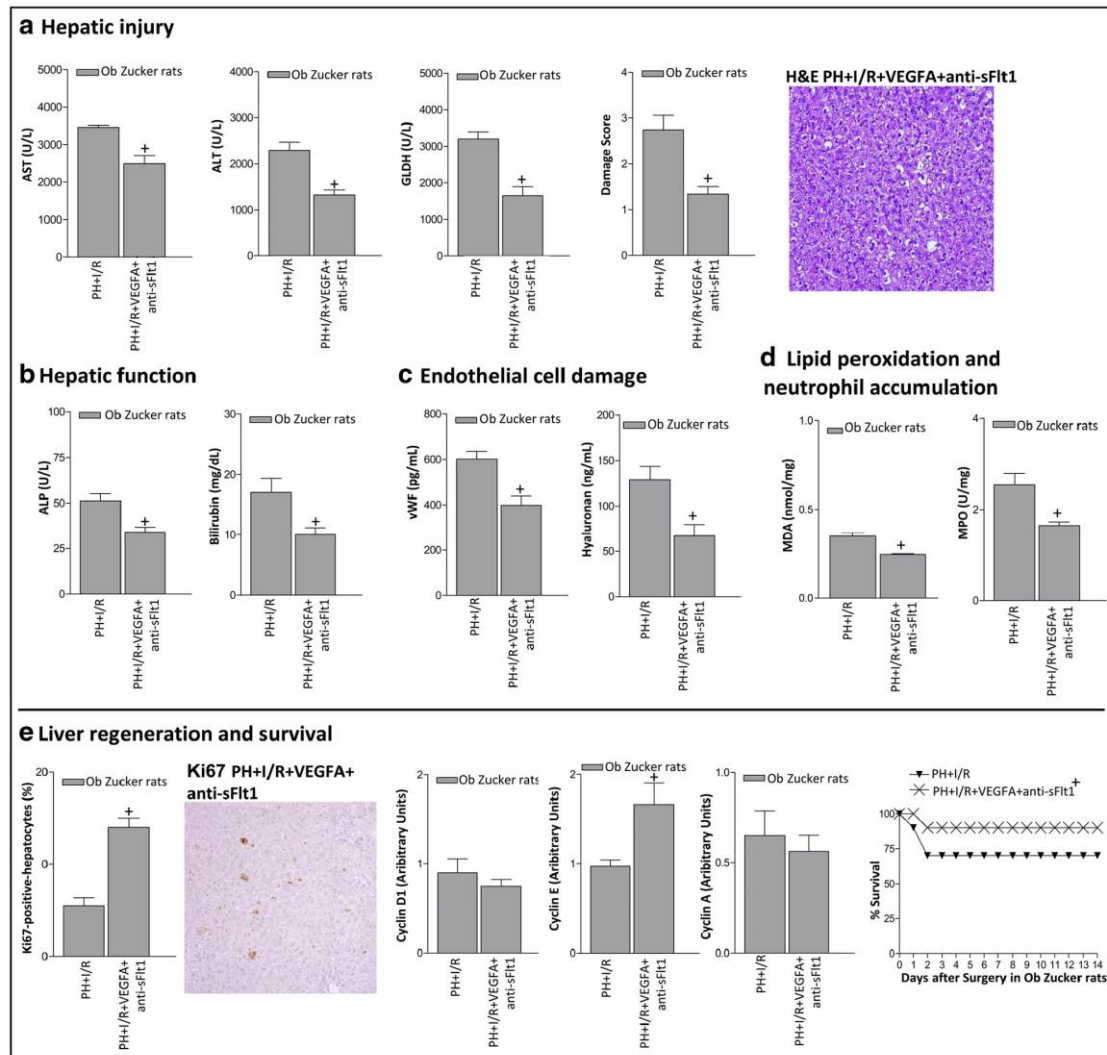


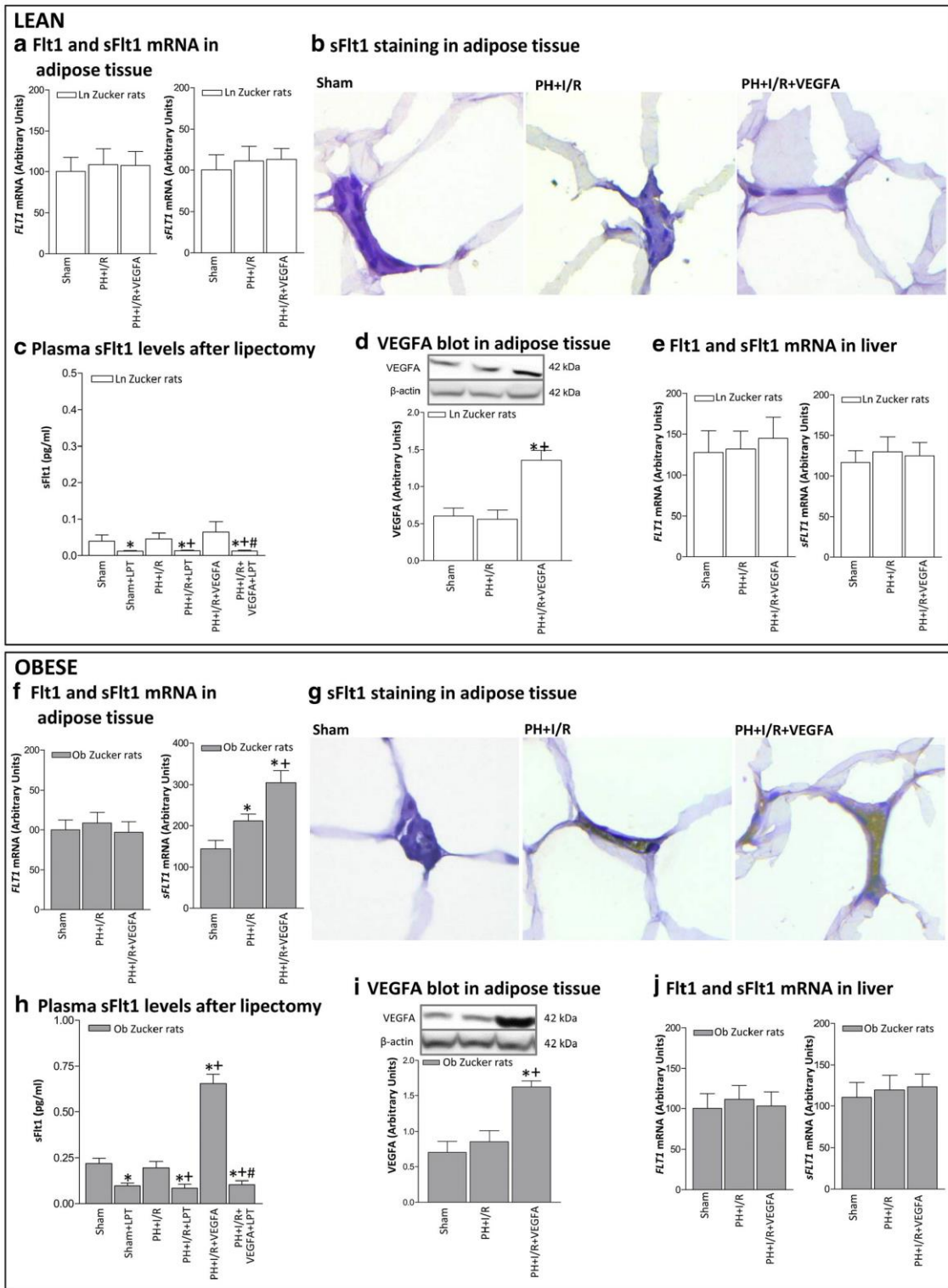
Fig. 4 Effects of the concomitant administration of VEGFA and antibodies against anti-sFlt1 on hepatic damage and regeneration 24 h after surgery and survival rate in Ob Zucker rats. **A** Hepatic injury (plasma AST, ALT, and GLDH levels; damage score and representative photomicrograph of necrosis ($\times 10$)). **B** Hepatic function (ALP and bilirubin levels). **C** Endothelial function (vWF and HA levels). **D** Lipid peroxidation (MDA levels) and neutrophil accumulation (MPO levels). **E** Hepatic regeneration (percentage of Ki67 positive-hepatocytes and representative photomicrograph of Ki67 immunohistochemical positivity ($\times 10$); cyclin D1, E, and A levels). Survival of Ob Zucker animals was monitored (postoperative day 14) (**E**). $+P < 0.05$ versus PH+I/R

levels are elevated in different liver diseases [32, 33], an attempt was made to discern whether the differences in VEGFA levels in non-steatotic and steatotic livers resulting from the exogenous administration of VEGFA may be explained, at least partially by potential differences in the circulating levels of sFlt1. We hypothesized that after exogenous administration of VEGFA in Ob Zucker animals, circulating VEGFA is sequestered by sFlt1 and consequently VEGFA cannot reach the liver to exert its effects. Firstly, we measured plasma levels of sFlt1 and VEGFA corresponding to bound forms (100–130 kDa) and free forms (45–50 kDa). Of note, plasma sFlt1 levels in the PH+I/R group were lower in Ln than in Ob Zucker animals (Fig. 3B, E). The administration of VEGFA in Ln Zucker animals (PH+I/R+VEGFA group) did not induce changes in either circulating sFlt1 or circulating VEGFA corresponding to the bound form when compared with the PH+I/R group (Fig. 3B). However, the level of circulating free VEGFA was higher in Ln animals of the PH+I/R+VEGFA group when compared with the PH+I/R group (Fig. 3B). This was associated with high VEGFA-free form levels in non-steatotic livers (Fig. 3C). In Ob Zucker animals, the administration of VEGFA (PH+I/R+VEGFA group) increased circulating sFlt1 when compared with the PH+I/R group (Fig. 3E). Under these conditions, the circulating VEGFA bound was higher whereas the circulating VEGFA free form was lower than in the PH+I/R group (Fig. 3E). This was associated with reduced VEGFA levels in steatotic livers (Fig. 3F). To reinforce our hypothesis based on the VEGFA-sFlt1 complex, further experiments were carried out. We co-administered VEGFA with an antibody against sFlt1 (PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1 group) to avoid binding of sFlt1 to VEGFA. Under these conditions, VEGFA should reach the liver to exert its effects. Interestingly, our results indicated that Ob Zucker animals in the PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1 group exhibited reduced plasma levels of VEGFA bound form and increased plasma levels of the free form when compared with the results of the PH+I/R+VEGFA group (Fig. 3E). Of interest, the PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1 group exhibited higher levels of VEGFA free form in steatotic livers than those of the PH+I/R+VEGFA group (Fig. 3F). Importantly, under these conditions, VEGFA did confer protection in steatotic livers. Indeed, the PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1 group showed reduced hepatic injury and improved liver functionality and survival rate when compared with the PH+I/R group (Fig. 4A–E). Likewise, Ki67-positive hepatocytes showed significant increase, associated with high cyclin E levels (Fig. 4E). Thus, the blockade of sFlt1 action in Ob Zucker animals treated with VEGFA (PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1 group) allowed VEGFA to reach the liver and consequently to protect steatotic livers against damage and regenerative failure.

Role of adipose tissue in the circulating sFlt1 levels in Ln and Ob Zucker rats undergoing PH+I/R

Given our results indicating that plasma sFlt1 levels were lower in Ln than in Ob Zucker rats and in view of previous reports indicating that obesity impairs adipocyte function and secretion of mediators derived from adipose tissue to circulation [34–36], we next evaluated the potential contribution of adipose tissue in the circulating sFlt1 levels in Ln and Ob Zucker rats undergoing PH+I/R (Fig. 5). Thus, in Ln animals, Flt1 and sFlt1 levels in adipose tissue of the PH+I/R group were similar to those of the Sham group, as demonstrated by mRNA expression (Fig. 5A) and immunohistochemistry analysis (Fig. 5B). In Ob animals, the PH+I/R group exhibited sFlt1 immunohistochemical positivity in stromal space of adipose tissue and higher mRNA levels of sFlt1 in adipose tissue than those of the Sham group, whereas Flt1 levels were unchanged (Fig. 5F, G). Next, Ln and Ob animals were submitted to interventions based on the elimination of peripheral adipose store, and the levels of circulating sFlt1 were evaluated. Removal of the peripheral adipose tissue in Ln and Ob animals of the Sham and PH+I/R group (Sham+LPT and PH+I/R+LPT) lowered plasma sFlt1 levels (Fig. 5C, H). As in the case of circulating sFlt1, the sFlt1 levels in adipose tissue of the Sham and PH+I/R groups were lower in Ln than in Ob animals (Fig. 5A, F). In Ln animals, VEGFA administration (PH+I/R+VEGFA group) reached the adipose tissue since VEGFA levels rose compared with the PH+I/R group (Fig. 5D) but did not induce changes in either adipose tissue or circulating sFlt1 levels (Figs. 5A–C). This scenario was different in the case of Ob animals, since VEGFA administration (PH+I/R+VEGFA group) reached the adipose tissue (Fig. 5I) and increased sFlt1 as shown by the increases in both the mRNA expression of sFlt1 levels

Fig. 5 Role of adipose tissue in the circulating sFlt1 levels in Ln and Ob Zucker rats 24 h after surgery. **A** mRNA expression levels of Flt1 and sFlt1 in adipose tissue of Ln Zucker animals. **B** Representative photomicrographs of Flt1 immunohistochemical negativity in adipocyte membranes and sFlt1 immunohistochemical negativity in stromal space of adipose tissue of Ln Zucker animals ($\times 40$). **C** Plasma sFlt1 levels in Ln Zucker animals subjected to lipectomy. **D** Protein levels of VEGFA in adipose tissue of Ln Zucker animals. Representative Western blots at the top and densitometric analysis at the bottom. **E** mRNA expression levels of Flt1 and sFlt1 in liver of Ln Zucker animals. **F** mRNA expression levels of Flt1 and sFlt1 in adipose tissue of Ob animals. **G** Representative photomicrographs of Flt1 immunohistochemical negativity in adipocyte membranes in all groups and sFlt1 immunohistochemical positivity in stromal space of adipose tissue only in PH+I/R and PH+I/R+VEGFA groups of Ob Zucker animals ($\times 40$). **H** Plasma sFlt1 levels in Ob Zucker animals subjected to lipectomy. **I** Protein levels of VEGFA in adipose tissue of Ob Zucker animals. Representative Western blots at the top and densitometric analysis at the bottom. **J** mRNA expression levels of Flt1 and sFlt1 in liver of Ob Zucker animals. * $P < 0.05$ versus sham; + $P < 0.05$ versus PH+I/R; # $P < 0.05$ versus PH+I/R+VEGFA



(Fig. 5F) and sFlt1 immunohistochemical staining in the stromal space when compared with the PH+I/R group (Fig. 5G). Under these conditions, circulating sFlt1 levels were also increased (Fig. 5H). However, this increase in circulating sFlt1 levels was no longer observed when adipose tissue was removed (PH+I/R+VEGFA+LPT group). Our results confirmed the minor role of the liver in the circulating sFlt1 levels in Ln and Ob animals undergoing PH+I/R since hepatic Flt1 and sFlt1 levels were unchanged in the groups in the study (Sham, PH+I/R and PH+I/R+LPT groups) (Fig. 5E, J).

Underlying mechanisms of VEGFA in Ln and Ob Zucker rats undergoing PH+I/R

Next, we investigated whether the effects of VEGFA on hepatic damage and regenerative response were mediated through the VEGFR2-Id1-Wnt2 pathway. In non-steatotic livers, VEGFR2 levels in the PH+I/R group were lower than those in the Sham group (Fig. 6A). Id1 levels remained unaltered in all groups, whereas this was not the case for Wnt2. Indeed, Wnt2 levels in the PH+I/R group were lower than those in the Sham group (Fig. 6A). The protection against damage and regenerative failure in non-steatotic livers resulting from the administration of VEGFA (PH+I/R+VEGFA group) was associated with increased expression of VEGFR2 and Wnt2 (Fig. 6A). Inhibition of VEGFA action using an antibody against VEGFR2 (PH+VEGFA+anti-VEGFR2 group) abolished the benefits derived from VEGFA in non-steatotic livers resulting in similar Wnt2 levels (Fig. 6A) and parameters of hepatic damage (Figs. 6B–E), regeneration, and survival rate (Fig. 6F) to those of the PH+I/R group. The relevance of Wnt2 to hepatic damage and regenerative response was additionally confirmed demonstrating that recombinant Wnt2 administration (PH+I/R+Wnt2 group) reduced hepatic injury and improved liver regeneration in non-steatotic livers when compared with the PH+I/R group (Fig. 6B–F). The PI3K/Akt pathway has been implicated in the effects of VEGFA in isolated hepatic cells [12]. However, this does not seem to be the case in non-steatotic livers undergoing surgery, since VEGFA administration (PH+I/R+VEGFA and PH+I/R+VEGFA+anti-VEGFR2 groups) was not associated with changes in the protein expression of PI3K/Akt when compared with the PH+I/R group (Fig. 6G).

In steatotic livers, VEGFR2 levels in the PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1 group were increased with respect to those of the PH+I/R group (Fig. 7A). In addition, inhibition of VEGFA action in the PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1 group using antibodies against VEGFR2 (PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1+anti-VEGFR2 group) abolished the protection against hepatic injury and regeneration resulting from the administration of VEGFA+sFlt1 in steatotic livers (Fig. 7B–F). There was no change in either Id1 or Wnt2 when compared with

the results of the PH+I/R or PH+I/R+VEGFA+sFlt1 groups (Fig. 7A). All these results indicate the minor role of the Id1-Wnt2 signaling pathways in the action of VEGFA+anti-sFlt1 in steatotic livers. Importantly, increased PI3K/Akt expression was observed in steatotic livers of the PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1 group when compared with the results of the PH+I/R group (Fig. 7G). The increase in PI3K/Akt expression was abolished when VEGFA was inhibited using an antibody against VEGFR2 (PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1+anti-VEGFR2 group) (Fig. 7G). Moreover, the benefits of VEGFA in the PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1 group were no longer observed when the PI3K/Akt signaling pathway was inhibited (PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1+PI3K/Akt-inh group) (Fig. 7B–F).

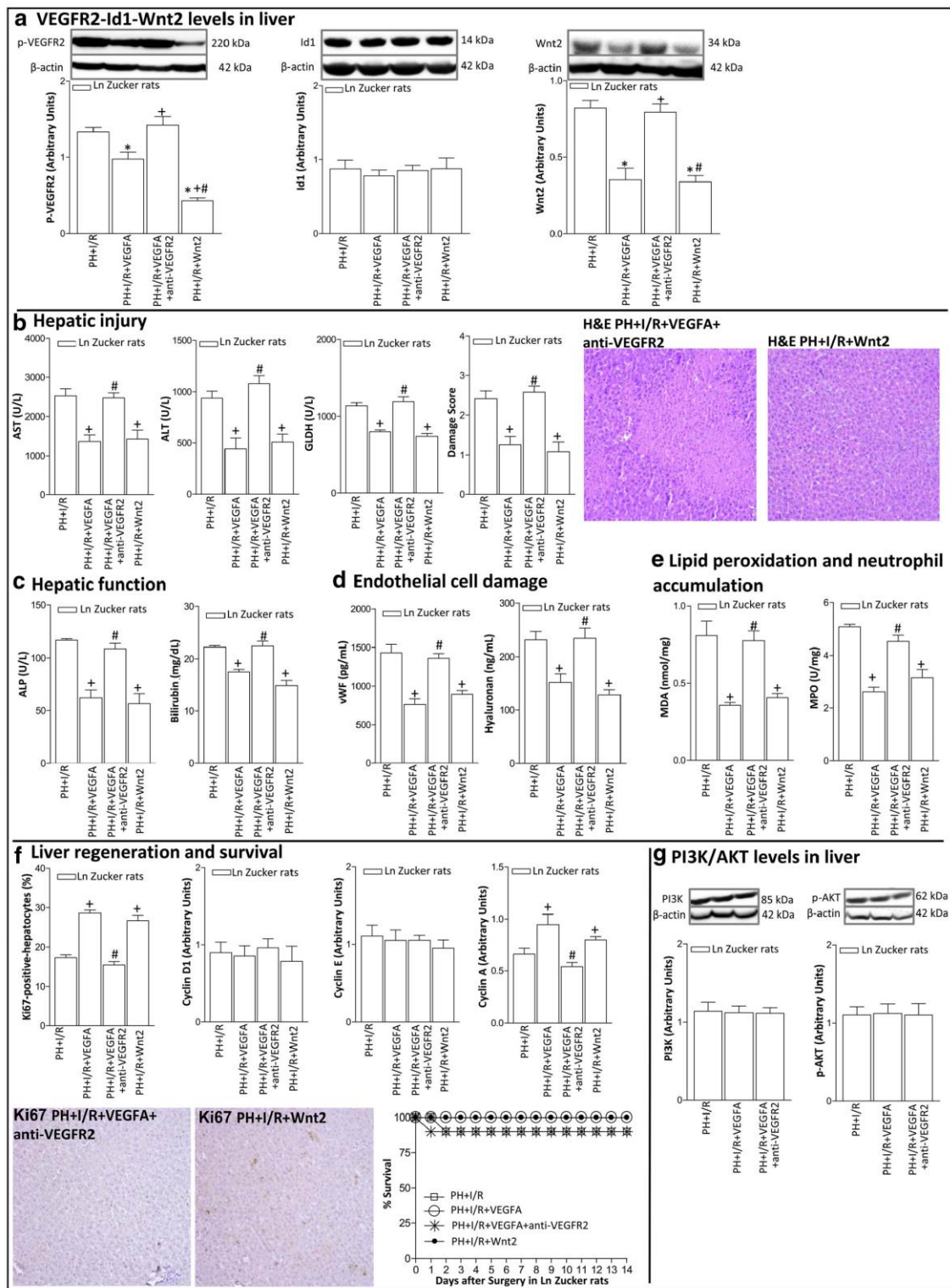
The impact of VEGFA in SD and CDD-SD rats undergoing PH+I/R

As in the genetic obesity model (Zucker rats), in CDD-SD rats, hepatic VEGFA protein levels were lower in the PH+I/R group than in the Sham group (Online Resource 3). In addition, our results revealed an improvement in damage and regenerative process of PH+I/R+VEGFA in non-steatotic livers from SD rats when compared with the PH+I/R group. On the other hand, in steatotic livers from CDD-SD rats, VEGFA administration increased sFlt1 levels in adipose tissue and circulation, and exacerbated hepatic damage and regenerative failure. In CDD-SD rats, the co-administration of VEGFA+anti-sFlt1 was required to confer protection against damage and regenerative failure. The underlying protective mechanisms of VEGFA in an experimental model of steatosis induced by CDD were similar to those described in the genetic obesity model (data not shown).

Discussion

To the best of our knowledge, no previous studies have reported changes in VEGFA levels in both steatotic and non-

Fig. 6 Underlying action mechanisms of VEGFA in non-steatotic livers of Ln Zucker rats 24 h after surgery. **A** Protein levels of VEGFR2, Id1, and Wnt2. Representative Western blots at the top and densitometric analysis at the bottom. **B** Hepatic injury (plasma AST, ALT, and GLDH levels; damage score and representative photomicrographs of necrosis ($\times 10$)). **C** Hepatic function (ALP and bilirubin levels). **D** Endothelial cell damage (vWF and HA levels). **E** Lipid peroxidation (MDA levels) and neutrophil accumulation (MPO levels). **F** Hepatic regeneration (percentage of Ki67 positive-hepatocytes and representative photomicrographs of Ki67 immunohistochemical positivity ($\times 10$); cyclin D1, E, and A levels). **G** Protein levels of PI3K and p-AKT. Representative Western blots at the top and densitometric analysis at the bottom. Survival of Ln Zucker animals, per group was monitored (postoperative day 14) (Fig. 5F). * $P < 0.05$ versus sham; + $P < 0.05$ versus PH+I/R; # $P < 0.05$ versus PH+I/R+VEGFA



steatotic livers submitted to PH under I/R, a procedure commonly applied in surgery to reduce bleeding. Herein, we observed reduced mRNA and protein levels of VEGFA in steatotic and non-steatotic livers. In our study, VEGFA administration exhibited differential effects on damage and regeneration in steatotic and non-steatotic livers. Thus, under PH+I/R conditions, VEGFA administration in Ln Zucker animals increased VEGFA in non-steatotic livers and decreased hepatic injury and regeneration failure. On the other hand, VEGFA administration in Ob Zucker animals undergoing surgery reduced VEGFA levels in steatotic livers and negatively affected damage and regeneration. These effects of VEGFA have also been demonstrated in an experimental model of steatosis induced by CDD.

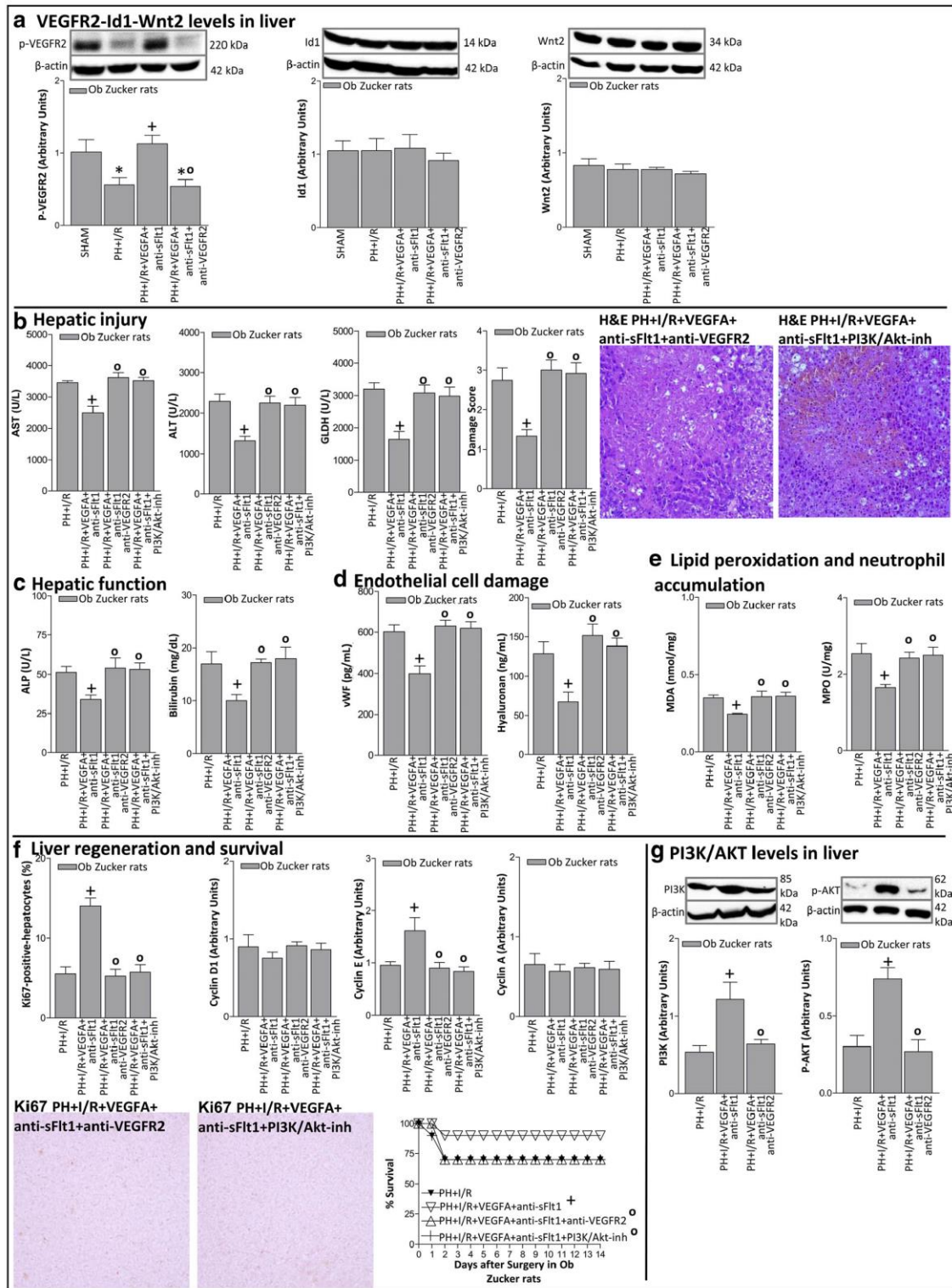
An attempt was made to discern the role of adipose tissue in the circulating sFlt1 levels in Ln and Ob Zucker rats undergoing PH+I/R, for the following reasons: functional differences between lean and obese adipose tissue have been extensively reported [37–39], obesity is associated with oxidative stress and inflammatory response in adipose tissue [40–42], and impairs adipocyte function and secretion of mediators derived from adipose tissue to circulation [34–36]. Our results in Zucker rats indicate the following: (a) adipose sFlt1 levels were higher in Ob than in Ln animals, (b) the increase in adipose tissue sFlt1 levels as consequence of PH+I/R occurred only in Ob animals, and (c) the adipose tissue was involved as a source of circulating sFlt1 levels. VEGFA treatment increased sFlt1 in adipose tissue only in Ob animals, and this resulted in the release of sFlt1 from adipose tissue to the circulation. Thus, we believe that the high levels of circulating sFlt1 (derived from adipose tissue) in Ob Zucker animals undergoing liver surgery sequester exogenous VEGFA, reduce circulating VEGFA bioavailability, and consequently restrict the opportunity for VEGFA to be taken up by the liver and to exert its protective effects [29, 30]. The concomitant administration of VEGFA with an antibody against sFlt1 ensures that the exogenous VEGFA reaches the steatotic liver in order to protect against damage and regenerative failure.

Herein, we report for the first time that the benefits of VEGFA in non-steatotic livers in the event of PH were maintained when implementing vascular occlusion, which increases our knowledge about the applicability of this growth factor [6, 7, 9]. However, it is important to denote that the effects of VEGFA on the VEGFR2-Id1-Wnt2 pathway in non-steatotic livers subjected to PH were dependent on the presence or absence of vascular occlusion. In fact, in previous studies [7, 43], Id1 was required to induce Wnt2 activation in non-steatotic livers submitted to PH whereas in our hands, Id1 seemed to play a minor role in damage and regeneration in non-steatotic livers under PH+I/R conditions. The pharmacological regulation of VEGFA or its receptor, VEGFR2, affected the degree of damage and regeneration response in non-steatotic livers under PH+I/R conditions independently of

changes in Id1 expression. Indeed, VEGFA administration in Ln animals (without the induction of changes in Id1 expression) increased Wnt2 in non-steatotic livers and this was associated with improvements in the levels of damage and regeneration. In addition, antibodies against VEGFR2 abolished the beneficial effects of VEGFA on Wnt2, damage, and the regenerative process. Furthermore, similar to that occurring for VEGFA treatment, the administration of Wnt2 decreased hepatic injury and regeneration failure under PH+I/R conditions, resulting in reduced damage and inflammation in non-steatotic livers and improved liver functionality, regeneration, and survival rate. Taken together, our results demonstrate for the first time that the beneficial effects of VEGFA against damage and regenerative failure in non-steatotic livers under PH+I/R conditions are exerted through the VEGFR2-Wnt2 pathway, independently of Id1.

A previous study indicated that the administration of VEGFA protected diet-induced steatotic livers under PH without I/R [8]. On the other hand, our results indicated that VEGFA administration should not be considered as an effective strategy to reduce damage and improve liver regeneration in surgical conditions requiring both liver regeneration and vascular occlusion. Previous results in obese mice with NAFLD indicated that the down-regulation of Wnt2 signaling was associated with the inhibition of hepatocyte proliferation [44, 45]. However, in our study, Wnt2 seemed to play a minor role in steatotic livers under PH+I/R conditions. Indeed, the concomitant administration of VEGFA and anti-sFlt1 (which increased VEGFA availability in the steatotic liver) did not induce changes in either Id1 or Wnt2, whereas the PI3K/Akt pathway was up-regulated. This increase in PI3K/Akt expression was abolished when we inhibited VEGFA using antibodies against VEGFR2, whereas the levels of both Id1 and Wnt2 were unchanged. Indeed, the inhibition of PI3K/Akt pathway abolished the benefits resulting from VEGFA+anti-sFlt1 treatment on damage and regeneration in steatotic livers. Thus, if sFlt1 action is blocked, VEGFA might exert its effects on steatotic livers by activating the PI3K/Akt rather than the Id1-Wnt2 pathway.

Fig. 7 Underlying action mechanisms of VEGFA in steatotic livers of Ob Zucker rats 24 h after surgery. **A** Protein levels of VEGFR2, Id1, and Wnt2. Representative Western blots at the top and densitometric analysis at the bottom. **B** Hepatic injury (plasma AST, ALT, and GLDH levels; damage score and representative photomicrograph of necrosis ($\times 10$)). **C** Hepatic function (ALP and bilirubin levels). **D** Endothelial cell damage (vWF and HA levels). **E** Lipid peroxidation (MDA levels) and neutrophil accumulation (MPO levels). **F** Hepatic regeneration (percentage of Ki67 positive-hepatocytes and representative photomicrograph of Ki67 immunohistochemical positivity ($\times 10$); cyclin D1, E, and A levels). **G** Protein levels of PI3K and p-AKT. Representative Western blots at the top and densitometric analysis at the bottom. Survival of Ob animals, per group was monitored (postoperative day 14) (Fig. 6F). * $P < 0.05$ versus sham; + $P < 0.05$ versus PH+I/R; ° $P < 0.05$ versus PH+I/R+VEGFA+anti-sFlt1



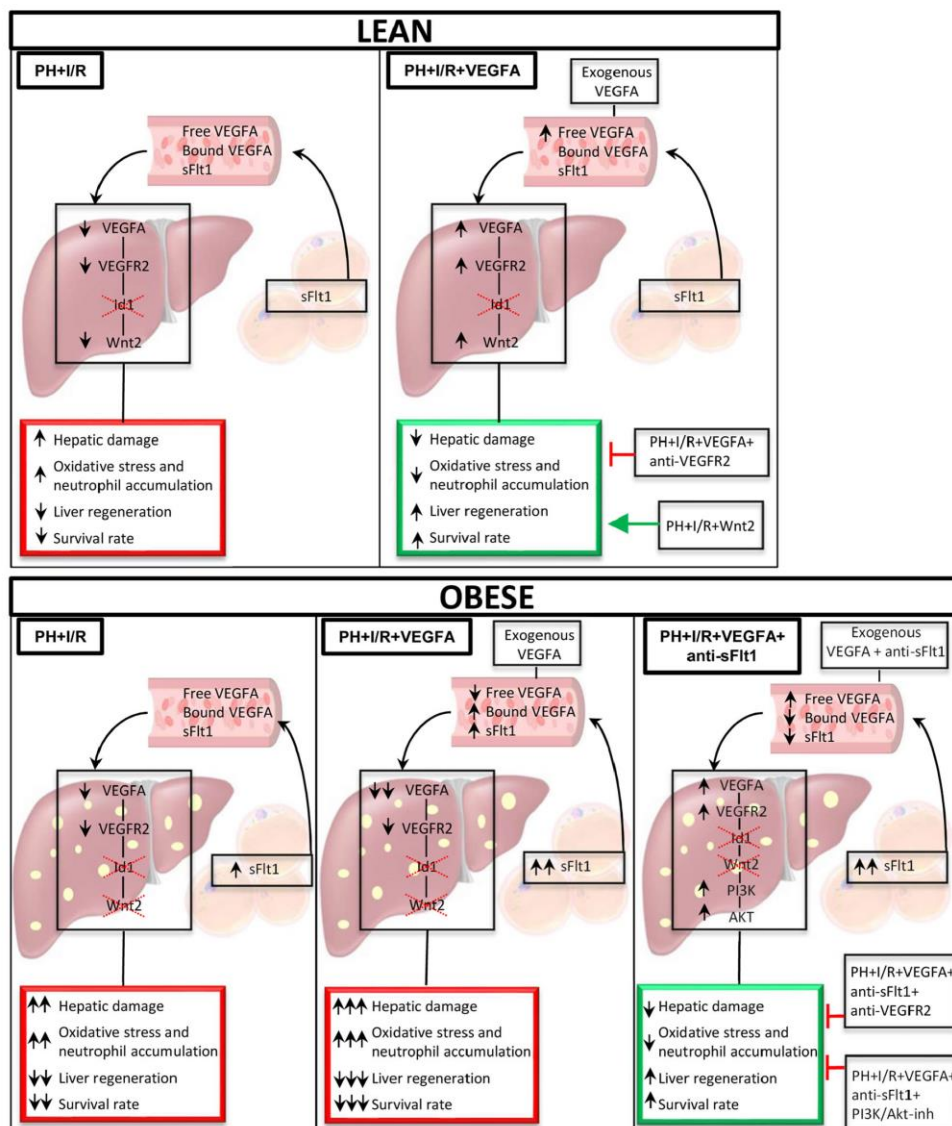


Fig. 8 Schematic representation showing the effects of the different interventions, depicting outcomes and proposed signaling pathways of the current study

Given our experimental results, circulating sFlt1 may determine VEGFA availability and its effects on target organs. Obviously, intensive investigations (which were not part of the present study) will be necessary to determine whether all these experimental results could be extrapolated to clinical practice in liver surgery or in other pathologies. Yilmaz et al. [46] showed that patients with NAFLD have significantly lower serum sFlt1 concentrations than matched controls. On the other hand, Coulon et al. [47] found that serum levels of sFlt1 were significantly higher

in NASH and/or simple steatosis patients compared to controls. The authors indicate that the reason for these different results may lie in the diversity of the patient populations and their clinical characteristics (differences in BMI and inclusion or exclusion of diabetes mellitus patients) or in the differences in laboratory techniques. Indeed, the results reported by Coulon et al. [47] are in line with other papers indicating increases in circulating sFlt1 levels in patients with liver cirrhosis as well as in patients with chronic kidney disease [32, 33, 48].

In conclusion, our experimental results indicate that under PH+I/R conditions, strategies based on treatment with VEGFA alone are probably useful in the attempts to protect non-steatotic livers. However, a pharmacological strategy based on the combination of VEGFA and anti-sFlt1 is required to protect steatotic livers against damage and regenerative failure (Fig. 8). In addition, the present experimental study provides new mechanistic insights into potential therapeutic interventions in the pathology of liver surgery in PH under vascular occlusion, which are also specific for steatotic and non-steatotic livers. These could involve the VEGFA-VEGFR2-Wnt2 pathway for non-steatotic livers and the VEGFA+anti-sFlt1-VEGFR2-PI3K/Akt pathway for steatotic livers.

Acknowledgments MECP has received a Sara Borrell postdoctoral contract from ISCIII, Madrid, Spain, and CGAL is the recipient of a fellowship from CONACYT, México. J Gracia-Sancho received continuous funding from the Instituto de Salud Carlos III (currently FIS P117/00012) & the CIBEREHD, from Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. MBJC also has a contract from EMPLEA Program-MINECO, Madrid, Spain.

Author contributions EB and MECP performed experimental groups, participated in data collection and in biochemical and histological analyses. JG, FR, CAL, and ENS contributed in biochemical and histological analyses and data acquisition. JGS contributed to data analysis/interpretation and critical revision of this article. AN contributed in critical revision of this article. MBJC and CP contributed to the study concept/design, acquisition of experimental data, data analysis/interpretation, and drafting and critical revision of this article. All authors have approved the final manuscript.

Funding information This research was supported by the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MCIU) (RTI2018-095114-B-I00) Madrid, Spain, by the European Union (Fondos Feder, 'una manera de hacer Europa'), by CERCA Program/Generalitat de Catalunya, and by the Secretaria d'Universitats i Recerca (2017SGR-551) Barcelona, Spain.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- McCormack L, Petrowsky H, Jochum W, Furrer K, Clavien PA (2007) Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann Surg* 245:923–930
- Mitchell C, Gilgenkrantz H (2007) Had prometheus known, would he have preferred to be obese? *J Gastroenterol Hepatol* 22:2053–2054
- Nocito A, El-Badry AM, Clavien PA (2006) When is steatosis too much for transplantation? *J Hepatol* 45:494–499
- Veteläinen R, van Vliet A, Gouma DJ, van Gulik TM (2007) Steatosis as a risk factor in liver surgery. *Ann Surg* 245:20–30
- Ramalho FS, Alfany-Fernandez I, Casillas-Ramirez A, Massip-Salcedo M, Serafin A, Rimola A, Arroyo V, Rodés J, Roselló-Catafau J, Peralta C (2009) Are angiotensin II receptor antagonists useful strategies in steatotic and non-steatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion? *J Pharmacol Exp Ther* 329:130–140
- Bockhom M, Goralski M, Prokofiev D, Dammann P, Grünewald P, Trippler M, Biglarnia A, Kamler M, Niehues EM, Frilling A, Broelsch CE, Schlaak JF (2007) VEGF is important for early liver regeneration after partial hepatectomy. *J Surg Res* 138:291–299
- Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z, Mittal V, Kobayashi H, Shido K, Lyden D, Sato TN, Rabbany SY, Rafii S (2010) Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* 468:310–315
- Gu Y, Sowa JP, Paul A, Gerken G, Schlaak JF (2013) Vascular endothelial growth factor improves liver regeneration and survival after 90% hepatectomy in a rat model of diet-induced steatosis. *Digestion* 88:235–242
- Shido K, Chavez D, Cao Z, Ko J, Rafii S, Ding BS (2017) Platelets prime hematopoietic and vascular niche to drive angiocrine-mediated liver regeneration. *Signal Transduct Target Ther* 2. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2016.44>
- Tsurui Y, Sho M, Kuzumoto Y, Hamada K, Akashi S, Kashizuka H, Ikeda N, Nomi T, Mizuno T, Kanehiro H, Nakajima Y (2005) Dual role of vascular endothelial growth factor in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 79:1110–1115
- Tsuchihashi S, Ke B, Kaldas F, Flynn E, Busuttill RW, Briscoe DM, Kupiec-Weglinski JW (2006) Vascular endothelial growth factor antagonist modulates leukocyte trafficking and protects mouse livers against ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 168:695–705
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273:30336–30343
- Takahashi T, Ueno H, Shibuya M (1999) VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 18:2221–2230
- Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM (2002) Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* 200:581–597
- Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, Hägerkvist R, Rahimi N, Matsumoto T, Claesson-Welsh L, Welsh M (2004) The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem* 279:22267–22275
- Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, Berge T, Dimberg A, Magnusson P, Wang L, Wikner C, Qi JH, Wernstedt C, Wu J, Bruheim S, Mugishima H, Mukhopadhyay D, Spurkland A, Claesson-Welsh L (2005) VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis. *EMBO J* 24:2342–2353
- Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ (2007) Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* 19:2003–2012

18. Kuncewitch M, Yang WL, Molmenti E, Nicastro J, Coppa GF, Wang P (2013) Wnt agonist attenuates liver injury and improves survival after hepatic ischemia/reperfusion. *Shock* 39:3–10
19. Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M, Trevisani F, Guerrieri F, Bernardi M, Altomare E (2001) Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 33:808–815
20. Mendes-Braz M, Elias-Miró M, Kleuser B, Fayyaz S, Jiménez-Castro MB, Massip-Salcedo M, Gracia-Sancho J, Ramalho FS, Rodes J, Peralta C (2014) The effects of glucose and lipids in steatotic and non-steatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischaemia-reperfusion. *Liver Int* 34:e271–e289
21. Comide-Petronio ME, Bujaldon E, Mendes-Braz M, Avalos de León CG, Jiménez-Castro MB, Álvarez-Mercado AI, Gracia-Sancho J, Rodés J, Peralta C (2017) The impact of cortisol in steatotic and non-steatotic liver surgery. *J Cell Mol Med* 21:2344–2358
22. Kommareddy S, Amiji M (2007) Antiangiogenic gene therapy with systemically administered sFlt-1 plasmid DNA in engineered gelatin-based nanovectors. *Cancer Gene Ther* 14:488–498
23. Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M, Kendrew J, Chester R, Jackson JA, Boffey SJ, Valentine PJ, Curwen JO, Musgrove HL, Graham GA, Hughes GD, Thomas AP, Stokes ES, Curry B, Richmond GH, Wadsworth PF, Bigley AL, Hennequin LF (2002) ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer Res* 62:4645–4655
24. Launay JM, Mouillet-Richard S, Baudry A, Pietri M, Kellermann O (2011) Raphe-mediated signals control the hippocampal response to SRI antidepressants via miR-16. *Transl Psychiatry* 1:e56
25. Cornide-Petronio ME, Negrete-Sánchez E, Mendes-Braz M, Casillas-Ramírez A, Bujaldon E, Meroño N, Martínez-Carreres L, Gracia-Sancho J, Rodés J, Jiménez-Castro MB, Peralta C (2016) The effect of high-mobility group box 1 in rat steatotic and nonsteatotic liver transplantation from donors after brain death. *Am J Transplant* 16:1148–1159
26. Lim S, Kaldis P (2013) Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140:3079–3093
27. Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J (2009) A hyperfused mitochondrial state achieved at G1/S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:11960–11965
28. Desdouets C, Thoresen GH, Senamaud-Beaufort C, Christoffersen T, Brechot C, Sobczak-Thépot J (1999) cAMP-dependent positive control of cyclin A2 expression during G1/S transition in primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 261:118–122
29. Kendall RL, Wang G, Thomas KA (1996) Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 226:324–328
30. Denizot Y, Leguyader A, Cornu E, Laskar M, Orsel I, Vincent C, Nathan N (2007) Release of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) during coronary artery bypass surgery. *J Cardiothorac Surg* 2:38
31. Aryal B, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Komokata T, Inoue M, Ikeda S, Fukukura Y, Nakamura M, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Imoto Y (2016) A switch in the dynamics of intra-platelet VEGF-A from cancer to the later phase of liver regeneration after partial hepatectomy in humans. *PLoS One* 11:e0150446
32. Jaroszewicz J, Januszkiewicz M, Flisiak R, Rogalska M, Kalinowska A, Wierzbicka I (2008) Circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in patients with liver cirrhosis: possible association with hepatic function impairment. *Cytokine* 44:14–17
33. Salcedo Mora X, Sanz-Cameno P, Medina J, Martín-Vilchez S, García-Buey L, Borque MJ, Moreno-Otero R (2005) Association between angiogenesis soluble factors and disease progression markers in chronic hepatitis C patients. *Rev Esp Enferm Dig* 97:699–706
34. Elias-Miro M, Massip-Salcedo M, Jimenez-Castro M, Peralta C (2011) Does adiponectin benefit steatotic liver transplantation? *Liver Transpl* 17:993–1004
35. Tilg H, Hotamisligil GS (2006) Nonalcoholic fatty liver disease: cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology* 131:934–945
36. Farrell GC (2004) Probing Prometheus: fat fueling the fire? *Hepatology* 40:1252–1255
37. Odegaard JI, Chawla A (2011) Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol* 6:275–297
38. Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, Zhang BB, Bonaldo P, Chua S, Scherer PE (2009) Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol* 29:1575–1591
39. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I (2007) Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocyte gene dysregulation. *Diabetes* 56:901–911
40. Gordon S (2007) Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *J Clin Invest* 117:89–93
41. Wellen KE, Hotamisligil GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115:1111–1119
42. Wellen KE, Hotamisligil GS (2003) Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1785–1788
43. Kambakamba P, Linecker M, Schneider M, Kron P, Limani P, Tschuor C, Ungethüm U, Humar B, Clavien PA (2018) Novel benefits of remote ischemic preconditioning through VEGF-dependent protection from resection-induced liver failure in the mouse. *Ann Surg* 268:885–893
44. Zhou D, Lezmi S, Wang H, Davis J, Banz W, Chen H (2014) Fat accumulation in the liver of obese rats is alleviated by soy protein isolate through β -catenin signaling. *Obesity (Silver Spring)* 22:151–158
45. Clarke JD, Novak P, Lake AD, Shipkova P, Aranibar N, Robertson D, Severson PL, Reily MD, Futscher BW, Lehman-McKeeman LD, Cherrington NJ (2014) Characterization of hepatocellular carcinoma related genes and metabolites in human nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 59:365–374
46. Yilmaz Y, Yonal O, Kurt R, Alahdab YO, Ozdogan O, Celikel CA, Ulukaya E, Imeryuz N, Kalayci C, Avsar E (2011) Circulating levels of vascular endothelial growth factor A and its soluble receptor in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *Arch Med Res* 42:38–43
47. Coulon S, Franque S, Colle I, Verrijken A, Blomme B, Heindryckx F, De Munter S, Prawitt J, Caron S, Staels B, Van Vlierberghe H, Van Gaal L, Geerts A (2012) Evaluation of inflammatory and angiogenic factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine* 59:442–449
48. Di Marco GS, Reuter S, Hillebrand U, Amler S, König M, Larger E, Oberleithner H, Brand E, Pavenstädt H, Brand M (2009) The soluble VEGF receptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol* 20:2235–2245

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

ESM_1

**RELEVANCE OF VEGFA IN RAT LIVERS SUBJECTED TO PARTIAL HEPATECTOMY
UNDER ISCHEMIA-REPERFUSION
JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE**

Esther Bujaldon^{1*}, María Eugenia Cornide-Petronio^{1*}, José Gulfo², Floriana Rotondo¹, Cindy Ávalos de León¹, Elsa Negrete-Sánchez¹, Jordi Gracia-Sancho³, Anna Novials^{4,5}, Mónica B. Jiménez-Castro^{6#}, Carmen Peralta^{1, 2, 7#}

¹Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain. ³Liver Vascular Biology Research Group, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain; ⁴Diabetes and Obesity Research Laboratory, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ⁵Spanish Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Barcelona, Spain; ⁶Transplant Biomedicals S.L., Barcelona, Spain; ⁷Facultad de Medicina, Universidad Internacional de Cataluña, Barcelona, Spain.

* EB and MECP contributed equally to this work (as first author)

MJC and CP contributed equally to this work (as last author)

Correspondence to: Carmen Peralta Uroz

E-mail: cperalta@clinic.ub.es

Telephone: +34932275400 Ext 4177

SUPPLEMENTAL MATERIAL AND METHODS

MATERIAL AND METHODS

Experimental animals

Male homozygous obese (Ob) (400–450 g) and heterozygous lean (Ln) Zucker rats (350–400 g) for the genetic obesity experimental model, and male Sprague Dawley rats (SD) (200–220 g) for the experimental model of steatosis induced by choline-deficient diet (CDD) were purchased from Charles River (Paris, France). Animals were allowed to acclimatize to the animal room conditions for two weeks prior to surgical procedures. Animals were housed with one or two cagemates of the same strain in a standard, shoebox-style polycarbonate cage (24x46x20 cm) with standard stainless-steel lids, hardwood chip bedding and environmental enrichment. The environmental conditions in the animal room were: lighting, 300 to 1000 lumens/m² at cage level and lights on from 0700 to 1900; temperature, 20 to 28 °C; and relative humidity, 30% to 60%. Zucker rats were given water and standard laboratory food (rat chow) ad libitum. Liver steatosis was induced in SD rats by feeding a CDD for 10 days [1, 2]. The diet was purchased from Dyets Inc. (Bethlehem, PA), and its analytical composition (a modified #518753 choline deficient diet, g/kg) was: Alcohol-extracted peanut meal 90, Soy protein isolate (low in choline) 80, L-Cysteine 2, Cellulose fibre 10, Cornstarch 100, Dextrin 100, Sucrose 413, Choline bitartrate 0, Vitamin-free casein 10, Salt mix 35, Primex (hydrogenated vegetable oil) 100, Vitamin mix 10 and Corn oil 50. Control rats (SD) were kept on a standard chow diet containing adequate levels of choline (14.48 g/kg of choline at the expense of sucrose). After 10 days, no differences in rat weight, ranging between 350 and 380 g, were noted in SD and CDD-SD rats.

Ob Zucker and CDD-SD rats showed severe macrovesicular and microvesicular fatty infiltration in hepatocytes (60–70% steatosis) [1-4]. All procedures were started at 0900 and were performed under isoflurane anesthesia. Blood pressure, heart rate, and body temperature were monitored. All procedures were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of Barcelona University and by the Generalitat de Catalunya. European Union regulations (Directive 86/609 EEC) for animal experiments were respected.

Sample collections

In view of the results of previous studies based on the peaks in the parameters of hepatic injury and liver regeneration [5-8], hepatic injury (transaminases and damage score) and liver regeneration (percentage of Ki67 and cyclins) were determined after 24 h of liver surgery in groups from protocols 1-4. To reinforce

the deleterious effects of VEGFA in obese animals, hepatic damage (plasma AST, ALT, GLDH, ALP and bilirubin levels; and damage score) and liver regeneration (percentage of Ki67 and cyclin E levels) were also determined 72 h after liver surgery in Ob Zucker animals from groups of protocol 1. For survival studies, a sub-group of 20 Ln and 20 Ob Zucker rats were subjected to interventions described for groups corresponding to protocols 1 and 3 and the survival was monitored for 14 days [9]. Animals that died in the follow-up period underwent autopsy. The different treatments were administered immediately before surgery and the doses were selected on the basis of previous studies [2, 9-15] and preliminary studies from our group. The interventions and measurements for protocols 1-4 are summarized in Supplementary Figure 1.

Biochemical determinations

Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and glutamate dehydrogenase (GLDH) in plasma and malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) in liver were measured as described elsewhere [9, 16, 17]. Alkaline phosphatase (ALP), bilirubin, Von Willebrand factor (vWF), hyaluronic acid (HA) and sFlt1 in plasma were measured using commercial kits (ALP: Abcam, UK; bilirubin: Sigma-Aldrich, USA; vWF and sFlt1: Elabscience Biotechnology, USA; HA: R&D Systems, USA).

Western blotting

Liver and peripheral adipose tissues were homogenized and Western blotting was performed as described elsewhere [10, 18-23], using the antibodies against: VEGFA, p-VEGFR2, Id1, Wnt2, cyclin E, cyclin A, p-AKT (Santa Cruz Biotechnology, USA), PI3K (Cell Signaling Technology, USA), cyclin D1 and β -actin (Sigma-Aldrich, USA). To visualize the bound and the free forms of VEGFA, the same protocol was carried out but with a non-reducing 10% gel [24]. Immunoreactive protein bands were quantified densitometrically with Quantity One software.

RT-PCR

Total RNA was isolated from frozen liver and peripheral adipose tissue using TRIzol Reagent (Invitrogen, USA) and was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA). Real-time PCR was performed with PowerUp SYBR Green Master Mix using primers for: *Vegfa* 5'-CAAACCTCACCAAAGCCAGC-3' (forward) and 5'-TTCTCCGCTCTGAACAAGGC-3' (reverse), *Flt1* 5'-GGTGTCTATAGGTGCCGAGC-3' (forward) and 5'-GGGTGATCAGCTCCAGGTTT-3' (reverse), *sFlt1* 5'-GAAGACTCGGGCACCTATGC-3'

(forward) and 5'-GCAGTGCTCACCTCTAACGA-3' (reverse), and *Gapdh* 5'-AGTGCCAGCCTCGTCTCATA-3' (forward) and 5'-TAACCAGGCGTCCGATACG-3' (reverse) as control gene. It is well known that sFlt1 is an alternatively spliced, secreted isoform of the cell-surface receptor membrane-bound Flt1. Therefore, sFlt1 lacks the transmembrane and tyrosine kinase domains of Flt1 [24, 25]. In addition, Flt1 can also derive from the endoproteolytic cleavage of Flt1 in endothelial cells [26].

Histology, Red Oil staining, and Immunohistochemistry

Liver and peripheral adipose tissue sections were fixed by immersion into a solution of 10% formaldehyde and paraffin-embedded. To appraise the severity of hepatic injury, we graded hematoxylin and eosin-stained sections with a point counting method on an ordinal scale: (0) minimal or no evidence of injury; (1) mild injury (cytoplasmic vacuolation and focal nuclear pyknosis); (2) moderate to severe injury (extensive nuclear pyknosis, cytoplasmic hyper eosinophilia, and a loss of intercellular borders); (3) severe necrosis (disintegration of hepatic cords, haemorrhaging, and neutrophil infiltration); and (4) very severe necrosis (showing the latter manifestations to extreme degree) [27]. Liver steatosis was evaluated via red oil staining [9]. Liver samples were immunostained with a rabbit monoclonal antibody against Ki67 (DAKO, USA). For immunohistochemistry analysis of VEGFA, liver sections were immunostained with a mouse monoclonal antibody against VEGFA (Santa Cruz Biotechnology, USA). For immunohistochemistry analysis of Flt1 and sFlt1, adipose tissue was immunostained with a rabbit monoclonal antibody against sFlt1 and Flt1 (Abcam, UK). Samples were developed with diaminobenzidine, and counterstained with haematoxylin [9]. At least 30 high-power fields per slide were counted. The slides were blinded to the examiners who had extensive experience in evaluating liver pathology. At least four sections were examined per liver and adipose tissue sample.

Statistics

Statistical significance of differing variables was determined via non-parametric Kruskal-Wallis test. Mann-Whitney U test was applied to groups showing significant differences, and adjusted p-values were calculated using False Discovery Rate (FDR) method ($p_{adj} < 0.05$ considered significant). Survival estimates, obtained by Kaplan-Meier method, were then compared using both Log-rank (Mantel-Cox) and Gehan-Breslow-Wilcoxon tests, since Gehan-Breslow-Wilcoxon test emphasizes early differences [28], with statistical significance set at $p < 0.05$.

REFERENCES

- [1] Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M, Trevisani F, Guerrieri F, Bernardi M, Altomare E (2001) Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 33:808-815. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.23060>
- [2] Mendes-Braz M, Elias-Miró M, Kleuser B, Fayyaz S, Jiménez-Castro MB, Massip-Salcedo M, Gracia-Sancho J, Ramalho FS, Rodes J, Peralta C (2014) The effects of glucose and lipids in steatotic and non-steatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischaemia-reperfusion. *Liver Int* 34:e271-289. <https://doi.org/10.1111/liv.12348>
- [3] Caraceni P, Nardo B, Domenicali M, Turi P, Vici M, Simoncini M, De Maria N, Trevisani F, Van Thiel DH, Derenzini M, Cavallari A, Bernardi M (1999) Ischemia-reperfusion injury in rat fatty liver: role of nutritional status. *Hepatology* 29:1139-1146. <https://doi.org/10.1002/hep.510290407>
- [4] Hakamada K, Sasaki M, Takahashi K, Umehara Y, Konn M (1997) Sinusoidal flow block after warm ischemia in rats with diet-induced fatty liver. *J Surg Res* 70:12-20. <https://doi.org/10.1006/jsre.1997.5077>
- [5] Rozga J (2002) Hepatocyte proliferation in health and in liver failure. *Med Sci Monit* 8:RA32-38.
- [6] Maruyama H, Harada A, Kurokawa T, Kobayashi H, Nonami T, Nakao A, Takagi H (1995) Duration of liver ischemia and hepatic regeneration after hepatectomy in rats. *J Surg Res* 58:290-294. <https://doi.org/10.1006/jsre.1995.1045>
- [7] Asakawa H, Jeppsson B, Mack P, Hultberg B, Hägerstrand I, Bengmark S (1989) Acute ischemic liver failure in the rat: a reproducible model not requiring portal decompression. *Eur Surg Res* 21:42-48. <https://doi.org/10.1159/000129002>
- [8] Ferris GM, Clark JB. Nicotinamide nucleotide synthesis in regenerating rat liver (1971) *Biochem J* 121:655-662.
- [9] Cornide-Petronio ME, Bujaldon E, Mendes-Braz M, Avalos de León CG, Jiménez-Castro MB, Álvarez-Mercado AI, Gracia-Sancho J, Rodés J, Peralta C (2017) The impact of cortisol in steatotic and non-steatotic liver surgery. *J Cell Mol Med* 21:2344-2358. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13156>
- [10] McCormack L, Petrowsky H, Jochum W, Furrer K, Clavien PA (2007) Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann Surg* 245:923-930. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000251747.80025.b7>
- [11] Cornide-Petronio ME, Bujaldon E, Mendes-Braz M, Avalos de León CG, Jiménez-Castro MB, Álvarez-Mercado AI, Gracia-Sancho J, Rodés J, Peralta C (2017) The impact of cortisol in steatotic and non-steatotic liver surgery. *J Cell Mol Med* 21:2344-2358. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13156>
- [12] Bockhorn M, Goralski M, Prokofiev D, Dammann P, Grünewald P, Trippler M, Biglarnia A, Kamler M, Niehues EM, Frilling A, Broelsch CE, Schlaak JF (2007) VEGF is important for early liver regeneration after partial hepatectomy. *J Surg Res* 138:291-299. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.07.027>
- [13] Kommareddy S, Amiji M (2007) Antiangiogenic gene therapy with systemically administered sFlt-1 plasmid DNA in engineered gelatin-based nanovectors. *Cancer Gene Ther* 14:488-498. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7701041>
- [14] Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M, Kendrew J, Chester R, Jackson JA, Boffey SJ, Valentine PJ, Curwen JO, Musgrove HL, Graham GA, Hughes GD, Thomas AP, Stokes ES, Curry B, Richmond GH, Wadsworth PF, Bigley AL, Hennequin LF (2002) ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer Res* 62:4645-4655.

- [15] Launay JM, Mouillet-Richard S, Baudry A, Pietri M, Kellermann O (2011) Raphe-mediated signals control the hippocampal response to SRI antidepressants via miR-16. *Transl Psychiatry* 1:e56. <https://doi.org/10.1038/tp.2011.54>
- [16] O'Brien PJ, Slaughter MR, Polley SR, Kramer K (2002) Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. *Lab Anim* 36:313-321. <https://doi.org/10.1258/002367702320162414>
- [17] Jiménez-Castro MB, Meroño N, Mendes-Braz M, Gracia-Sancho J, Martínez-Carreres L, Cornide-Petronio ME, Casillas-Ramirez A, Rodés J, Peralta C (2015) The effect of brain death in rat steatotic and non-steatotic liver transplantation with previous ischemic preconditioning. *J Hepatol* 62:83-91. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.031>
- [18] Tsuchihashi S, Ke B, Kaldas F, Flynn E, Busuttill RW, Briscoe DM, Kupiec-Weglinski JW (2006) Vascular endothelial growth factor antagonist modulates leukocyte trafficking and protects mouse livers against ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 168:695-705. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050759>
- [19] Albanese C, Johnson J, Watanabe G, Eklund N, Vu D, Arnold A, Pestell RG (1995) Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem* 270:23589-23597.
- [20] Wiercinska E, Wickert L, Denecke B, Said HM, Hamzavi J, Gressner AM, Thorikay M, ten Dijke P, Mertens PR, Breitkopf K, Dooley S (2006) Id1 is a critical mediator in TGF-beta-induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 43:1032-1041. <https://doi.org/10.1002/hep.21135>
- [21] Maharaj AS, Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA (2006) Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am J Pathol* 168:639-648. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050834>
- [22] Klein D, Demory A, Peyre F, Kroll J, Augustin HG, Helfrich W, Kzhyshkowska J, Schledzewski K, Arnold B, Goerdt S (2008) Wnt2 acts as a cell type-specific, autocrine growth factor in rat hepatic sinusoidal endothelial cells cross-stimulating the VEGF pathway. *Hepatology* 47:1018-1031. <https://doi.org/10.1002/hep.22084>
- [23] Lee YJ, Karl DL, Maduekwe UN, Rothrock C, Ryeom S, D'Amore PA, Yoon SS (2010) Differential effects of VEGFR-1 and VEGFR-2 inhibition on tumor metastases based on host organ environment. *Cancer Res* 70:8357-8367. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1138>
- [24] Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, Albuquerque RJ, Richter E, Sakurai E, Newcomb MT, Kleinman ME, Caldwell RB, Lin Q, Ogura Y, Orecchia A, Samuelson DA, Agnew DW, St Leger J, Green WR, Mahasreshti PJ, Curiel DT, Kwan D, Marsh H, Ikeda S, Leiper LJ, Collinson JM, Bogdanovich S, Khurana TS, Shibuya M, Baldwin ME, Ferrara N, Gerber HP, De Falco S, Witt J, Baffi JZ, Raisler BJ, Ambati J (2006) Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* 443:993-997. <https://doi.org/10.1038/nature05249>
- [25] Kendall RL, Thomas KA (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10705-10709.
- [26] Mezquita B, Mezquita P, Pau M, Mezquita J, Mezquita C (2014) Unlocking Doors without Keys: Activation of Src by Truncated C-terminal Intracellular Receptor Tyrosine Kinases Lacking Tyrosine Kinase Activity. *Cells* 3:92-111. <https://doi.org/10.3390/cells3010092>.
- [27] Camargo CA Jr, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA (1997) Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 26:1513-1520.

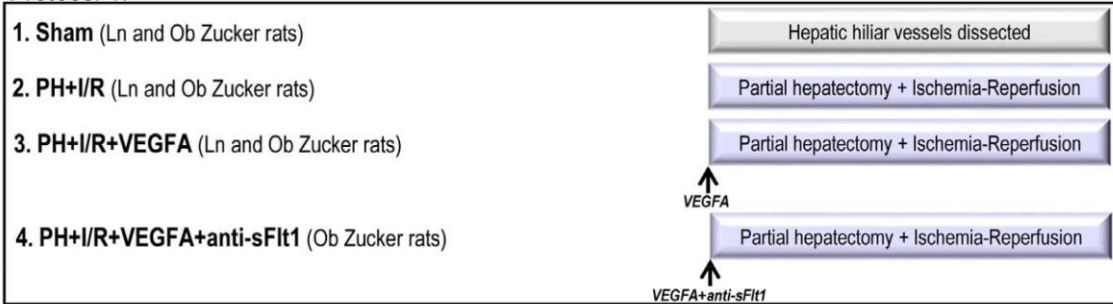
[28] Guerrero M, Crisafulli E, Liapikou A, Huerta A, Gabarrús A, Chetta A, Soler N, Torres A (2016) Readmission for Acute Exacerbation within 30 Days of Discharge Is Associated with a Subsequent Progressive Increase in Mortality Risk in COPD Patients: A Long-Term Observational Study. *PLoS One* 11:e0150737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150737>.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

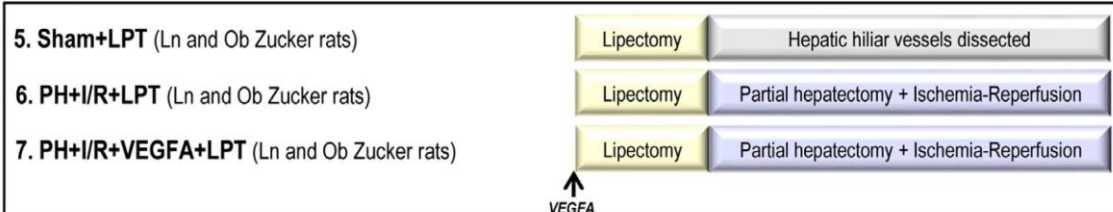
Supplementary Figure 1. Flow chart of the interventions and measurements corresponding to protocols 1-4. Protocol 1) VEGFA impact and availability in Ln and Ob Zucker rats undergoing PH+I/R; Protocol 2) Role of adipose tissue in the circulating sFlt1 levels in Ln and Ob Zucker rats undergoing PH+I/R; Protocol 3) Underlying mechanisms of VEGFA in Ln and Ob Zucker rats undergoing PH+I/R; Protocol 4) VEGFA impact and availability in SD and CDD-SD rats undergoing PH+I/R.

Experimental desing

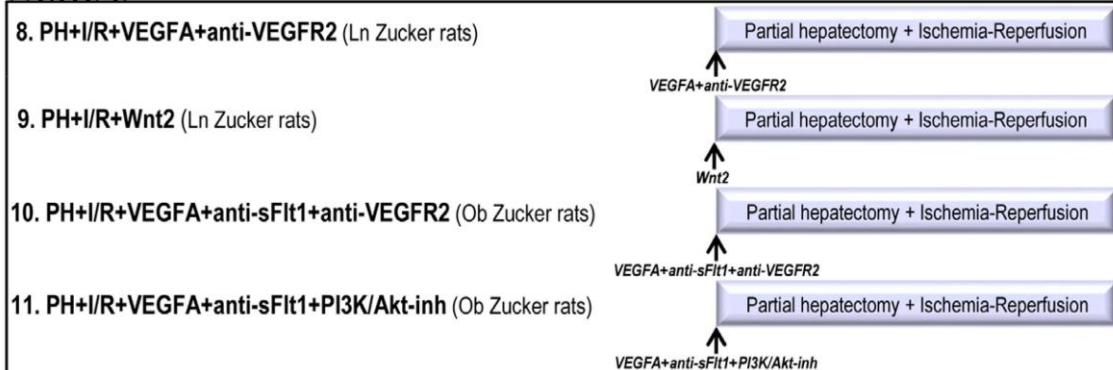
Protocol 1.



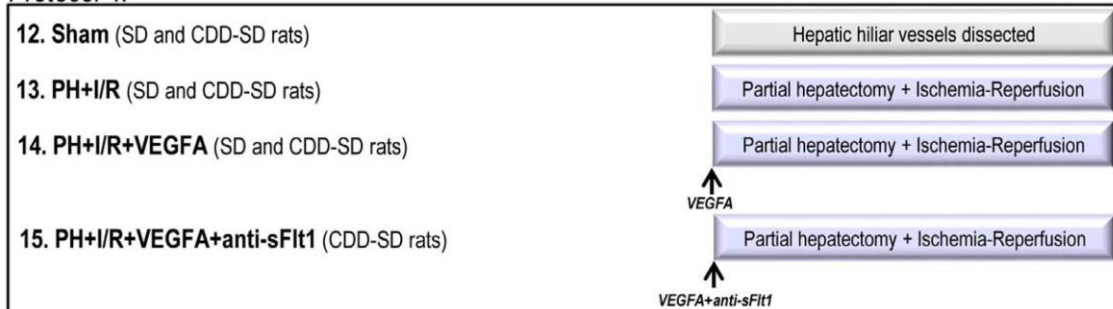
Protocol 2.



Protocol 3.



Protocol 4.



Test at 24 h and 72 h after liver surgery. Plasmatic VEGFA, transaminases, GLDH, ALP, Bilirubin, vWF, HA, sFlt1. Hepatic VEGFA, damage score, MDA, MPO, Ki-67 positive hepatocytes, cyclines, sFlt1, Flt1, VEGFR2, Id1, Wnt2, PI3K, Akt. sFlt1, Flt1, VEGFA in adipose tissue. Survival was monitored for 14 days.

ESM_2

**RELEVANCE OF VEGFA IN RAT LIVERS SUBJECTED TO PARTIAL HEPATECTOMY
UNDER ISCHEMIA-REPERFUSION
JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE**

Esther Bujaldon^{1*}, María Eugenia Cornide-Petronio^{1*}, José Gulfo², Floriana Rotondo¹, Cindy Ávalos de León¹, Elsa Negrete-Sánchez¹, Jordi Gracia-Sancho³, Anna Novials^{4,5}, Mónica B. Jiménez-Castro^{6#}, Carmen Peralta^{1,2,7#}

¹Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain. ³Liver Vascular Biology Research Group, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain; ⁴Diabetes and Obesity Research Laboratory, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ⁵Spanish Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Barcelona, Spain; ⁶Transplant Biomedicals S.L., Barcelona, Spain; ⁷Facultad de Medicina, Universidad Internacional de Cataluña, Barcelona, Spain.

* EB and MECP contributed equally to this work (as first author)

MJC and CP contributed equally to this work (as last author)

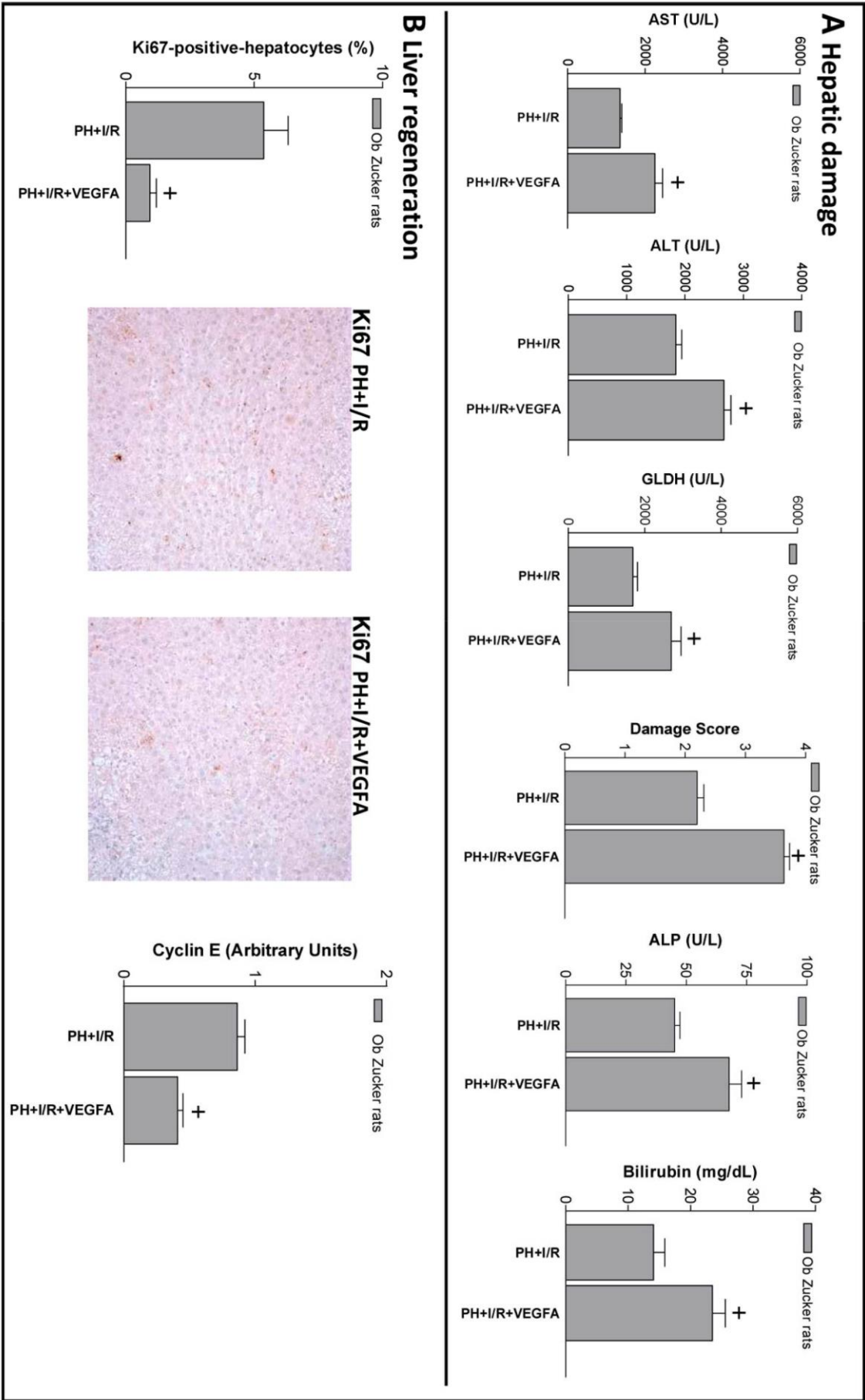
Correspondence to: Carmen Peralta Uroz

E-mail: cperalta@clinic.ub.es

Telephone: +34932275400 Ext 4177

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 2. Effect of VEGFA on hepatic damage and regeneration in Ob Zucker rats undergoing PH+I/R 72 h after surgery. (A) Plasma AST, ALT, GLDH, damage score, ALP and bilirubin levels. (B) Hepatic regeneration (percentage of Ki67-positive-hepatocytes, representative photomicrographs of Ki-67 immunohistochemical positivity (10x) and cyclin E levels). +P < 0.05 versus PH+I/R.



ESM_3

**RELEVANCE OF VEGFA IN RAT LIVERS SUBJECTED TO PARTIAL HEPATECTOMY
UNDER ISCHEMIA-REPERFUSION
JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE**

Esther Bujaldon^{1*}, María Eugenia Cornide-Petronio^{1*}, José Golfo², Floriana Rotondo¹, Cindy Ávalos de León¹, Elsa Negrete-Sánchez¹, Jordi Gracia-Sancho³, Anna Novials^{4,5}, Mónica B. Jiménez-Castro^{6#}, Carmen Peralta^{1, 2, 7#}

¹Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain. ³Liver Vascular Biology Research Group, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain; ⁴Diabetes and Obesity Research Laboratory, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ⁵Spanish Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Barcelona, Spain; ⁶Transplant Biomedicals S.L., Barcelona, Spain; ⁷Facultad de Medicina, Universidad Internacional de Cataluña, Barcelona, Spain.

* EB and MECP contributed equally to this work (as first author)

MJC and CP contributed equally to this work (as last author)

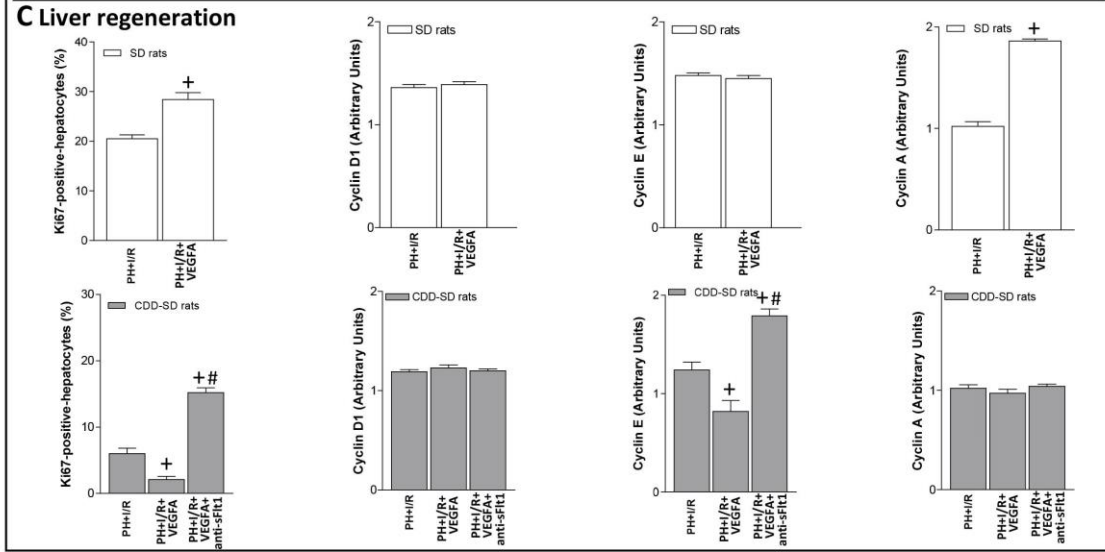
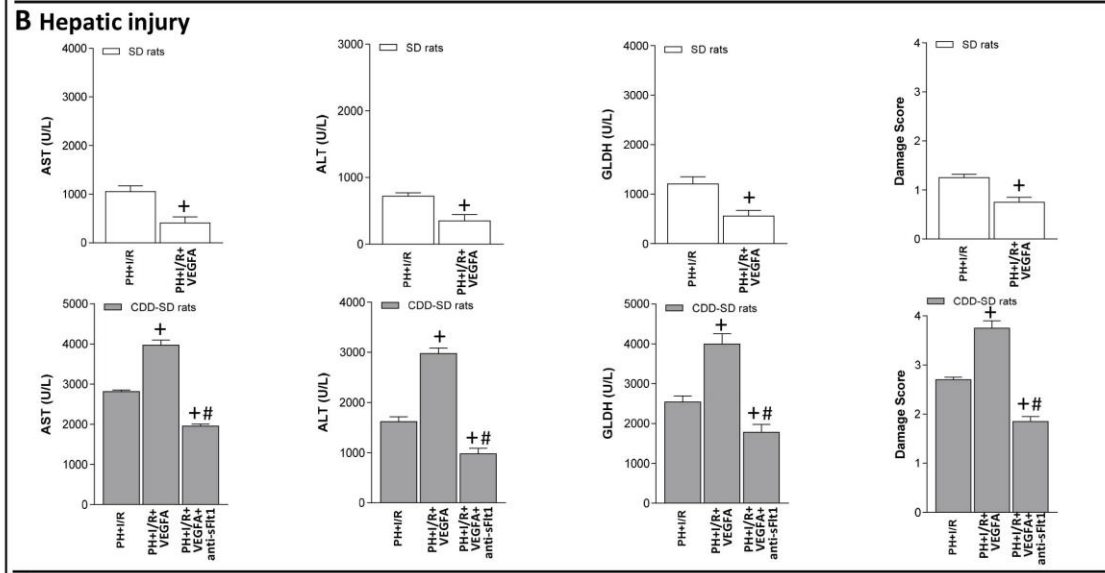
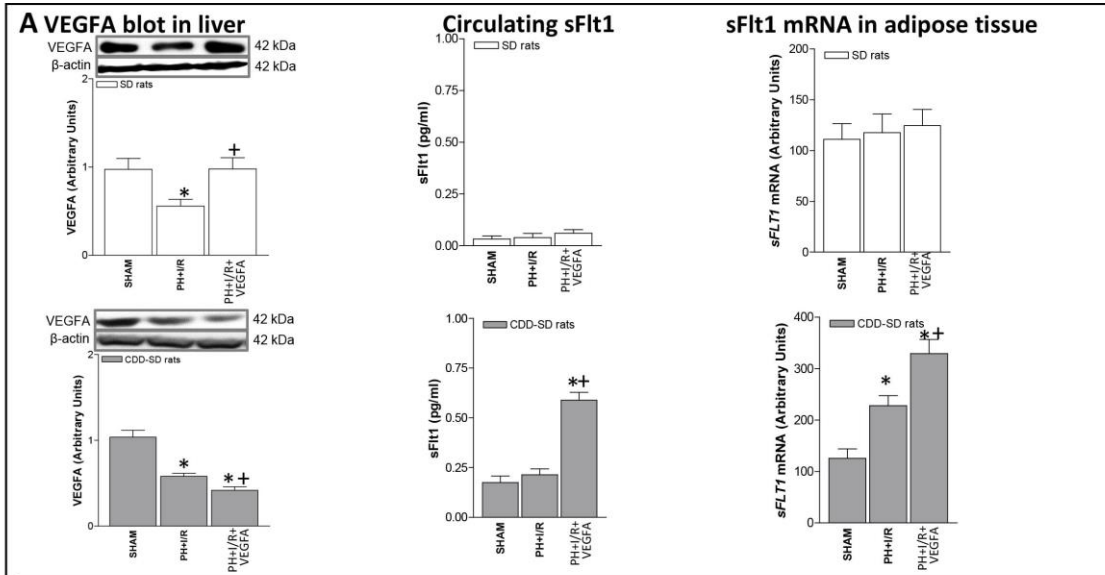
Correspondence to: Carmen Peralta Uroz

E-mail: cperalta@clinic.ub.es

Telephone: +34932275400 Ext 4177

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGEND

Supplementary Figure 3. Impact of VEGFA on hepatic damage and liver regeneration 24 h after surgery and survival rate in SD and CDD-SD rats. (A) Protein levels of hepatic VEGFA (Representative Western blots at the top and densitometric analysis at the bottom) and sFlt1 levels in plasma and adipose tissue. (B) Hepatic injury (plasma AST, ALT and GLDH levels and damage score). (C) Hepatic regeneration (percentage of Ki67-positive-hepatocytes and cyclins D1, E and A levels). *P < 0.05 versus sham; +P < 0.05 versus PH+I/R.



DISCUSIÓN

La hepatectomía parcial bajo oclusión vascular es una estrategia que se utiliza comúnmente en la práctica clínica para reducir la hemorragia durante la resección del parénquima hepático. Más del 20% de los pacientes que se someten a una resección hepática presentan algún grado de esteatosis, un porcentaje que se espera que aumente en un futuro próximo debido a la prevalencia de obesidad en la población. La esteatosis hepática es un factor de riesgo importante en la cirugía de las resecciones, ya que se asocia a un mayor índice de complicaciones y mortalidad postoperatoria (McCormack et al., 2007; Veteläinen et al., 2007). Identificando los mecanismos responsables del fallo hepático en hígados con esteatosis sometidos a PH+I/R podremos avanzar en el descubrimiento de terapias farmacológicas para protegerlos frente a la lesión inducida por la isquemia-reperfusión y fallo en la regeneración hepática.

El cortisol es la principal hormona producida por la activación del eje HPA en respuesta a la ACTH en situaciones de estrés. Además, la concentración de cortisol en el hígado está regulada por las siguientes enzimas: (i) 11- β HSD1, que produce cortisol a partir de la cortisona inactiva; (ii) 11- β HSD2, que inactiva el cortisol convirtiéndolo en cortisona y (iii) 5 α -reductasa tipo 1, 5 α -reductasa tipo 2 y 5 β -reductasa, involucradas en la eliminación de cortisol (Walker et al., 2001; Nixon et al., 2012). Alteraciones en la señalización del eje HPA, en el metabolismo hepático del cortisol y/o acumulación intrahepática de cortisol circulante pueden ser factores críticos en la patogénesis de diferentes enfermedades hepáticas y procesos inflamatorios, incluyendo colitis y síndrome metabólico (Webster et al., 2002; Tarantino and Finelli, 2013; Zoppini et al., 2004).

Los hallazgos que en la presente Tesis Doctoral se presentan son los primeros en sugerir que, en el contexto de PH bajo I/R, la administración de cortisol no tiene impacto en hígados no esteatósicos. De hecho, los parámetros de lesión hepática, incluyendo transaminasas y GLDH, así como los resultados histológicos de necrosis fueron similares a los encontrados en el grupo de PH+I/R. Y lo mismo ocurrió con la regeneración ya que el tratamiento con cortisol resultó en niveles de HGF y TGF- β , número de hepatocitos Ki-67-positivos y tasas de supervivencia similares a los encontrados en condiciones de PH+I/R. Sin embargo, los hígados esteatósicos resultan dañados al ser tratados con cortisol exógeno. Nuestros resultados indican que la administración de cortisol en hígados esteatósicos aumentó los niveles de transaminasas y GLDH y el número y extensión de áreas necróticas al compararlo con los resultados observados en PH+I/R. Adicionalmente, observamos menos hepatocitos positivos para Ki-67, lo cual fue asociado a niveles bajos de HGF, niveles altos de TGF- β activo y baja tasa de supervivencia.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis sobre el efecto del cortisol en hígados esteatósicos y no esteatósicos sometidos a PH bajo oclusión vascular contrastan con los

conocidos beneficios terapéuticos del cortisol en la hepatitis colestásica, shock y sepsis (Gönç et al., 2006; Honda et al., 2008). Sin embargo, tales patologías difieren en gran medida de aquella asociada a la intervención quirúrgica reportada en la presente Tesis. Y, además, hay que remarcar que al igual que ocurre con otros tratamientos (Ramalho et al., 2009; Casillas-Ramírez et al., 2008; Watanabe et al., 2000), tanto el tipo de estrategia quirúrgica (realización de PH sola o con oclusión vascular) como el estado basal del hígado (esteatósico *versus* no esteatósico), pueden dictar los efectos hepatocelulares del cortisol. De hecho, estudios en hígados no esteatósicos sometidos a PH sin I/R indican que la administración de cortisol estimula la proliferación de hepatocitos (Nadal, 1995), mientras que tales beneficios no se observan al implementar la oclusión vascular (PH+I/R) tal y como se ha demostrado en la presente Tesis. Es más, los cambios en el metabolismo/señalización del cortisol observados en hígados esteatósicos sometidos a PH bajo I/R no fueron atribuibles principalmente a la PH. Evaluamos el metabolismo de cortisol en hígados esteatósicos sometidos a PH solo o a PH+I/R y nuestros resultados indicaron que fue la implementación de la oclusión vascular (grupo PH+I/R) la que causó cambios en los niveles de cortisol, de ACTH y de las enzimas clave en la regulación del cortisol.

De acuerdo con los resultados de la presente Tesis, la acumulación de ACh inducida por cortisol puede explicar, al menos parcialmente, los efectos nocivos de la administración de cortisol en hígados esteatósicos sometidos a PH+I/R. Nuestros resultados indicaron que la administración de cortisol aumentó los niveles de ACh en hígados esteatósicos, lo cual fue asociado con un aumento en la expresión hepática de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ y muscarínico M3 de la ACh. Es más, la administración de ACh en PH+I/R, a través de los receptores muscarínicos M3, redujo la expresión de la vía de supervivencia celular, PI3K/Akt y exacerbó la respuesta inflamatoria, agravando el daño tisular, fomentando el fallo regenerativo, e incrementando finalmente la tasa de mortalidad. Nuestros resultados indican que el tratamiento con un antagonista de M3 mAChR solo o en combinación con cortisol se asoció con la sobreexpresión de PI3K/Akt y protección frente a la lesión y fallo en la regeneración de los hígados esteatósicos, reflejado en un aumento en la tasa de supervivencia de los animales obesos del 90%. Estos resultados no se obtuvieron cuando se procedió a realizar un tratamiento con un antagonista de $\alpha 7$ nAChR, indicando que el cortisol aumentó los niveles de ACh y produjo sus efectos nocivos a través del receptor muscarínico, M3 mAChR y no por el nicotínico, $\alpha 7$ nAChR.

Cabe destacar que el papel de la ACh difiere según las patologías, demostrando ser beneficioso en shock hemorrágico, isquemia de miocardio y pancreatitis (Mioni et al., 2005; Tracey, 2007), pero promoviendo la inflamación y daño en la enfermedad pulmonar

obstructiva crónica (Kistemaker et al., 2015). De hecho, mientras que la ACh es perjudicial en PH bajo oclusión vascular, previos resultados por nuestro grupo indican el papel beneficioso de la ACh en trasplante de injertos hepáticos esteatósicos procedentes de donantes con muerte cerebral (Cornide-Petronio et al., 2016). Estas diferencias en los efectos de la ACh en I/R hepática pueden deberse a que las alteraciones sistémicas inducidas por la muerte cerebral (ausentes en la cirugía de PH bajo oclusión vascular), la extensión y el tipo de isquemia (es decir, fría en trasplante hepático o normotérmica en PH+I/R) y la presencia de regeneración (presente en PH bajo oclusión vascular) conducen a diferencias en los mecanismos responsables de la lesión inducida por la I/R hepática y del fallo en la regeneración hepática y por consiguiente en diferencias en los efectos de las estrategias terapéuticas evaluadas según el tipo de cirugía hepática.

Respecto a los cambios en los niveles de cortisol y su metabolismo/señalización en la cirugía de resecciones hepáticas, en la presente Tesis describimos por primera vez que, a diferencia de los animales con hígados no esteatósicos, cuyos niveles de cortisol no sufren cambios debido a la cirugía hepática, los niveles de cortisol hepático y circulante se ven aumentados en ratas obesas sometidas a PH bajo oclusión vascular. Para explicar tales diferencias nos centramos en los mecanismos encargados de regular el metabolismo del cortisol. Nuestros resultados indican que en ratas Ln sometidas a PH+IR, los niveles de las enzimas encargadas de la eliminación de cortisol (11β -HSD2, 5α -R y 5β -R) permanecieron inalterados después de la operación, mientras que los niveles de la enzima 11β -HSD1, productora de cortisol, disminuyeron. Por consiguiente, era de esperar que los niveles de cortisol y ACTH plasmáticos, así como cortisol hepático, no se alteraran tras la cirugía de los hígados no esteatósicos. Tras la administración de cortisol, predominó la eliminación del cortisol en hígados no esteatósicos, impulsado por el aumento de la expresión de las reductasas 5α R1 y 5β R, enzimas involucradas en la inactivación de cortisol. En definitiva, los hígados no esteatósicos sometidos a cirugía estaban activando mecanismos que evitan la acumulación hepática de cortisol para prevenir sus efectos hepatocelulares nocivos. Por el contrario, los niveles aumentados de cortisol plasmático y hepático y ACTH circulante en PH+I/R en ratas obesas, se asociaron a un aumento en la expresión de las enzimas productoras de cortisol, particularmente 11β -HSD1, así como una reducción de las enzimas encargadas de su eliminación, como es el caso de la 5β -reductasa. Estos resultados indicaban que en las ratas Ob sometidas a cirugía se desencadenaban mecanismos para acumular cortisol en el hígado tales como un aumento neto en la actividad secretora del eje HPA y una desregulación de los enzimas encargados de generar y eliminar el cortisol en hígado. Tras la administración de cortisol en hígados esteatósicos, a pesar de un aumento en la expresión de 5β R aparentemente para eliminar el exceso de cortisol hepático, los altos niveles de 11β -HSD1 facilitaron la acumulación de cortisol y por

consiguiente sus efectos nocivos en presencia de esteatosis. La acumulación postoperatoria de cortisol en los hígados esteatósicos parece ocurrir independientemente del tejido adiposo periférico. De hecho, nuestros resultados indican que la eliminación de la grasa en ratas obesas reduce los niveles de cortisol plasmáticos, pero no hepáticos. Por consiguiente, al igual que en algunas afecciones inflamatorias crónicas como la esteatohepatitis no alcohólica, la enfermedad inflamatoria intestinal y colitis (Tarantino and Finelli, 2013; Ahmed et al., 2012), la acumulación de cortisol hepático viene determinado principalmente por alteraciones en los enzimas hepáticos que regulan los niveles de cortisol.

Además de establecer la relevancia de los enzimas hepáticos implicados en el metabolismo del cortisol, la presente Tesis se centró en la relevancia del eje HPA en los niveles circulantes de cortisol en animales Ln y Ob sometidos a cirugía.

Se conoce que en el caso de producirse una disminución en la expresión del 11 β -HSD1 (enzima encargado de generar cortisol), el eje HPA es activado para contrarrestar los bajos niveles de cortisol plasmático (Walker et al. 2001). De la misma manera, los niveles elevados de cortisol debidos a una reducción en la actividad de 11 β -HSD2 se equilibran inactivando el eje HPA (Walker et al., 2001). Esto indicaría que cambios en la actividad de las enzimas implicadas en regular los niveles intracelulares de cortisol en hígados esteatósicos podría afectar al eje HPA. De acuerdo con los resultados presentados en esta Tesis, el cortisol administrado a ratas Ob en PH bajo oclusión vascular desencadenó un bucle de retroalimentación negativa a través del eje HPA, disminuyendo así los niveles circulantes de ACTH. Esto derivó en una reducción en la secreción de cortisol dependiente de ACTH, encaminada a contrarrestar niveles elevados de cortisol en la circulación. Además del eje HPA, no se puede descartar la implicación del tejido adiposo o hígado en ratas Ob (ya sea por una mayor captación de cortisol circulante por parte de los tejidos o por una reducción en la liberación de cortisol a la circulación).

Por otro lado, en animales Ln sometidos a cirugía, el papel desempeñado por el eje HPA en la regulación de los niveles de cortisol circulante es irrelevante. En condiciones de PH+I/R no hubo cambios en el eje HPA e incluso la administración de cortisol tampoco alteró los niveles de ACTH circulantes.

De interés clínico, atendiendo a nuestros resultados, es poco probable que el cortisol se convierta en un factor pronóstico importante en la cirugía de las resecciones hepáticas. Los datos aquí presentados indican que no solo no existe una asociación directa entre niveles circulantes de cortisol y grado de daño hepático o fallo de regeneración, sino que las enzimas hepáticas que gobiernan el metabolismo del cortisol pueden variar independientemente de cambios en los niveles plasmáticos de cortisol.

Los resultados de la presente Tesis establecen un efecto diferencial del cortisol en cirugía dependiente del tipo de hígado, así como sus mecanismos de regulación y de acción que se resumen la Fig. 11.1.

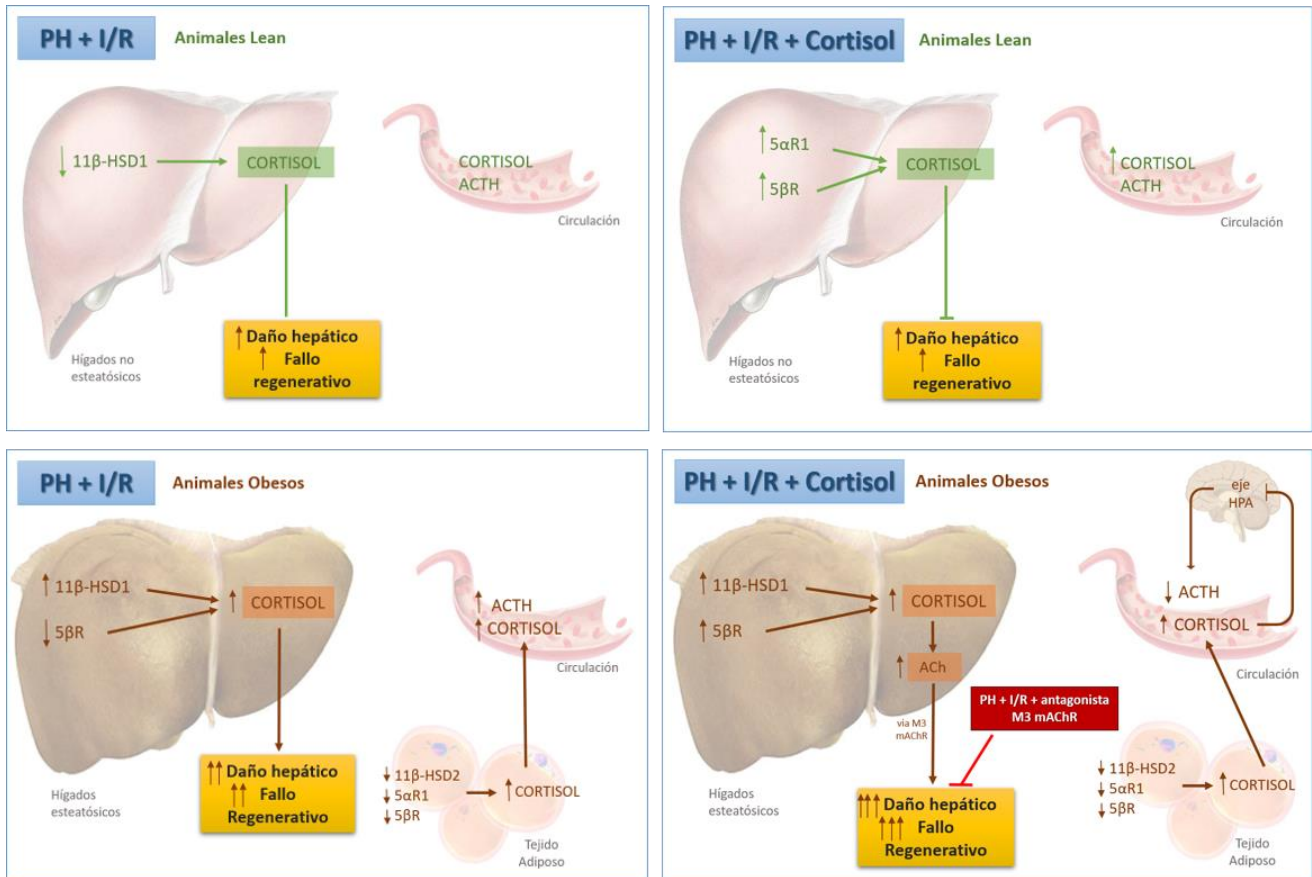


Figura 11.1. Esquema de las intervenciones quirúrgicas y modulaciones farmacológicas realizadas, los efectos que ejercen y los mecanismos implicados.

Siguiendo con los objetivos planteados, evaluamos la relevancia del VEGFA en condiciones de PH bajo oclusión vascular. Hasta el momento de la presente Tesis ningún estudio previo había reportado cambios en los niveles de VEGFA en hígados esteatósicos y no esteatósicos sometidos a PH bajo oclusión vascular, un procedimiento ampliamente aplicado en cirugía para reducir el sangrado. De acuerdo a nuestros resultados, se observan niveles reducidos de mRNA y proteína de VEGFA tanto en hígados esteatósicos como no esteatósicos sometidos a cirugía. Sin embargo, la administración de VEGFA sí mostró efectos diferenciales sobre el daño y la regeneración en hígados esteatósicos y no esteatósicos.

Nuestros resultados histológicos y bioquímicos indican que en condiciones de PH+I/R, la administración de VEGFA exógeno en animales Ln aumenta el VEGFA en hígados no esteatósicos disminuyendo la lesión hepática y el fallo regenerativo, y aumentando en última instancia la tasa de supervivencia. En cambio, en animales Ob (tanto genéticos como nutricionalmente inducidos) sometidos a la PH bajo oclusión vascular, la administración de VEGFA redujo aun más los niveles deficientes de VEGFA observados en hígados esteatósicos exacerbando el daño y el fallo en la regeneración hepática.

Dado que sFlt1 es capaz de secuestrar y, por lo tanto, influenciar en los niveles circulantes de VEGFA y prevenir sus vías de señalización (Kendall et al., 1996; Denziot et al., 2007; Aryal et al., 2016), y considerando que los niveles plasmáticos de sFlt1 están elevados en diferentes enfermedades hepáticas (Jaroszewicz et al., 2008; Salcedo et al., 2005), se investigó si las diferencias en los niveles de VEGFA en hígados no esteatósicos y esteatósicos resultantes de la administración exógena de VEGFA pueden explicarse por las diferencias en los niveles circulantes de sFlt1. Nuestros resultados indican que los niveles plasmáticos de sFlt1 son más bajos en animales Ln que en animales Ob tras la cirugía de PH bajo oclusión vascular. Tras la administración de VEGFA aumentaron los niveles circulantes y hepáticos de VEGFA en su forma libre en animales Ln. Por el contrario, nuestros resultados indican que en animales Ob, la administración de VEGFA en PH bajo oclusión vascular disminuye los niveles de la forma libre de VEGFA circulante y, consecuentemente, se reducen los niveles de VEGFA en hígados esteatósicos.

En la presente Tesis se investigó si el tejido adiposo era capaz de inducir cambios en los niveles circulantes de sFlt1 en ratas Ln y Ob Zucker sometidas a PH+I/R. Tales investigaciones se realizaron por las siguientes razones: existen diferencias funcionales entre el tejido adiposo de individuos delgados y obesos (Odegaard et al., 2011; Khan et al., 2009; Hosogai et al., 2007) la obesidad está asociada con estrés oxidativo y respuesta inflamatoria en tejido adiposo (Gordon, 2007; Wellen and Hotamisligil, 2005; Wellen and Hotamisligil, 2003), y también perjudica la función de los adipocitos y la consiguiente secreción de mediadores derivados del tejido adiposo a la circulación (Elias-Miró et al., 2001; Tilg et al., 2006; Farrell, 2004). Nuestros resultados en ratas Zucker indican lo siguiente: a) los niveles de sFlt1 en el tejido adiposo fueron mayores en Ob que en los animales Ln, b) el aumento en los niveles de sFlt1 en el tejido adiposo como consecuencia de PH+I/R ocurrió solo en los animales Ob, y c) los niveles circulantes de sFlt1 pueden derivar del tejido adiposo. Nuestros resultados indicaron también que el tratamiento con VEGFA aumentó sFlt1 en el tejido adiposo solo en animales Ob, y esto dió lugar a la liberación de sFlt1 del tejido adiposo a la circulación. Por lo tanto, nosotros sugerimos que los altos niveles de sFlt1 circulantes-derivados del tejido adiposo- en animales Ob que se

someten a cirugía hepática secuestran el VEGFA exógeno y reducen la biodisponibilidad del VEGFA circulante. Por consiguiente, restringen la posibilidad de que el hígado capte el VEGFA procedente de la circulación y ejerza en consecuencia sus efectos protectores. La administración concomitante de VEGFA con un anticuerpo contra sFlt1 garantiza que el VEGFA exógeno llegue al hígado esteatótico para proteger frente al daño y fallo en la regeneración hepática.

En estudios previos de PH sin oclusión vascular los efectos beneficiosos del VEGFA cursaban a través de la vía VEGFR2-Id1-Wnt2 (Ding et al., 2010; Kambakamba et al., 2018). Sin embargo, nuestros resultados en hígados no esteatóticos sometidos a PH y en presencia de oclusión vascular indican que el VEGFA no requiere Id1 para inducir la activación de Wnt2. De hecho, nuestros resultados indican que la regulación farmacológica de VEGFA o de su receptor VEGFR2, influye en el grado de daño y la respuesta regenerativa en hígados no esteatóticos en condiciones de PH+I/R, independientemente de cambios en la expresión de Id1. En condiciones de PH bajo oclusión vascular, la administración de VEGFA en animales Ln aumentó Wnt2 en hígados no esteatóticos (sin inducir cambios en la expresión de Id1), lo cual se asoció con mejoras en daño hepático y regeneración. Además, el uso de un anticuerpo contra VEGFR2 eliminó los efectos beneficiosos del VEGFA sobre el Wnt2, el daño hepático y la regeneración. Es más, nuestros resultados indican que al igual que ocurre con el tratamiento con VEGFA, la administración de Wnt2 disminuye el daño hepático y el fallo regenerativo en condiciones de PH+I/R, resultando en una disminución en los parámetros de daño e inflamación en hígados no esteatóticos y mejorando la funcionalidad, regeneración y tasa de supervivencia. En conjunto, nuestros resultados demuestran por primera vez que los efectos beneficiosos de VEGFA frente al daño y el fallo regenerativo en hígados no esteatóticos en condiciones de PH bajo oclusión vascular se ejercen a través de la ruta VEGFR2-Wnt2, independientemente de Id1.

En un estudio previo se observó que la administración de VEGFA en hígados con esteatosis inducida por dieta sometidos a PH sin oclusión vascular ejerce un efecto protector (Gu et al., 2013). Por otro lado, nuestros resultados indican que la administración de VEGFA no se debe de considerar una estrategia eficaz para reducir el daño y mejorar la regeneración del hígado esteatótico en condiciones quirúrgicas asociadas a resecciones hepáticas que cursan con oclusión vascular. De acuerdo a nuestros resultados, en tales condiciones es necesaria la administración conjunta de VEGFA y anti-sFlt1 (que incrementa la disponibilidad de VEGFA) para proteger al hígado esteatótico frente al daño y fallo en la regeneración.

Estudios previos en ratones obesos con NAFLD indicaron que una reducción en la expresión de Wnt2 se asocia con la inhibición de la proliferación de hepatocitos (Zhou et

al., 2014; Clarke et al., 2014). Sin embargo, en la presente Tesis, el Wnt2 parece desempeñar un papel minoritario en los hígados esteatósicos en condiciones de PH+I/R. De acuerdo a nuestros resultados, la administración conjunta de VEGFA y anti-sFlt1 en hígados esteatósicos no induce cambios en los niveles de Id1 ni de Wnt2, mientras que activó la vía de supervivencia celular PI3K/Akt. Tal aumento en la expresión de PI3K/Akt y en la protección del hígado esteatósico desapareció cuando administramos anticuerpos anti-VEGFR2. Además, la administración de un inhibidor de la vía de señalización PI3K/Akt, eliminó los beneficios resultantes del tratamiento con VEGFA+anti-sFlt1 frente al daño y regeneración en hígados esteatósicos. Por lo tanto, si se bloquea la acción sFlt1, el VEGF-A puede ejercer sus efectos en los hígados esteatósicos activando la vía PI3K/Akt y sin cambios en la vía clásica Id1-Wnt2.

Dados nuestros resultados experimentales, el sFlt1 circulante puede determinar la disponibilidad de VEGFA y sus efectos en los órganos diana. Obviamente, serán necesarias más investigaciones para determinar si todos estos resultados experimentales podrían extrapolarse a la práctica clínica en cirugía hepática o en otras patologías. Por otro lado, esta posibilidad no debe ser descartada. Si bien, Yilmaz et al. (Yilmaz et al., 2011) describieron que los pacientes con NAFLD tienen concentraciones séricas de sFlt1 significativamente más bajas que los controles, Coulon et al. (Coulon et al., 2012) encontraron que los niveles séricos de sFlt1 eran significativamente más altos en pacientes con NASH y/o esteatosis simple en comparación con los controles. Los autores indican que la razón de estos resultados diferentes puede estar en la diversidad de las poblaciones de pacientes y sus características clínicas (diferencias en el IMC, y la inclusión o exclusión de pacientes con diabetes mellitus) o en las diferencias en las técnicas de laboratorio. De hecho, los resultados reportados por Coulon et al. (Coulon et al., 2012) están en línea con los presentados en esta Tesis y con otros estudios que indican aumentos en los niveles de sFlt1 circulantes en pacientes con cirrosis hepática, así como en pacientes con enfermedad renal crónica (Jaroszewicz et al., 2008; Salcedo-Mora et al., 2005; Di Marco et al., 2009).

La Figura 11.2 establece el papel diferencial del VEGFA en hígados esteatósicos y no esteatósicos sometidos a PH bajo oclusión vascular, específicas vías de señalización del VEGFA en función del tipo de hígado y evidencia nuevos fármacos y vías de acción terapéutica para reducir la lesión y el fallo en la regeneración específicos para cada tipo de hígado.

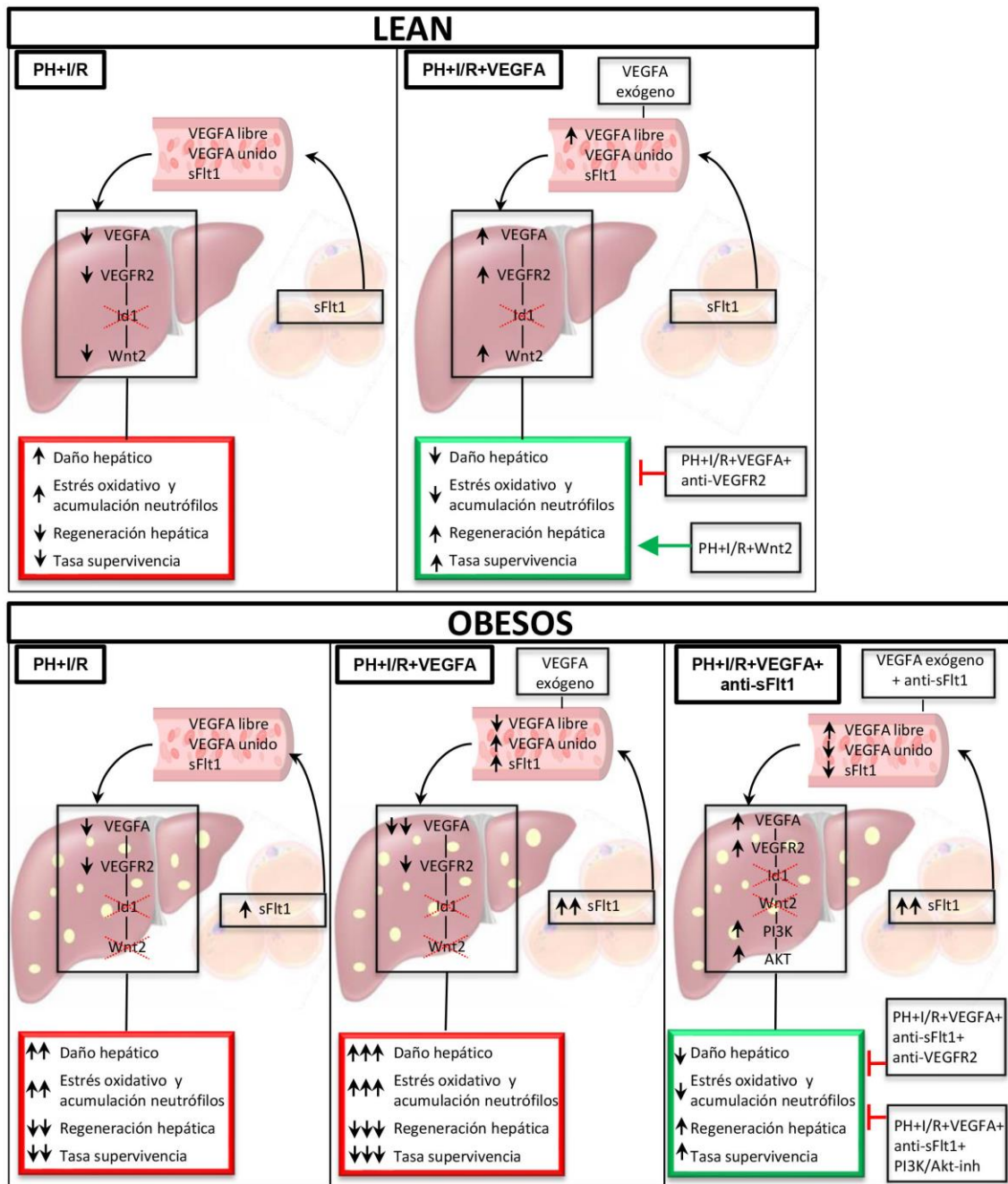


Figura 11.2. Esquema de los efectos ejercidos por las diferentes intervenciones y las vías de señalización propuestas

CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas de la presente Tesis son las siguientes:

En condiciones de PH bajo oclusión vascular, el papel del eje HPA, los niveles de cortisol hepático, los enzimas encargados del metabolismo del cortisol hepático y la contribución del tejido adiposo como fuente de cortisol circulante son dependientes del tipo de hígado: esteatósico o no esteatósico.

El tratamiento con cortisol no tiene impacto en los hígados no esteatóticos ya que regulan su metabolismo para limitar el exceso de cortisol y prevenir en consecuencia sus efectos nocivos sobre la lesión y la regeneración hepática. Por el contrario, el tratamiento con cortisol en los hígados esteatóticos culmina en un daño tisular y un fallo regenerativo mayor después de la operación quirúrgica debido a la incapacidad de tales hígados de controlar los niveles de cortisol.

Los efectos dañinos del cortisol sobre la lesión y regeneración en hígados esteatóticos en condiciones de PH bajo oclusión vascular se asocian a una acumulación de ACh. De tal forma, las estrategias farmacológicas capaces de bloquear el receptor muscarínico M3 de la ACh son capaces de reducir la lesión hepática y el fallo en la regeneración, evitando en consecuencia la incidencia de complicaciones quirúrgicas postoperatorias.

En condiciones de PH bajo oclusión vascular, se observan niveles reducidos de VEGFA tanto en hígados esteatóticos como no esteatóticos. Sin embargo, el VEGFA exógeno solo es capaz de llegar al hígado no esteatósico. En animales obesos se produce un secuestro del VEGFA circulante debido a la liberación del sFlt1 por el tejido adiposo a la circulación.

Las estrategias terapéuticas basadas en el tratamiento con VEGFA son útiles sólo para proteger los hígados no esteatóticos frente a la lesión y al fallo regenerativo. Sin embargo, se requiere una estrategia farmacológica basada en la combinación de VEGFA y anti-sFlt1 para evitar el secuestro del VEGFA por el sFlt1 y en consecuencia proteger a los hígados esteatóticos frente al daño y fallo en la regeneración.

Los mecanismos de acción del VEGFA en la cirugía de PH bajo oclusión vascular son específicos para cada tipo de hígado: la vía VEGFA - VEGFR2 - Wnt2 para hígados no esteatóticos y la vía VEGFA+anti-sFlt1 - VEGFR2 - PI3K/Akt para hígados esteatóticos.

BIBLIOGRAFIA

Adam R, Reynes M, Johann M, Morino M, Astarcioglu I, Kafetzis I, Castaing D, Bismuth H. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc.* 1991; 23:1538-1540.

Adams DH, Eksteen B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:244-251.

Ahmed A, Rabbitt E, Brady T, Brown C, Guest P, Bujalska IJ, Doig C, Newsome PN, Hubscher S, Elias E, Adams DH, Tomlinson JW, Stewart PM. A switch in hepatic cortisol metabolism across the spectrum of non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2012; 7:e29531.

Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, Diehl AM. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol.* 1992; 263:G579-585.

Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 2009; 89:73-120.

Altavilla D, Guarini S, Bitto A, Mioni C, Giuliani D, Bigiani A, Squadrito G, Minutoli L, Venuti FS, Messineo F, De Meo V, Bazzani C, Squadrito F. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway reduces NF-kappaB activation, blunts TNF-alpha production, and protects against splanchnic artery occlusion shock. *Shock.* 2006; 25:500-506.

Amersi F, Shen XD, Moore C, Melinek J, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW, Coito AJ. Fibronectin-alpha 4 beta 1 integrin-mediated blockade protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2003; 162:1229-1239.

Anderson CD, Upadhyaya G, Conzen KD, Jia J, Brunt EM, Tiriveedhi V, Xie Y, Ramachandran S, Mohanakumar T, Davidson NO, Chapman WC. Endoplasmic reticulum stress is a mediator of posttransplant injury in severely steatotic liver allografts. *Liver Transpl.* 2011; 17:189-200.

Andersson M, Aronsson P, Giglio D, Wilhelmson A, Jeřábek P, Tobin G. Pharmacological modulation of the micturition pattern in normal and cyclophosphamide pre-treated conscious rats. *Auton Neurosci.* 2011; 159:77-83.

Andrew R, Phillips DI, Walker BR. Obesity and gender influence cortisol secretion and metabolism in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:1806-1809.

Archambault AJ, Sirois MG, Bernatchez PN, Fiset C, Haddad PS. Vascular endothelial growth factor production by isolated rat hepatocytes after cold ischemia-warm reoxygenation. *Liver Transpl.* 2001; 7:988-997.

Aryal B, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Komokata T, Inoue M, Ikeda S, Fukukura Y, Nakamura M, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Imoto Y. A Switch in the Dynamics of Intra-Platelet VEGF-A from Cancer to the Later Phase of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Humans. *PLoS One.* 2016; 11:e0150446.

Atkinson LL, Kelly SE, Russell JC, Bar-Tana J, Lopaschuk GD. MEDICA 16 inhibits hepatic acetyl-CoA carboxylase and reduces plasma triacylglycerol levels in insulin-resistant JCR: LA-cp rats. *Diabetes.* 2002; 51:1548-1555.

- Azoulay D, Maggi U, Lim C, Malek A, Compagnon P, Salloum C, Laurent A.** Liver resection using total vascular exclusion of the liver preserving the caval flow, in situ hypothermic portal perfusion and temporary porta-caval shunt: a new technique for central tumors. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2014; 3:149-153.
- Balzan SM, Gava VG, Rieger A, Pra D, Trombini L, Zenkner FF, Horta JA, Azambuja G, Schopf L, de Souza PL.** Ischemic versus pharmacologic hepatic preconditioning. *J Surg Res.* 2014; 191:134-139.
- Barrett KE, Brooks H., Boitano S, Barman S Eds.** Ganong's Review of Medical Physiology. 23rd edition. LANGE Basic Science. McGraw Hill. 2012. ISBN: 978-0-07-160568-7.
- Behrns KE, Tsiotos GG, DeSouza NF, Krishna MK, Ludwig J, Nagorney DM.** Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg.* 1998; 2:292-298.
- Bejaoui M, Zaouali MA, Sakly R, Ben Abdennebi H.** Olprinone protects the liver from ischemia-reperfusion injury through oxidative stress prevention and protein kinase Akt activation. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018; 96:227-231.
- Belghiti J, Hiramatsu K, Benoist S, Massault P, Sauvanet A, Farges O.** Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J Am Coll Surg.* 2000; 191:38-46.
- Ben Mosbah I, Alfany-Fernández I, Martel C, Zaouali MA, Bintanel-Morcillo M, Rimola A, Rodés J, Brenner C, Roselló-Catafau J, Peralta C.** Endoplasmic reticulum stress inhibition protects steatotic and non-steatotic livers in partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. *Cell Death Dis.* 2010; 1:e52.
- Bengmark S, Börjesson B, Olin T, Sakuma S, Vosmic J.** Subcutaneous transposition of the spleen—an experimental study in the rat. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1970; 7:175-179.
- Bernstein DE, Cheiker S.** Simple technique for portal-caval shunt in the rat. *J Appl Physiol.* 1959; 14:469-470.
- Blakemore AH, Lord JW.** The Technic of Using Vitallium Tubes in Establishing Portacaval Shunts for Portal Hypertension. *Ann Surg.* 1945; 122:476-489.
- Bockhorn M, Schöllmann S, Opitz B, Sotiropoulos GC, Sheu SY, Niehaus E, Trippler M, Frilling A, Broelsch CE, Schlaak JF.** Vascular endothelial growth factor does not improve liver regeneration and survival after 90% subtotal liver resection. *Hepatol Res.* 2007; 37:353-359.
- Bonaz B, Sinniger V, Pellissier S.** Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. *J Physiol.* 2016; 594:5781-5790.
- Boros P, Tarcsafalvi A, Wang L, Megyesi J, Liu J, Miller CM.** Intrahepatic expression and release of vascular endothelial growth factor following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation.* 2001; 72:805-811.

Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000; 405:458-462

Boulton R, Woodman A, Calnan D, Selden C, Tam F, Hodgson H. Nonparenchymal cells from regenerating rat liver generate interleukin-1 alpha and1 beta: a mechanism of negative regulation of hepatocytes proliferation. *Hepatology*. 1997; 26:49-58.

Bouzat C, Barrantes FJ. Hydrocortisone and 11-desoxycortisone modify acetylcholine receptor channel gating. *Neuroreport*. 1993; 4:143-146.

Bray, G.A. The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc*. 1977; 36:148-153.

Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94:2467-2474.

Burnett, WE, Rosemond, GP, Weston, JK, and Tyson, RR Studies of hepatic response to changes in blood supply. *Surg Forum*. 1951:147-153.

Busuttil RW, Klintmalm GBG Eds. Transplantation of the Liver. 3rd Edition. Elsevier. 2015. ISBN: 978-1-455-70268-8.

Cámara-Lemarroy CR, Guzmán-de la Garza FJ, Alarcón-Galván G, Cordero-Pérez P, Muñoz-Espinosa L, Torres-González L, Fernández-Garza NE. Hepatic ischemia/reperfusion injury is diminished by atorvastatin in Wistar rats. *Arch Med Res*. 2014; 45:210-216.

Cannistrà, M. Cannistrà M, Ruggiero M, Zullo A, Gallelli G, Serafini S, Maria M, Naso A, Grande R, Serra R, Nardo B. Hepatic ischemia reperfusion injury: A systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers. *Int J Surg*. 2016; 33:S57-S70.

Caraceni P, Nardo B, Domenicali M, Turi P, Vici M, Simoncini M, De Maria N, Trevisani F, Van Thiel DH, Derenzini M, Cavallari A, Bernardi M. Ischemia-reperfusion injury in rat fatty liver: role of nutritional status. *Hepatology*. 1999; 29:1139-1146.

Caraceni P, Bianchi C, Domenicali M, Maria Pertosa A, Maiolini E, Parenti Castelli G, Nardo B, Trevisani F, Lenaz G, Bernardi M. Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat fatty liver exposed to preservation-reperfusion injury. *J Hepatol*. 2004; 41:82-88.

Caraceni P, Domenicali M, Vendemiale G, Grattagliano I, Pertosa A, Nardo B, Morselli-Labate AM, Trevisani F, Palasciano G, Altomare E, Bernardi M. The reduced tolerance of rat fatty liver to ischemia reperfusion is associated with mitochondrial oxidative injury. *J Surg Res*. 2005; 124:160-168.

Casillas-Ramírez A, Mosbah IB, Franco-Gou R, Rimola A, Roselló-Catafau J, Peralta C. [Ischemia-reperfusion syndrome associated with liver transplantation: an update]. *Gastroenterol Hepatol*. 2006a; 29:306-313.

- Casillas-Ramírez A, Mosbah IB, Ramalho F, Roselló-Catafau J, Peralta C.** Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci.* 2006b; 79:1881-1894.
- Chapman K, Holmes M, Seckl J.** 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiol Rev.* 2013; 93:1139-1206.
- Chavin KD, Yang S, Lin HZ, Chatham J, Chacko VP, Hoek JB, Walajtys-Rode E, Rashid A, Chen CH, Huang CC, Wu TC, Lane MD, Diehl AM.** Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem.* 1999; 274:5692-5700.
- Chavin KD, Fiorini RN, Shafizadeh S, Cheng G, Wan C, Evans Z, Rodwell D, Polito C, Haines JK, Baillie GM, Schmidt MG.** Fatty acid synthase blockade protects steatotic livers from warm ischemia reperfusion injury and transplantation. *Am J Transplant.* 2004; 4:1440-1447.
- Chen MF, Chen JC, Chiu DF, Ng CJ, Shyr MH, Chen HM.** Prostacyclin analogue (OP-2507) induces delayed ex vivo neutrophil apoptosis and attenuates reperfusion-induced hepatic microcirculatory derangement in rats. *Shock.* 2001; 16:473-478.
- Cingolani HE, Houssay AB Eds.** Fisiología Humana de Houssay. 7ª Edición. El Ateneo. Grupo Ilhsa. 2004. ISBN: 978-9-500-20376-0.
- Claesson-Welsh, L.** VEGF receptor signal transduction - A brief update. *Vascul Pharmacol.* 2016; 86:14-17.
- Clarke JD, Novak P, Lake AD, Shipkova P, Aranibar N, Robertson D, Severson PL, Reily MD, Futscher BW, Lehman-McKeeman LD, Cherrington NJ.** Characterization of hepatocellular carcinoma related genes and metabolites in human non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci.* 2014; 59:365-374.
- Cornide-Petronio ME, Negrete-Sánchez E, Mendes-Braz M, Casillas-Ramírez A, Bujaldon E, Meroño N, Martínez-Carreres L, Gracia-Sancho J, Rodés J, Jiménez-Castro MB, Peralta C.** The Effect of High-Mobility Group Box 1 in Rat Steatotic and Nonsteatotic Liver Transplantation from Donors After Brain Death. *Am J Transplant.* 2016; 16:1148-1159.
- Cottart CH, Do L, Blanc MC, Vaubourdolle M, Descamps G, Durand D, Galen FX, Clot JP.** Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology.* 1999; 29:809-813.
- Coulon S, Francque S, Colle I, Verrijken A, Blomme B, Heindryckx F, De Munter S, Prawitt J, Caron S, Staels B, Van Vlierberghe H, Van Gaal L, Geerts A.** Evaluation of inflammatory and angiogenic factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine.* 2012; 59:442-449.
- Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ.** The mystery of liver regeneration. *Br J Surg.* 2002; 89:1089-1095.
- Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L.** VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci.* 2003; 28:488-494.

- Crowley H, Lewis WD, Gordon F, Jenkins R, Khettry U.** Steatosis in donor and transplant liver biopsies. *Hum Pathol.* 2000; 31:1209-1213.
- Cursio R, Miele C, Filippa N, Van Obberghen E, Gugenheim J.** Alterations in protein tyrosine kinase pathways in rat liver following normothermic ischemia-reperfusion. *Transplant Proc.* 2006; 38:3362-3365.
- Curzio M, Esterbauer H, Dianzani MU.** Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. *Int J Tissue React.* 1985; 7:137-142.
- Day, CP, James OF.** Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998; 114:842-845.
- De Meijer VE, Kalish BT, Puder M, Ijzermans JN.** Systematic review and meta-analysis of steatosis as a risk factor in major hepatic resection. *Br J Surg.* 2010; 97:1331-1339.
- Denizot Y, Leguyader A, Cornu E, Laskar M, Orsel I, Vincent C, Nathan N.** Release of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) during coronary artery bypass surgery. *J Cardiothorac Surg.* 2007; 2:38.
- Desdouets C, Thoresen GH, Senamaud-Beaufort C, Christoffersen T, Brechot C, Sobczak-Thepot J.** cAMP-dependent positive control of cyclin A2 expression during G1/S transition in primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 261:118-122.
- Di Marco GS, Reuter S, Hillebrand U, Amler S, König M, Larger E, Oberleithner H, Brand E, Pavenstädt H, Brand M.** The soluble VEGF receptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20:2235-2245.
- Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z, Mittal V, Kobayashi H, Shido K, Lyden D, Sato TN, Rabbany SY, Rafii S.** Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature.* 2010; 468:310-315.
- Dulundu E, Ozel Y, Topaloglu U, Sehirlı O, Ercan F, Gedik N, Sener G.** Alpha-lipoic acid protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Pharmacology.* 2007; 79:163-170.
- Dworakowska B, Nurowska E, Dołowy K.** Hydrocortisone inhibition of wild-type and α D200Q nicotinic acetylcholine receptors. *Chem Biol Drug Des.* 2018; 92:1610-1617.
- Elias-Miró M, Massip-Salcedo M, Jimenez-Castro M, Peralta C.** Does adiponectin benefit steatotic liver transplantation? *Liver Transpl.* 2011; 17:993-1004.
- Elias-Miró M, Jiménez-Castro MB, Mendes-Braz M, Casillas-Ramírez A, Peralta C.** The Current Knowledge of the Role of PPAR in Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *PPAR Res.* 2012; 2012:802384.
- Elias-Miró M, Jiménez-Castro MB, Rodés J, Peralta C.** Current knowledge on oxidative stress in hepatic ischemia/reperfusion. *Free Radic Res.* 2013; 47:555-568.

Elias-Miró M, Mendes-Braz M, Cereijo R, Villarroya F, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J, Guixé-Muntet S, Massip-Salcedo M, Domingo JC, Bermudo R, Rodés J, Peralta C. Resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. *J Hepatol.* 2014; 60:87-95.

Enami Y, Kato H, Murakami M, Fujioka T, Aoki T, Niiya T, Murai N, Ohtsuka K, Kusano M. Anti-transforming growth factor-beta1 antibody transiently enhances DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2001; 8:250-258.

Fang H, Liu A, Dahmen U, Dirsch O. Dual role of chloroquine in liver ischemia reperfusion injury: reduction of liver damage in early phase, but aggravation in late phase. *Cell Death Dis.* 2013; 4:e694.

Farrell GC. Probing Prometheus: fat fueling the fire? *Hepatology.* 2004; 40:1252-1255.

Farrell GC, Teoh NC, McCuskey RS. Hepatic microcirculation in fatty liver disease. *Anat Rec (Hoboken).* 2008; 291:684-692.

Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol.* 2000; 32:19-31.

Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology.* 2004; 39:1477-1487.

Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology.* 2006; 43:S45-S53.

Ferguson DM, Gores GJ, Ludwig J, Krom RA. UW solution protects against reperfusion injury by inhibiting lipid peroxidation. *Transplant Proc.* 1991; 23:1552-1553.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9:669-676.

Fiorini RN, Donovan JL, Rodwell D, Evans Z, Cheng G, May HD, Milliken CE, Markowitz JS, Campbell C, Haines JK, Schmidt MG, Chavin KD. Short-term administration of (-)-epigallocatechin gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. *Liver Transpl.* 2005; 11:298-308.

Fondevila C, Shen XD, Moore C, Busuttil RW, Coito AJ. Cyclic RGD peptides with high affinity for alpha5beta1 integrin protect genetically fat Zucker rat livers from cold ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2005; 37:1679-1681.

Forbes SJ, Newsome PN. Liver regeneration - mechanisms and models to clinical application. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016; 13:473-485.

Fuentes Arderiu X, Castiñeiras Lacambra MJ, Queraltó Compañó JM Eds. Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Volumen II. Editorial Reverté. 1998. ISBN: 8429118551.

Fukumori T, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Why is fatty liver unsuitable for transplantation? Deterioration of mitochondrial ATP synthesis and sinusoidal structure during cold preservation of a liver with steatosis. *Transplant Proc.* 1997; 29:412-415.

- Gampel A, Moss L, Jones MC, Brunton V, Norman JC, Mellor H.** VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. *Blood*. 2006; 108:2624-2631.
- Garbus I, Bouzat C, Barrantes FJ.** Steroids differentially inhibit the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroreport*. 2001; 12:227-231.
- Garcea G, Maddern GJ.** Liver failure after major hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2009; 16:145-155.
- García-Valdecasas JC, Fuster J, Fondevila C, Calatayud D.** [Adult living-donor liver transplantation]. *Gastroenterol Hepatol*. 2009; 32:577-583.
- Garden OJ, Rees M, Poston GJ, Mirza D, Saunders M, Ledermann J, Primrose JN, Parks RW.** Guidelines for resection of colorectal cancer liver metastases. *Gut*. 2006; 55:iii1-8.
- Garrido-Urbani S, Bradfield PF, Lee BP, Imhof BA.** Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36:203-211.
- Gathercole LL, Stewart PM.** Targeting the pre-receptor metabolism of cortisol as a novel therapy in obesity and diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; 122:21-27.
- Geiseler SJ, Morland C.** The Janus Face of VEGF in Stroke. *Int J Mol Sci*. 2018;19.pii: E1362.
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*. 1998; 273:30336-30343.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H.** Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983; 31:13-20.
- Ghoshal AK, Farber E.** Choline deficiency, lipotrope deficiency and the development of liver disease including liver cancer: a new perspective. *Lab Invest*. 1993; 68:255-260.
- Giakoustidis D, Papageorgiou G, Iliadis S, Kontos N, Kostopoulou E, Papachrestou A, Tsantilas D, Spyridis C, Takoudas D, Botsoglou N, Dimitriadou A, Giakoustidis E.** Intramuscular administration of very high dose of alpha-tocopherol protects liver from severe ischemia/reperfusion injury. *World J Surg*. 2002; 26:872-877.
- Gim SA, Koh PO.** Melatonin attenuates hepatic ischemia through mitogen-activated protein kinase signaling. *J Surg Res*. 2015; 198:228-236.
- Gissen P, Arias IM.** Structural and functional hepatocyte polarity and liverdisease. *J Hepatol*. 2015; 63:1023-1037.
- Godwin A, Yang WL, Sharma A, Khader A, Wang Z, Zhang F, Nicastro J, Coppa GF, Wang P.** Blocking cold-inducible RNA-binding protein protects liver from ischemia-reperfusion injury. *Shock*. 2015; 43:24-30.

Gómez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2008; 283:14581-14589.

Gönç EN, Kandemir N, Andiran N, Ozön A, Yordam N. Cholestatic hepatitis as a result of severe cortisol deficiency in early infancy: report of two cases and review of literature. *Turk J Pediatr.* 2006; 48:376-379.

Gordon S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *J Clin Invest.* 2007; 117:89-93.

Gracia-Sancho J, Casillas-Ramírez A, Peralta C. Molecular pathways in protecting the liver from ischaemia/reperfusion injury: a 2015 update. *Clin Sci (Lond).* 2015; 129:345-362.

Grande L, Roselló-Catafau J, Peralta C. El preacondicionamiento isquémico del hígado: de las bases moleculares a la aplicación clínica. *Cir Esp.* 2006; 80:275-282.

Grattagliano I, Vendemiale G, Caraceni P, Domenicali M, Nardo B, Cavallari A, Trevisani F, Bernardi M, Altomare E. Starvation impairs antioxidant defense in fatty livers of rats fed a choline-deficient diet. *J Nutr.* 2000; 130:2131-2136.

Gu Y, Sowa JP, Paul A, Gerken G, Schlaak JF. Vascular endothelial growth factor improves liver regeneration and survival after 90% hepatectomy in a rat model of diet-induced steatosis. *Digestion.* 2013; 88:235-242.

Guerrero M, Crisafulli E, Liapikou A, Huerta A, Gabarrús A, Chetta A, Soler N, Torres A. Readmission for Acute Exacerbation within 30 Days of Discharge Is Associated with Subsequent Progressive Increase in Mortality Risk in COPD Patients: A Long-Term Observational Study. *PLoS One.* 2016;11:e0150737.

Gupta NA, Kolachala VL, Jiang R, Abramowsky C, Shenoi A, Kosters A, Pavuluri H, Anania F, Kirk AD. Mitigation of autophagy ameliorates hepatocellular damage following ischemia-reperfusion injury in murine steatotic liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014; 307:G1088-G1099.

Hajiasgharzadeh, K, Baradaran, B. Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway and the Liver. *Adv Pharm Bull.* 2017; 7:507-513.

Hanaoka J, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Sugimoto K, Saito Y, Yamada S, Asanoma M. Beneficial effects of enteral nutrition containing with hydrolyzed whey peptide on warm ischemia/reperfusion injury in the rat liver. *Hepatol Res.* 2014; 44:114-121.

Harada N, Okajima K, Murakami K, Usune S, Sato C, Ohshima K, Katsuragi T. Adenosine and selective A(2A) receptor agonists reduce ischemia/reperfusion injury of rat liver mainly by inhibiting leukocyte activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 294:1034-1042.

Hartmann P, Fet N, Garab D, Szabó A, Kaszaki J, Srinivasan PK, Tolba RH, Boros M. L- α -glycerylphosphorylcholine reduces the microcirculatory dysfunction and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase type 4 induction after partial hepatic ischemia in rats. *J Surg Res.* 2014; 189:32-40.

- Hausman DB, Lu J, Ryan DH, Flatt WP, Harris RB.** Compensatory growth of adipose tissue after partial lipectomy: involvement of serum factors. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004; 229:512-520.
- Hirota H, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T.** Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J Exp Med*. 1996; 183:2627-2634.
- Honda Y, Ohno S, Nakajin S.** Leydig cells from neonatal pig testis abundantly express 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-HSD) type 2 and effectively inactivate cortisol to cortisone. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008; 108:91-101.
- Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I.** Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007; 56:901-911.
- Huang J, Yue S, Ke B, Zhu J, Shen XD, Zhai Y, Yamamoto M, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW.** Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 regulates toll-like receptor 4 innate responses in mouse liver ischemia-reperfusion injury through Akt-forkhead box protein O1 signaling network. *Transplantation*. 2014; 98:721-728.
- Huguet C, Gavelli A, Chieco PA, Bona S, Harb J, Joseph JM, Jobard J, Gramaglia M, Lasserre M.** Liver ischemia for hepatic resection: where is the limit? *Surgery*. 1992; 111:251-259.
- Hui AM, Kawasaki S, Makuuchi M, Nakayama J, Ikegami T, Miyagawa S.** Liver injury following normothermic ischemia in steatotic rat liver. *Hepatology*. 1994; 20:1287-1293.
- Husted TL, Lentsch AB.** The role of cytokines in pharmacological modulation of hepatic ischemia/reperfusion injury. *Curr Pharm Des*. 2006; 12:2867-2873.
- Ibrahim MA, Abdel-Gaber SA, Amin EF, Ibrahim SA, Mohammed RK, Abdelrahman AM.** Molecular mechanisms contributing to the protective effect of levosimendan in liver ischemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*. 2014; 741:64-73.
- Ichiki A, Miyazaki T, Nodera M, Suzuki H, Yanagisawa H.** Ascorbate inhibits apoptosis of Kupffer cells during warm ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology*. 2008; 55:338-344.
- Infanger M, Faramarzi S, Grosse J, Kurth E, Ulbrich C, Bauer J, Wehland M, Kreutz R, Kossmehl P, Paul M, Grimm D.** Expression of vascular endothelial growth factor and receptor tyrosine kinases in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*. 2007; 16:291-299.
- Jaeschke H.** Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 15:718-724.
- Jarnagin W. Ed.** Blumgart's Surgery of the Liver, Biliary Tract and Pancreas, 2-Volume Set. 6th Edition. Elsevier. 2016. ISBN: 978-0-323-34062-5.
- Jaroszewicz J, Januszkiewicz M, Flisiak R, Rogalska M, Kalinowska A, Wierzbicka I.** Circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in patients with liver cirrhosis: possible association with hepatic function impairment. *Cytokine* 2008; 44:14-17.

- Ji H, Zhang Y, Liu Y, Shen XD, Gao F, Nguyen TT, Busuttil RW, Waschek JA, Kupiec-Weglinski JW. Vasoactive intestinal peptide attenuates liver ischemia/reperfusion injury in mice via the cyclic adenosine monophosphate-protein kinase a pathway. *Liver Transpl.* 2013; 19:945-956.
- Jiang W, Kong L, Ni Q, Lu Y, Ding W, Liu G, Pu L, Tang W, Kong L. miR-146a ameliorates liver ischemia/reperfusion injury by suppressing IRAK1 and TRAF6. *PLoS One.* 2014; 9:e101530.
- Jiménez-Castro MB, Elias-Miro M, Mendes-Braz M, Lemoine A, Rimola A, Rodés J, Casillas-Ramírez A, Peralta C. Tauroursodeoxycholic acid affects PPAR γ and TLR4 in Steatotic liver transplantation. *Am J Transplant.* 2012; 12:3257-3271.
- Jiménez-Castro MB, Elias-Miró M, Casillas-Ramírez A, Peralta C. Experimental Models in Liver Surgery. In: Hesham Abdeldayem Ed. *Hepatic Surgery.* IntechOpen. 2013a. ISBN 978-953-51-0965-5.
- Jiménez-Castro MB, Casillas-Ramírez A, Mendes-Braz M, Massip-Salcedo M, Gracia-Sancho J, Elias-Miró M, Rodés J, Peralta C. Adiponectin and resistin protect steatotic livers undergoing transplantation. *J Hepatol.* 2013b; 59:1208-1214.
- Jiménez-Castro MB, Meroño N, Mendes-Braz M, Gracia-Sancho J, Martínez-Carreres L, Cornide-Petronio ME, Casillas-Ramirez A, Rodés J, Peralta C. The effect of brain death in rat steatotic and non-steatotic liver transplantation with previous ischemic preconditioning. *J Hepatol.* 2015; 62:83-91.
- Jiménez-Castro MB, Negrete-Sánchez E, Casillas-Ramírez A, Gulfo J, Álvarez-Mercado AI, Cornide-Petronio ME, Gracia-Sancho J, Rodés J, Peralta C. The effect of cortisol in rat steatotic and non-steatotic liver transplantation from brain-dead donors. *Clin Sci (Lond).* 2017; 131:733-746.
- Joharapurkar A, Dhanesha N, Shah G, Kharul R, Jain M. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: potential therapeutic target for metabolic syndrome. *Pharmacol Rep.* 2012; 64:1055-1065.
- Jones CK, Byun N, Bubser M. Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists and allosteric modulators for the treatment of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 2012; 37:16-42.
- Jones RT, Toledo-Pereyra LH, Quesnelle KM. Selectins in Liver Ischemia and Reperfusion Injury. *J Invest Surg.* 2015; 28:292-300.
- Kambakamba P, Linecker M, Schneider M, Kron P, Limani P, Tschuor C, Ungethüm U, Humar B, Clavien PA. Novel Benefits of Remote Ischemic Preconditioning Through VEGF-dependent Protection From Resection-induced Liver Failure in the Mouse. *Ann Surg.* 2018; 268:885-893.
- Kang JW, Cho HI, Lee SM. Melatonin inhibits mTOR-dependent autophagy during liver ischemia/reperfusion. *Cell Physiol Biochem.* 2014; 33:23-36.
- Kanno M, Ohkohchi N, Terashima T, Seya K, Taguchi Y, Mori S, Inaba H. Lipid peroxidation of parenchymal hepatocytes during cold preservation and after reoxygenation in rats. *Transplant Proc.* 1993; 25:2716-2721.

Kargi AY, Iacobellis G. Adipose tissue and adrenal glands: novel pathophysiological mechanisms and clinical applications. *Int J Endocrinol.* 2014; 2014:614074.

Katsu Y, Iguchi T. Cortisol. In: Yoshio Takei, Hironori Ando, Kazuyoshi Tsutsui Eds. Handbook of hormones: Comparative Endocrinology for Basic Clinical Research. 1st Edition. Academic Press. 2015. ISBN: 978-0-12801-028-0

Katsumi H, Fukui K, Sato K, Maruyama S, Yamashita S, Mizumoto E, Kusamori K, Oyama M, Sano M, Sakane T, Yamamoto A. Pharmacokinetics and preventive effects of platinum nanoparticles as reactive oxygen species scavengers on hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Metallomics.* 2014; 6:1050-1056.

Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 226:324-328.

Kershaw, E. E. and Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:2548–2556.

Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, Zhang BB, Bonaldo P, Chua S, Scherer PE. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol.* 2009; 29:1575-1591.

Khandoga A, Mende K, Iskandarov E, Rosentreter D, Schelcher C, Reifart J, Jauch KW, Thasler WE. Augmenter of liver regeneration attenuates inflammatory response in the postischemic mouse liver in vivo. *J Surg Res.* 2014; 192:187-194.

Kim HJ, Joe Y, Kong JS, Jeong SO, Cho GJ, Ryter SW, Chung HT. Carbon monoxide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury via ROS-dependent Akt signaling and inhibition of glycogen synthase kinase 3 β . *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013:306421

Kireev R, Bitoun S, Cuesta S, Tejerina A, Ibarrola C, Moreno E, Vara E, Tresguerres JA. Melatonin treatment protects liver of Zucker rats after ischemia/reperfusion by diminishing oxidative stress and apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2013; 701:185-193.

Kistemaker LE, van Os RP, Dethmers-Ausema A, Bos IS, Hylkema MN, van den Berge M, Hiemstra PS, Wess J, Meurs H, Kerstjens HA, Gosens R. Muscarinic M3 receptors on structural cells regulate cigarette smoke-induced neutrophilic airway inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015; 308:L96-103.

Kitagawa T, Yokoyama Y, Kokuryo T, Nagino M. Protective effects of branched-chain amino acids on hepatic ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats: a direct attenuation of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013; 304:G346-55.

Knudsen AR, Kannerup AS, Grønbaek H, Andersen KJ, Funch-Jensen P, Frystyk J, Flyvbjerg A, Mortensen FV. Effects of ischemic pre- and postconditioning on HIF-1 α , VEGF and TGF- β expression after warm ischemia and reperfusion in the rat liver. *Comp Hepatol.* 2011; 10:3

Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J.* 2011; 437:169-183.

Koch, S, Claesson-Welsh, L. Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2:a006502.

Koh EJ, Yoon SJ, Lee SM. Losartan protects liver against ischaemia/reperfusion injury through PPAR- γ activation and receptor for advanced glycation end-products down-regulation. *Br J Pharmacol.* 2013; 169:1404-1416.

Kommareddy S, Amiji M. Antiangiogenic gene therapy with systemically administered sFlt-1 plasmid DNA in engineered gelatin-based nanovectors. *Cancer Gene Ther.* 2007; 14:488-498.

Koneru B, Reddy MC, dela Torre AN, Patel D, Ippolito T, Ferrante RJ. Studies of hepatic warm ischemia in the obese Zucker rat. *Transplantation.* 1995; 59:942-946.

Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg.* 2003; 197:634-659.

Koteish, A. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis.* 2001; 21:89-104.

Kudoh K, Uchinami H, Yoshioka M, Seki E, Yamamoto Y. Nrf2 activation protects the liver from ischemia/reperfusion injury in mice. *Ann Surg.* 2014; 260:118-127.

Kuntz E, Kuntz HD Eds. Hepatology Textbook and Atlas. 3rd Edition. Springer. 2008. ISBN: 978-3-540-76839-5.

Kuroda S, Tashiro H, Kimura Y, Hirata K, Tsutada M, Mikuriya Y, Kobayashi T, Amano H, Tanaka Y, Ohdan H. Rho-kinase inhibitor targeting the liver prevents ischemia/reperfusion injury in the steatotic liver without major systemic adversity in rats. *Liver Transpl.* 2015; 21:123-131.

Launay JM, Mouillet-Richard S, Baudry A, Pietri M, Kellermann O. Raphe-mediated signals control the hippocampal response to SRI antidepressants via miR-16. *Transl Psychiatry.* 2011; 1:e56.

Letteron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol.* 1996; 24:200-208.

Li F, Chen Z, Pan Q, Fu S, Lin F, Ren H, Han H, Billiar TR, Sun F, Li Q. The protective effect of PNU-282987, a selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist, on the hepatic ischemia-reperfusion injury is associated with the inhibition of high-mobility group box 1 protein expression and nuclear factor κB activation in mice. *Shock.* 2013; 39:197-203.

Li L, Li G, Yu C, Shen Z, Xu C, Feng Z, Zhang X, Li Y. A role of microRNA-370 in hepatic ischaemia-reperfusion injury by targeting transforming growth factor- β receptor II. *Liver Int.* 2015a; 35:1124-1132.

Li Y, Li T, Qi H, Yuan F. Minocycline protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Biomed Rep.* 2015b; 3:19-24.

- Li J, Xue F, Xu X, Lu J, Dong D, Shi A, Lv Y.** An optimized procedure for stained bloodless anatomic hepatectomy in canines. *J Surg Res.* 2016; 200:508-513.
- Li S, Fujino M, Takahara T, Li XK.** Protective role of heme oxygenase-1 in fatty liver ischemia-reperfusion injury. *Med Mol Morphol.* 2019; 52:61-72.
- Liao X, Zhou S, Zong J, Wang Z.** Sevoflurane exerts protective effects on liver ischemia/reperfusion injury by regulating NFKB3 expression via miR-9-5p. *Exp Ther Med.* 2019; 17:2632-2640.
- Lim S, Kaldis P.** Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* 2013; 140:3079-3093.
- Liu PG, He SQ, Zhang YH, Wu J.** Protective effects of apocynin and allopurinol on ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol.* 2008; 14:2832-2837.
- Liu A, Fang H, Dahmen U, Dirsch O.** Chronic lithium treatment protects against liver ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver Transpl.* 2013a; 19:762-772.
- Liu A, Fang H, Yang Y, Sun J, Fan H, Liu S, Dirsch O, Dahmen U.** The fibrin-derived peptide b β 15-42 attenuates liver damage in a rat model of liver ischemia/reperfusion injury. *Shock.* 2013b; 39:397-403.
- Liu B, Ma ZY, Wu G, Qian JM.** Butyrate protects rats from hepatic ischemia/reperfusion injury. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8:5406-5413.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25:402-408.
- Livingstone DE, Walker BR.** Is 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 a therapeutic target? Effects of carbenoxolone in lean and obese Zucker rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 305:167-172.
- Losada DM, Chies AB, Feres O, Chaib E, D'Albuquerque LA, Castro-e-Silva O.** Effects of hyperbaric oxygen therapy as hepatic preconditioning in rats submitted to hepatic ischemia/reperfusion injury. *Acta Cir Bras.* 2014; 29:61-66.
- Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, Hochberg RB, McKay L, Renoir JM, Weigel NL, Wilson EM, McDonnell DP, Cidlowski JA.** International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol Rev.* 2006; 58:782-797.
- Lucas ML, Rhoden CR, Rhoden EL, Zettler CG, Mattos AA.** Effects of L-arginine and L-NAME on ischemia-reperfusion in rat liver. *Acta Cir Bras.* 2015; 30:345-352.
- Mahmoud MF, Gamal S, El-Fayoumi HM.** Limonin attenuates hepatocellular injury following liver ischemia and reperfusion in rats via toll-like receptor dependent pathway. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:676-682.
- Makuuchi M, Mori T, Gunvén P, Yamazaki S, Hasegawa H.** Safety of hemihepatic vascular occlusion during resection of the liver. *Surg Gynecol Obstet.* 1987; 164:155-158.

- Malik R, Selden C, Hodgson H.** The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol.* 2002; 13:425-431.
- Malumbres M, Barbacid M.** Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.* 2005; 30:630-641.
- Mao SA, Glorioso JM, Nyberg SL.** Liver regeneration. *Transl Res.* 2014; 163:352-362.
- Marshall KM, He S, Zhong Z, Atkinson C, Tomlinson S.** Dissecting the complement pathway in hepatic injury and regeneration with a novel protective strategy. *J Exp Med.* 2014; 211:1793-1805.
- Mason HL, Myers CS, Kendall EC** Chemical studies of the suprarenal cortex. IV. Structures of compounds C, D, E, F, and G. *J Biol Chem.* 1938; 124:459-474.
- Matsumoto T, Claesson-Welsh L.** VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE.*2001;2001:re21.
- Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ.** Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology.* 1999; 116:1413-1419.
- Mayoral P, Criado M, Hidalgo F, Flores O, Arévalo MA, Eleno N, Sánchez-Rodríguez A, López-Novoa JM, Esteller A.** Effects of chronic nitric oxide activation or inhibition on early hepatic fibrosis in rats with bile duct ligation. *Clin Sci (Lond).* 199;96 :297-305.
- McCormack L, Dutkowski P, El-Badry AM, Clavien PA.** Liver transplantation using fatty livers: always feasible? *J Hepatol.* 2011;54 :1055-1062.
- Mende K, Reifart J, Rosentreter D, Manukyan D, Mayr D, Krombach F, Rentsch M, Khandoga A.** Targeting platelet migration in the postischemic liver by blocking protease-activated receptor 4. *Transplantation.* 2014; 97:154-160.
- Mendes-Braz M, Elias-Miró M, Kleuser B, Fayyaz S, Jiménez-Castro MB, Massip-Salcedo M, Gracia-Sancho J, Ramalho FS, Rodes J, Peralta C.** The effects of glucose and lipids in steatotic and non-steatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischaemia-reperfusion. *Liver Int.* 2014;34:e271-289.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC.** Liver regeneration. *Science.* 1997; 276:60-66.
- Michalopoulos GK.** Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 2007; 213:286-300.
- Miki C, Iriyama K, Mirza DF, Mayer AD, Buckels JAC, Suzuki H, McMaster P.** Postperfusion energy metabolism of steatotic graft and its relation to early graft viability following liver transplantation. *Dig Dis Sci* 1998; 43:74-79.
- Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J.** A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:11960-11965.
- Miyagawa S, Makuuchi M, Kawasaki S, Kakazu T, Hayashi K, Kasai H.** Serum Amylase elevation following hepatic resection in patients with chronic liver disease. *Am J Surg.* 1996; 171:235-238.

Mizuno S, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: a regenerative drug for acute hepatitis and liver cirrhosis. *Regen Med.* 2007; 2:161-170.

Morsy MA. Protective effect of lisinopril on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Indian J Pharmacol.* 2011; 43:652-655.

Nadal C. Dose-related opposite effects of hydrocortisone on hepatocyte proliferation in the rat. *Liver.* 1995; 15:63-69.

Nakamura T, Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010; 86:588-610.

Nakano H, Nagasaki H, Yoshida K, Kigawa G, Fujiwara Y, Kitamura N, Kuzume M, Takeuchi S, Sasaki J, Shimura H, Yamaguchi M, Kumada K. N-acetylcysteine and anti-ICAM-1 monoclonal antibody reduces ischemia-reperfusion injury of the steatotic rat liver. *Transplant Proc.* 1998; 30:3763.

Nakatani K, Kaneda K, Seki S, Nakajima Y. Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. *Med Electron Microsc.* 2004; 37:29-36.

Nardo B, Grattagliano I, Domenicali M, Caraceni P, Catena F, Santoni B, Turi P, Cavallari G, Dall'Agata M, Trevisani F, Bernardi M, Cavallari A. Mitochondrial oxidative injury in rat fatty livers exposed to warm ischemia-reperfusion. *Transplant Proc.* 2000; 32:51.

Nardo B, Caraceni P, Pasini P, Domenicali M, Catena F, Cavallari G, Santoni B, Maiolini E, Grattagliano I, Vendemiale G, Trevisani F, Roda A, Bernardi M, Cavallari A. Increased generation of reactive oxygen species in isolated rat fatty liver during postischemic reoxygenation. *Transplantation.* 2001; 71:1816-18120.

Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, Tasoulis MK, Lykoudis PM, Theodoraki K, Nastou D, Smyrniotis V, Arkadopoulos N. Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014:906965.

Natori S, Selzner M, Valentino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA, Gores GJ. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation.* 1999; 68:89-96.

Nejak-Bowen K, Orr A, Bowen WC Jr, Michalopoulos GK. Conditional genetic elimination of hepatocyte growth factor in mice compromises liver regeneration after partial hepatectomy. *PLoS One.* 2013;8:e59836.

Nelson DL, Cox MM Eds. Lehninger Principios de Bioquímica. 4a Edición. Ediciones Omega. 2006. ISBN 978-8-428-21410-0.

Ninomiya M, Harada N, Shiotani S, Hiroshige S, Minagawa R, Soejima Y, Suehiro T, Nishizaki T, Shimada M, Sugimachi K. Hepatocyte growth factor and transforming growth factor beta1 contribute to regeneration of small-for-size liver graft immediately after transplantation. *Transpl Int.* 2003; 16:814-819.

- Nishizaki T, Matsumata T, Yanaga K, Soejima Y, Yoshizumi T, Takenaka K, Sugimachi K. Management of hepatic duct injury during hemihepatic vascular occlusion. *Br J Surg*. 1996; 83:185.
- Nixon M, Upreti R, Andrew R. 5 α -Reduced glucocorticoids: a story of natural selection. *J Endocrinol*. 2012; 212:111-127.
- Nogueira MA, Coelho AM, Sampietre SN, Patzina RA, Pinheiro da Silva F, D'Albuquerque LA, Machado MC. Beneficial effects of adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel opener on liver ischemia/reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2014; 20:15319-15326.
- Nurowska E, Ruzzier F. Modulation of acetylcholine receptor channel kinetics by hydrocortisone. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1564:14-20.
- Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6:275-297.
- Ogawa K, Kondo T, Tamura T, Matsumura H, Fukunaga K, Murata S, Ohkohchi N. Interaction of kupffer cells and platelets determines the severity of ischemia-reperfusion injury in steatosis. *Tohoku J Exp Med*. 2014; 232:105-113.
- Okumura S, Teratani T, Fujimoto Y, Zhao X, Tsuruyama T, Masano Y, Kasahara N, Iida T, Yagi S, Uemura T, Kaido T, Uemoto S. Oral administration of polyamines ameliorates liver ischemia/reperfusion injury and promotes liver regeneration in rats. *Liver Transpl*. 2016; 22:1231-1244.
- Otte JB, de Ville de Goyet J, Reding R, Van Obbergh L, Veyckemans F, Carlier MA, De Kock M, Clement de Cleyt S, Clapuyt P, Sokal E, Lerut J, Delbeke I, Dierick V, Janssen M, Rosati R, Libert F. Pediatric liver transplantation: from the full-size liver graft to reduced, split, and living related liver transplantation. *Pediatr Surg Int*. 1998; 13:308-318.
- Ozawa K, Uemoto S, Tanaka K, Kumada K, Yamaoka Y, Kobayashi N, Inamoto T, Shimahara Y, Mori K, Honda K, et al. An appraisal of pediatric liver transplantation from living relatives. Initial clinical experiences in 20 pediatric liver transplantations from living relatives as donors. *Ann Surg*. 1992; 216:547-553.
- Palestino-Domínguez M, Clavijo-Cornejo D, Gutiérrez-Ruiz MC, Gómez-Quiroz LE. El factor de crecimiento de hepatocitos y su receptor c-met en la protección contra el daño hepático inducido por el alcohol. *REB* 2012; 31: 118-126.
- Pan S, Liu L, Pan H, Ma Y, Wang D, Kang K, Wang J, Sun B, Sun X, Jiang H. Protective effects of hydroxytyrosol on liver ischemia/reperfusion injury in mice. *Mol Nutr Food Res*. 2013; 57:1218-1227.
- Paranjpe S, Bowen WC, Bell AW, Nejak-Bowen K, Luo JH, Michalopoulos GK. Cell cycle effects resulting from inhibition of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in regenerating rat livers by RNA interference. *Hepatology*. 2007; 45:1471-1477.

- Park J, Kang JW, Lee SM.** Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway by nicotine attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury via heme oxygenase-1 induction. *Eur J Pharmacol.* 2013; 707:61-70.
- Peach CJ, Mignone VW, Arruda MA, Alcobia DC, Hill SJ, Kilpatrick LE, Woolard J.** Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int J Mol Sci.* 2018;19. pii: E1264.
- Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Roselló-Catafau J.** Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology.* 1999; 30 :1481-1489.
- Peralta C, Fernández L, Panés J, Prats N, Sans M, Piqué JM, Gelpí E, Roselló-Catafau J.** Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology.* 2001; 33:100-113.
- Peralta C, Bulbena O, Xaus C, Prats N, Cutrin JC, Poli G, Gelpi E, Roselló-Catafau J.** Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation.* 2002; 73:1203-1211.
- Peralta C, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J.** Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol.* 2013; 59:1094-1106.
- Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS.** Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron.* 2012; 76:116-129.
- Pocock G, Richards CD Eds.** Human Physiology: The Basis of Medicine. 3rd Edition. *Oxford University Press.* 2006. ISBN: 9780198568780.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM Eds.** Neuroscience. 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc. 2004. ISBN: 978-0-878-93725-7.
- Rafii S, Butler JM, Ding BS.** Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature.* 2016; 529:316-325.
- Ramalho FS, Fernandez-Monteiro I, Rosello-Catafau J, Peralta C.** Hepatic microcirculatory failure. *Acta Cir Bras.* 2006; 21:48-53.
- Ramalho FS, Alfany-Fernandez I, Casillas-Ramirez A, Massip-Salcedo M, Serafín A, Rimola A, Arroyo V, Rodés J, Roselló-Catafau J, Peralta C.** Are angiotensin II receptor antagonists useful strategies in steatotic and nonsteatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion? *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 329:130-140.
- Ramalho LN, Pasta ÂA, Terra VA, Augusto M, Sanches SC, Souza-Neto FP, Cecchini R, Gulin F, Ramalho FS.** Rosmarinic acid attenuates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 2014; 74:270-278.

- Raptis DA, Limani P, Jang JH, Ungethüm U, Tschuor C, Graf R, Humar B, Clavien PA.** GPR120 on Kupffer cells mediates hepatoprotective effects of ω 3-fatty acids. *J Hepatol.* 2014; 60:625-632.
- Rashid A, Wu TC, Huang CC, Chen CH, Lin HZ, Yang SQ, Lee FY, Diehl AM.** Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology.* 1999; 29:1131-1138.
- Rhen T, Cidlowski JA.** Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med.* 2005; 353:1711-1723.
- Riehle KJ, Hoagland V, Benz W, Campbell JS, Liggitt DH, Langdale LA.** Hepatocellular heme oxygenase-1: a potential mechanism of erythropoietin-mediated protection after liver ischemia-reperfusion injury. *Shock.* 2014; 42:424-431.
- Rizzo AJ, Heilpern P, Webb TE** Temporal Changes in DNA and RNA Synthesis in the Regenerating Liver of Hydrocortisone treated Rats. *Cancer Res.* 1971; 31:876–881.
- Sahin T, Begeç Z, Toprak Hİ, Polat A, Vardi N, Yücel A, Durmuş M, Ersoy MÖ.** The effects of dexmedetomidine on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res.* 2013; 183:385-390.
- Saidi RF, Rajeshkumar B, Shariftabrizi A, Dresser K, Walter O.** Human C1 inhibitor attenuates liver ischemia-reperfusion injury and promotes liver regeneration. *J Surg Res.* 2014; 187:660-666.
- Sakai S, Tajima H, Miyashita T, Nakanuma S, Makino I, Hayashi H, Nakagawara H, Kitagawa H, Fushida S, Fujimura T, Saito H, Munesue S, Yamamoto Y, Ohta T.** Sivelestat sodium hydrate inhibits neutrophil migration to the vessel wall and suppresses hepatic ischemia-reperfusion injury. *Dig Dis Sci.* 2014; 59:787-794.
- Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, Yoshida N, Shibuya M.** Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:1076-1081.
- Salcedo Mora X, Sanz-Cameno P, Medina J, Martín-Vílchez S, García-Buey L, Borque MJ, Moreno-Otero R.** Association between angiogenesis soluble factors and disease progression markers in chronic hepatitis C patients. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97:699-706.
- Samuel, V. T. and Shulman, G.I.** Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metab.* 2018; 27:22-41.
- Sanches SC, Ramalho LN, Mendes-Braz M, Terra VA, Cecchini R, Augusto MJ, Ramalho FS.** Riboflavin (vitamin B-2) reduces hepatocellular injury following liver ischaemia and reperfusion in mice. *Food Chem Toxicol.* 2014; 67:65-71.
- Sandeep TC, Andrew R, Homer NZ, Andrews RC, Smith K, Walker BR.** Increased in vivo regeneration of cortisol in adipose tissue in human obesity and effects of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor carbenoxolone. *Diabetes.* 2005; 54:872-879.
- Sanyal A, Boyer T, Terrault N, Lindor K Eds.** Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease. 7th edition. Elsevier. 2017. ISBN: 9780323375917.

Savvanis S, Nastos C, Tasoulis MK, Papoutsidakis N, Demonakou M, Karmanioliou I, Arkadopoulou N, Smyrniotis V, Theodoraki K Sildenafil attenuates hepatocellular injury after liver ischemia reperfusion in rats: a preliminary study. *Oxid Med Cecll Longev.* 2014; 2014:161942.

Scholzen, T., Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182:311-322.

Selzner M, Camargo CA, Clavien PA. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6. *Hepatology.*1999 ;30:469-475.

Selzner M, Rüdiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology.* 2000; 32:1280-1288.

Selzner, M., Clavien P. A. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin Liver Dis* 2001; 21:105-113.

Selzner N, Selzner M, Tian Y, Kadry Z, Clavien PA. Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: A TNF-alpha/IL-6-dependent mechanism. *Hepatology.* 2002; 36:812-818.

Selzner N, Selzner M, Jochum W, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the steatotic mouse liver against reperfusion injury: an ATP dependent mechanism. *J Hepatol.* 2003; 39:55-61.

Serafín A, Roselló-Catafau J, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Peralta C. Ischemic preconditioning increases the tolerance of Fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am J Pathol.* 2002; 161:587-601.

Serafín A, Roselló-Catafau J, Prats N, Gelpí E, Rodés J, Peralta C. Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion. *Hepatology.* 2004a; 39:688-698.

Serafín A, Fernández-Zabalegui L, Prats N, Wu ZY, Roselló-Catafau J, Peralta C. Ischemic preconditioning: tolerance to hepatic ischemia-reperfusion injury. *Histol Histopathol.* 2004b; 19:281-289.

Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg.* 2001; 181:160-166.

Shen M, Lu J, Dai W, Wang F, Xu L, Chen K, He L, Cheng P, Zhang Y, Wang C, Wu D, Yang J, Zhu R, Zhang H, Zhou Y, Guo C. Ethyl pyruvate ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting intrinsic pathway of apoptosis and autophagy. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:461536.

Sherlock S, Dooley J Eds. Diseases of the liver and biliary system. 11th edition. Wiley-Blackwell Publishing Editorial. 2008. ISBN: 978-0-470-98681-3.

Shi H, Strader AD, Woods SC, Seeley RJ. Sexually dimorphic responses to fat loss after caloric restriction or surgical lipectomy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293:E316-326.

Shibuya, M. VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. *Biomol Ther (Seoul)*. 2014; 22:1-9.

Shimada S, Fukai M, Wakayama K, Ishikawa T, Kobayashi N, Kimura T, Yamashita K, Kamiyama T, Shimamura T, Taketomi A, Todo S. Hydrogen sulfide augments survival signals in warm ischemia and reperfusion of the mouse liver. *Surg Today*. 2015; 45:892-903.

Shimizu, K. Resveratrol Prevents Warm Ischemia-Reperfusion Injury in Liver Grafts From Non-Heart-Beating Donor Rats. *Transplant Proc*. 2016; 48:1221-1225.

Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, Shimazu M, Shirasugi N, Endo M, Mukai M, Kitajima M. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation*. 1997; 63:143-148.

Sikalias N, Karatzas T, Alexiou K, Mountzalia L, Demonakou M, Kostakis ID, Zacharioudaki A, Papalois A, Kouraklis G. Intermittent Ischemic Preconditioning Protects Against Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Extensive Hepatectomy in Steatotic Rat Liver. *J Invest Surg*. 2018; 31:366-377.

Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology*. 2001; 34:13-18.

Spiegel HU, Bremer C, Boin C, Langer M. Reduction of hepatic reperfusion injury by indomethacin-mediated vasoconstriction: a rat model with temporary splenocaval shunt. *J Invest Surg*. 1995; 8:363-369.

Squire L, Berg D, Blood FE, du Lac S, Ghosh A, Spitzer NC Eds. Fundamental Neuroscience. 4th Edition. Academic Press, Elsevier Editorial. 2012. ISBN 978-0-123-85870-2.

Stahn C, Löwenberg M, Hommes DW, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 275:71-78.

Stimson RH, Andersson J, Andrew R, Redhead DN, Karpe F, Hayes PC, Olsson T, Walker BR. Cortisol release from adipose tissue by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in humans. *Diabetes*. 2009; 58:46-53.

Sudo K, Yamada Y, Saito K, Shimizu S, Ohashi H, Kato T, Moriwaki H, Ito H, Seishima M. TNF-alpha and IL-6 signals from the bone marrow derived cells are necessary for normal murine liver regeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1782:671-679.

Sun CK, Zhang XY, Zimmermann A, Davis G, Wheatley AM. Effect of ischemia-reperfusion injury on the microcirculation of the steatotic liver of the Zucker rat. *Transplantation*. 2001; 72:1625-1631.

Sun Y, Pu LY, Lu L, Wang XH, Zhang F, Rao JH. N-acetylcysteine attenuates reactive-oxygen-species-mediated endoplasmic reticulum stress during liver ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2014; 20:15289-98.

Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018; 127:175-186.

- Suo L, Kang K, Wang X, Cao Y, Zhao H, Sun X, Tong L, Zhang F.** Carvacrol alleviates ischemia reperfusion injury by regulating the PI3K-Akt pathway in rats. *PLoS One.* 2014; 9:e104043.
- Sutter AG, Palanisamy AP, Ellet JD, Schmidt MG, Schnellmann RG, Chavin KD.** Intereukin-10 and Kupffer cells protect steatotic mice livers from ischemia-reperfusion injury. *Eur Cytokine Netw.* 2014; 25:69-76.
- Suyavaran A, Ramamurthy C, Mareeswaran R, Subastri A, Lokeswara Rao P, Thirunavukkarasu C.** TNF- α suppression by glutathione preconditioning attenuates hepatic ischemia reperfusion injury in young and aged rats. *Inflamm Res.* 2015; 64:71-81.
- Suzuki T, Yoshidome H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Takeuchi D, Kato A, Furukawa K, Yoshitomi H, Iida A, Dochi T, Miyazaki M.** Hepatocyte apoptosis is enhanced after ischemia/reperfusion in the steatotic liver. *J Clin Biochem Nutr.* 2011; 48:142-148.
- Taha MO, Caricati-Neto A, Ferreira RM, Simões Mde J, Monteiro HP, Fagundes DJ.** L-arginine in the ischemic phase protects against liver ischemia-reperfusion injury. *Acta Cir Bras.* 2012; 27:616-623.
- Takasu C, Vaziri ND, Li S, Robles L, Vo K, Takasu M, Pham C, Farzaneh SH, Shimada M, Stamos MJ, Ichii H.** Treatment with dimethyl fumarate ameliorates liver ischemia/reperfusion injury. *World J Gastroenterol.* 2017; 23:4508-4516.
- Takeyoshi I, Sunose Y, Iwazaki S, Tsutsumi H, Aiba M, Tomizawa N, Kawashima Y, Kasahara M, Kawate S, Ogawa T, Ohwada S, Matsumoto K, Morishita Y.** The effect of cyclooxygenase 2 inhibitor (FK3311) on ischemia-reperfusion injury with hepatectomy in dogs. *Transplant Proc.* 2000; 32:2322-2323.
- Tamagawa K, Horiuchi T, Uchinami M, Doi K, Yoshida M, Nakamura T, Sasaki H, Taniguchi M, Tanaka K.** Hepatic ischemia-reperfusion increases vascular endothelial growth factor and cancer growth in rats. *J Surg Res.* 2008; 148:158-163.
- Tanaka K, Uemoto S, Tokunaga Y, Fujita S, Sano K, Nishizawa T, Sawada H, Shirahase I, Kim HJ, Yamaoka Y, et al.** Surgical techniques and innovations in living related liver transplantation. *Ann Surg.* 1993; 217:82-91.
- Tanaka K, Shimada H, Togo S, Nagano Y, Endo I, Sekido H.** Outcome using hemihepatic vascular occlusion versus the pringle maneuver in resections limited to one hepatic section or less. *J Gastrointest Surg.* 2006; 10:980-986.
- Taneja C, Prescott L, Koneru B.** Critical preservation injury in rat fatty liver is to hepatocytes, not sinusoidal lining cells. *Transplantation.* 1998; 65:167-172.
- Tanemura A, Kuriyama N, Azumi Y, Ohsawa I, Kishiwada M, Mizuno S, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Isaji S.** Thrombomodulin administration attenuates ischemia-reperfusion injury of the remnant liver after 70% hepatectomy in rats: simulated model of small-for-size graft in living donor liver transplantation. *Transplant Proc.* 2014 ;46:1107-1111.

- Taniguchi E, Sakisaka S, Matsuo K, Tanikawa K, Sata M.** Expression and role of vascular endothelial growth factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Histochem Cytochem.* 2001; 49:121-130.
- Tao X, Wan X, Xu Y, Xu L, Qi Y, Yin L, Han X, Lin Y, Peng J.** Dioscin attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats through inhibition of oxidative-nitrative stress, inflammation and apoptosis. *Transplantation.* 2014; 98:604-611.
- Tarantino G, Finelli C.** Pathogenesis of hepatic steatosis: the link between hypercortisolism and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2013; 19:6735-6743.
- Targher G, Bertolini L, Zoppini G, Zenari L, Falezza G.** Relationship of non-alcoholic hepatic steatosis to cortisol secretion in diet-controlled Type 2 diabetic patients. *Diabet Med.* 2005; 22:1146-1150.
- Tashiro H, Kuroda S, Mikuriya Y, Ohdan H.** Ischemia-reperfusion injury in patients with fatty liver and the clinical impact of steatotic liver on hepatic surgery. *Surg Today.* 2014; 44:1611-1625.
- Taub, R.** Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5:836-847.
- Teoh NC, Ajamieh H, Wong HJ, Croft K, Mori T, Allison AC, Farrell GC.** Microparticles mediate hepatic ischemia-reperfusion injury and are the targets of Diannexin (ASP8597). *PLoS One.* 2014; 9:e104376.
- Teramoto K, Bowers JL, Kruskal JB, Clouse ME.** Hepatic microcirculatory changes after reperfusion in fatty and normal liver transplantation in the rat. *Transplantation.* 1993; 56:1076-1082.
- Tilg H, Hotamisligil GS.** Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology.* 2006; 131:934-945.
- Tiwari P, Dwivedi S, Singh MP, Mimshra R, Chandy A.** Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review. *Asian Pac J Trop Dis.* 2013; 3:413-420.
- Tolba RH, Pütz U, Decker D, Dombrowski F, Lauschke H.** L-carnitine ameliorates abnormal vulnerability of steatotic rat livers to cold ischemic preservation. *Transplantation.* 2003; 76:1681-1686.
- Torrecilla E, Fernández-Vázquez G, Vicent D, Sánchez-Franco F, Barabash A, Cabrerizo L, Sánchez-Pernaute A, Torres AJ, Rubio MA.** Liver upregulation of genes involved in cortisol production and action is associated with metabolic syndrome in morbidly obese patients. *Obes Surg.* 2012; 22:478-486.
- Tracey, K. J.** Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest.* 2007; 117:289-296.
- Trevisani F, Colantoni A, Caraceni P, Van Thiel DH.** The use of donor fatty liver for liver transplantation: a challenge or a quagmire? *J Hepatol.* 1996; 24:114-121.

- Tsuchihashi S, Ke B, Kaldas F, Flynn E, Busuttill RW, Briscoe DM, Kupiec-Weglinski JW.** Vascular endothelial growth factor antagonist modulates leukocyte trafficking and protects mouse livers against ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2006; 168:695-705.
- Tsurui Y, Sho M, Kuzumoto Y, Hamada K, Akashi S, Kashizuka H, Ikeda N, Nomi T, Mizuno T, Kanehiro H, Nakajima Y.** Dual role of vascular endothelial growth factor in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation.* 2005; 79:1110-1115.
- Turner R, Lozoya O, Wang Y, Cardinale V, Gaudio E, Alpini G, Mendel G, Wauthier E, Barbier C, Alvaro D, Reid LM.** Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *Hepatology.* 2011; 53:1035-1045.
- Uchiyama M, Tojo K, Yazawa T, Ota S, Goto T, Kurahashi K.** Edaravone prevents lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion. *J Surg Res.* 2015; 194:551-557.
- Uspenska K, Lykhmus O, Obolenskaya M, Pons S, Maskos U, Komisarenko S, Skok M.** Mitochondrial Nicotinic Acetylcholine Receptors Support Liver Cells Viability After Partial Hepatectomy. *Front Pharmacol.* 2018; 9:626.
- Vázquez-Gil MJ, Mesonero MJ, Flores O, Criado M, Hidalgo F, Arévalo MA, Sánchez-Rodríguez A, Tuñón MJ, López-Novoa JM, Esteller A.** Sequential changes in redox status and nitric oxide synthases expression in the liver after bile duct ligation. *Life Sci.* 2004; 75:717-732.
- Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F.** Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014; 25:1-19.
- Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M, Trevisani F, Guerrieri F, Bernardi M, Altomare E.** Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology.* 2001; 33:808-815.
- Veteläinen R, van Vliet A, Gouma DJ, van Gulik TM.** Steatosis as a risk factor in liver surgery. *Ann Surg.* 2007a; 245:20-30.
- Veteläinen R, van Vliet AK, van Gulik TM.** Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy. *Ann Surg.* 2007b; 245:44-50.
- Vidal M.** Traitement chirurgical des ascites. *La Presse Médicale.* 1903; 11:747-749.
- Vollmar B, Menger MD.** The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev.* 2009; 89:1269-1339.
- Walker BR, Seckl JR Eds.** International Textbook of Obesity. Chapter 18: Cortisol Metabolism. John Wiley and Sons, LTD. Editorial. 2001. ISBN: 978-0-471-98870-0.
- Watanabe M, Chijiwa K, Kameoka N, Yamaguchi K, Kuroki S, Tanaka M.** Gadolinium pretreatment decreases survival and impairs liver regeneration after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion in rats. *Surgery.* 2000; 127:456-463.

- Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM.** Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:125-163.
- Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M, Kendrew J, Chester R, Jackson JA, Boffey SJ, Valentine PJ, Curwen JO, Musgrove HL, Graham GA, Hughes GD, Thomas AP, Stokes ES, Curry B, Richmond GH, Wadsworth PF, Bigley AL, Hennequin LF.** ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer Res.* 2002; 62:4645-4655.
- Wellen KE, Hotamisligil GS.** Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112:1785-1788.
- Wellen KE, Hotamisligil GS.** Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005; 115:1111-1119.
- Wiedmann M, Müller C, Lobeck H, Wölke K.** Sudden elevation of liver enzymes in a 64-year-old patient: a case report. *Cases J.* 2009; 2:205.
- Winbladh A, Björnsson B, Trulsson L, Bojmar L, Sundqvist T, Gullstrand P, Sandström P.** N-acetyl cysteine improves glycogenesis after segmental liver ischemia and reperfusion injury in pigs. *Scand J Gastroenterol.* 2012; 47:225-236.
- Wu FT, Stefanini MO, Mac Gabhann F, Kontos CD, Annex BH, Popel AS.** A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. *J Cell Mol Med.* 2010; 14:528-252.
- Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N.** Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:1441-1446.
- Yamauchi H, Baca I, Mittmann U, Geisen HP, Salzer M.** Postischemic liver damage in rats: effect of some therapeutic interventions on survival rate. *Tohoku J Exp Med.* 1982; 138:63-70.
- Yan H, Jihong Y, Feng Z, Xiaomei X, Xiaohan Z, Guangzhi W, Zhenhai M, Dongyan G, Xiaochi M, Qing F, Kexin L, Xiaofeng T.** Sirtuin 1-mediated inhibition of p66shc expression alleviates liver ischemia/reperfusion injury. *Crit Care Med.* 2014; 42:e373-381.
- Yanaga K, Matsumata T, Nishizaki T, Shimada M, Sugimachi K.** Alternate hemihepatic vascular control technique for hepatic resection. *Am J Surg.* 1993; 165:365-366.
- Yang J, Wang X, Song S, Liu F, Fu Z, Wang Q.** Near-term anti-CD25 monoclonal antibody administration protects murine liver from ischemia-reperfusion injury due to reduced numbers of CD4+ T cells. *PLoS One.* 2014; 9:e106892.
- Yilmaz Y, Yonal O, Kurt R, Alahdab YO, Ozdogan O, Celikel CA, Ulukaya E, Imeryuz N, Kalayci C, Avsar E.** Circulating levels of vascular endothelial growth factor A and its soluble receptor in patients with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease. *Arch Med Res.* 2011; 42:38-43.


- Yirmibeşoğlu OA, Büyükgebiz O, Ars D, Unay O, Cevik D.** Lisinopril inhibits endothelin-1 in the early period of hepatic reperfusion injury in a partial hepatectomy model. *Transplant Proc.* 2011; 43:2524-2530.
- Zhai D, Zhang J, Zheng Q, Li Z, Zhang J, Tian Y.** Significance of rosiglitazone inhibiting TLR4 expression in partial hepatic ischemia/reperfusion of mice. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2008; 28:564-567.
- Zhang JM, An J.** Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007; 45:27-37.
- Zhang C, Liao Y, Li Q, Chen M, Zhao Q, Deng R, Wu C, Yang A, Guo Z, Wang D, He X.** Recombinant adiponectin ameliorates liver ischemia reperfusion injury via activating the AMPK/eNOS pathway. *PLoS One.* 2013;8:e66382.
- Zhang R, Zhang L, Manaenko A, Ye Z, Liu W, Sun X.** Helium preconditioning protects mouse liver against ischemia and reperfusion injury through the PI3K/Akt pathway. *J Hepatol.* 2014; 61:1048-1055.
- Zhao G, Ma H, Shen X, Xu GF, Zhu YL, Chen B, Tie R, Qu P, Lv Y, Zhang H, Yu J.** Role of glycogen synthase kinase 3 β in protective effect of propofol against hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res.* 2013; 185:388-398.
- Zhou D, Lezmi S, Wang H, Davis J, Banz W, Chen H.** Fat accumulation in the liver of obese rats is alleviated by soy protein isolate through β -catenin signaling. *Obesity (Silver Spring).* 2014; 22:151-158.
- Zhou Y, Zhang J, Lei B, Liang W, Gong J, Zhao C, Yu J, Li X, Tang B, Yuan S.** DADLE improves hepatic ischemia/reperfusion injury in mice via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *Mol Med Rep.* 2017; 16:6214-6221.
- Zhu J, Hua X, Li D, Zhang J, Xia Q.** Rapamycin Attenuates Mouse Liver Ischemia and Reperfusion Injury by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress. *Transplant Proc.* 2015; 47:1646-1652.
- Zimmerman MA, Tak E, Ehrentraut SF, Kaplan M, Giebler A, Weng T, Choi DS, Blackburn MR, Kam I, Eltzschig HK, Grenz A.** Equilibrative nucleoside transporter (ENT)-1-dependent elevation of extracellular adenosine protects the liver during ischemia and reperfusion. *Hepatology.* 2013; 58:1766-1778.
- Zimmermann A.** Regulation of Liver Regeneration. *Nephrol Dial Transplant.* 2004; 19:iv6-10.
- Zoppini G, Targher G, Venturi C, Zamboni C, Muggeo M.** Relationship of nonalcoholic hepatic steatosis to overnight low-dose dexamethasone suppression test in obese individuals. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004; 61:711-5.
- Zúñiga J, Cancino M, Medina F, Varela P, Vargas R, Tapia G, Videla LA, Fernández V.** N-3 PUFA supplementation triggers PPAR- α activation and PPAR- α /NF- κ B interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS One.* 2011; 6:e28502.

ANEXOS

Los artículos originados directa o indirectamente a partir de la presente Tesis son los siguientes:

- Cornide-Petronio ME*, **Bujaldon E***, Mendes-Braz M, Avalos de León CG, Jiménez-Castro MB, Álvarez-Mercado AI, Gracia-Sancho J, Rodés J, Peralta C. The impact of cortisol in steatotic and non-steatotic liver surgery. *J Cell Mol Med.* 2017; 21:2344-2358.
- **Bujaldon E***, Cornide-Petronio ME*, Gulfo J, Rotondo F, Avalos de León CG, Negrete-Sánchez E, Gracia-Sancho J, Novials A, Jiménez-Castro MB, Peralta C. Relevance of VEGFA in rat livers subjected to partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. *J Mol Med (Berl).* 2019. doi: 10.1007/s00109-019-01811.
- Álvarez-Mercado AI, Negrete-Sánchez E, Gulfo J, Avalos de León CG, Casillas-Ramírez A, Cornide-Petronio ME, **Bujaldon E**, Rotondo F, Gracia-Sancho J, Jiménez-Castro MB, Peralta C. EGF-GH axis in rat steatotic and non-steatotic liver transplantation from brain-dead donors. *Transplantation.* 2019; 103:1349-1359.
- Álvarez-Mercado AI, **Bujaldon E**, Gracia-Sancho J, Peralta C. The Role of Adipokines in Surgical Procedures Requiring Both Liver Regeneration and Vascular Occlusion. *Int J Mol Sci.* 2018; 19. pii: E3395.
- Cornide-Petronio ME, Negrete-Sánchez E, Mendes-Braz M, Casillas-Ramírez A, **Bujaldon E**, Meroño N, Martínez-Carreres L, Gracia-Sancho J, Rodés J, Jiménez-Castro MB, Peralta C. The Effect of High-Mobility Group Box 1 in Rat Steatotic and Nonsteatotic Liver Transplantation from Donors After Brain Death. *Am J Transplant.* 2016; 16:1148-1159.
- Cornide-Petronio ME, Jiménez-Castro MB, **Bujaldon E**, Gracia-Sancho J, Peralta C. Hepatic Regeneration Under Warm or Cold Ischemia Conditions: Controversies and New Approaches. In: Georgios Tsoulfas Ed. *Surgical Challenges in the Management of Liver Disease.* IntechOpen. 2018. ISBN: 978-1-83880-158-8.

The impact of cortisol in steatotic and non-steatotic liver surgery

María Eugenia Cornide-Petronio^{a, #}, Esther Bujaldon^{a, #}, Mariana Mendes-Braz^a,
Cindy G. Avalos de León^a, Mónica B. Jiménez-Castro^b, Ana I. Álvarez-Mercado^a,
Jordi Gracia-Sancho^c, Juan Rodés^{a, d}, Carmen Peralta^{a, e, *} 

^a Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

^b Transplant Biomedicals S.L., Barcelona, Spain

^c Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain

^d Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^e Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain

Received: November 15, 2016; Accepted: February 12, 2017

Abstract

The intent of this study was to examine the effects of regulating cortisol levels on damage and regeneration in livers with and without steatosis subjected to partial hepatectomy under ischaemia–reperfusion. Ultimately, we found that lean animals undergoing liver resection displayed no changes in cortisol, whereas cortisol levels in plasma, liver and adipose tissue were elevated in obese animals undergoing such surgery. Such elevations were attributed to enzymatic upregulation, ensuring cortisol production, and downregulation of enzymes controlling cortisol clearance. In the absence of steatosis, exogenous cortisol administration boosted circulating cortisol, while inducing clearance of hepatic cortisol, thus maintaining low cortisol levels and preventing related hepatocellular harm. In the presence of steatosis, cortisol administration was marked by a substantial rise in intrahepatic availability, thereby exacerbating tissue damage and regenerative failure. The injurious effects of cortisol were linked to high hepatic acetylcholine levels. Upon administering an $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor antagonist, no changes in terms of tissue damage or regenerative lapse were apparent in steatotic livers. However, exposure to an M3 muscarinic acetylcholine receptor antagonist protected livers against damage, enhancing parenchymal regeneration and survival rate. These outcomes for the first time provide new mechanistic insight into surgically altered steatotic livers, underscoring the compelling therapeutic potential of cortisol–acetylcholine–M3 muscarinic receptors.

Keywords: Partial hepatectomy • ischaemia–reperfusion • cortisol • acetylcholine • liver • steatosis

Introduction

In clinical settings, partial hepatectomy (PH) under ischaemia–reperfusion (I/R) is a common strategy in use to limit bleeding during parenchymal dissection [1]. More than 20% of patients destined for liver resection present with some degree of steatosis, a condition typically linked to obesity [1–3], and this figure is expected to rise in the near future. Hepatic steatosis is a major risk factor for surgery, associated with high rates of complications and postoperative mortality [1, 2, 4]. By identifying mechanisms responsible for the failure of steatotic livers in this setting, discovery of new pharmacologic therapeutics may thus be advanced.

Cortisol is the main active hormone of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, released by the adrenal gland in response to

adenocorticotrophic hormone (ACTH) [5, 6]. Cortisol concentration in liver is regulated by the following enzymes: (i) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1), generating cortisol from inactive cortisone; (ii) 11 β -HSD2, converting cortisol to cortisone; and (iii) 5 α - and 5 β -reductase enzymes, involved in cortisol clearance [5, 7]. In pathologic states, adipose tissue may also display considerable endocrine activity, secreting a range of hormones including cortisol which may be taken up from the circulation by the liver [8–10]. Disturbances of the HPA axis at any level or in hepatic cortisol metabolism and/or intrahepatic cortisol accumulation from circulation may be critical in the pathogenesis of various liver diseases and inflammatory disorders, including inflammatory bowel disease, colitis, atherosclerosis and metabolic syndrome [11–13].

Cortisol mediates anti-inflammatory effects and programmed cell death in liver diseases such as cholestatic hepatitis, shock and sepsis [14, 15]. It also stimulates hepatocellular proliferation in instances of

[#]These authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: Dr. Carmen PERALTA.

E-mail: cperalta@clinic.ub.es

doi: 10.1111/jcmm.13156

© 2017 The Authors.

Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



Relevance of VEGFA in rat livers subjected to partial hepatectomy under ischemia-reperfusion

Esther Bujaldon¹ · María Eugenia Cornide-Petronio¹ · José Gulfo² · Floriana Rotondo¹ · Cindy Ávalos de León¹ · Elsa Negrete-Sánchez¹ · Jordi Gracia-Sancho³ · Anna Novials^{4,5} · Mónica B. Jiménez-Castro⁶ · Carmen Peralta Uroz^{1,2,7}

Received: 14 November 2018 / Revised: 13 May 2019 / Accepted: 6 June 2019
© The Author(s) 2019

Abstract

We examined the effects of VEGFA on damage and regeneration in steatotic and non-steatotic livers of rats submitted to PH under I/R, and characterized the underlying mechanisms involved. Our results indicated that VEGFA levels were decreased in both steatotic and non-steatotic livers after surgery. The administration of VEGFA increased VEGFA levels in non-steatotic livers, reducing the incidence of post-operative complications following surgery through the VEGFR2-Wnt2 pathway, independently of Id1. Unexpectedly, administration of VEGFA notably reduced VEGFA levels in steatotic livers, exacerbating damage and regenerative failure. After exogenous administration of VEGFA in steatotic animals, circulating VEGFA is sequestered by the high circulating levels of sFlt1 released from adipose tissue. Under such conditions, VEGFA cannot reach the steatotic liver to exert its effects. Consequently, the concomitant administration of VEGFA and an antibody against sFlt1 was required to avoid binding of sFlt1 to VEGFA. This was associated with high VEGFA levels in steatotic livers and protection against damage and regenerative failure, plus improvement in the survival rate via up-regulation of PI3K/Akt independently of the Id1-Wnt2 pathway. The current study highlights the different effects and signaling pathways of VEGFA in liver surgery requiring PH and I/R based in the presence of steatosis.

Key messages

- VEGFA administration improves PH+I/R injury only in non-steatotic livers of Ln animals.
- VEGFA benefits are exerted through the VEGFR2-Wnt2 pathway in non-steatotic livers.
- In Ob rats, exogenous VEGFA is sequestered by circulating sFlt1, exacerbating liver damage.
- Therapeutic combination of VEGFA and anti-sFlt1 is required to protect steatotic livers.
- VEGFA+anti-sFlt1 treatment protects steatotic livers through a VEGFR2-PI3K/Akt pathway.

Esther Bujaldon and María Eugenia Cornide-Petronio EB and MECP contributed equally to this work (as first author)

Mónica B. Jiménez-Castro and Carmen Peralta MJC and CP contributed equally to this work (as last author)

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00109-019-01811-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Carmen Peralta Uroz
cperalta@clinic.ub.es

¹ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain

³ Liver Vascular Biology Research Group, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain

⁴ Diabetes and Obesity Research Laboratory, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

⁵ Spanish Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Barcelona, Spain

⁶ Transplant Biomedicals S.L., Barcelona, Spain

⁷ Facultad de Medicina, Universidad Internacional de Cataluña, Barcelona, Spain

Published online: 29 June 2019

Springer



EGF-GH Axis in Rat Steatotic and Non-steatotic Liver Transplantation From Brain-dead Donors

Ana I. Álvarez-Mercado, PhD,¹ Elsa Negrete-Sánchez, MSc,¹ José Gulfo, PhD,² Cindy G. Ávalos de León, MSc,¹ Arani Casillas-Ramírez, PhD,³ María Eugenia Cornide-Petronio, PhD,¹ Esther Bujaldon, MSc,¹ Floriana Rotondo, PhD,¹ Jordi Gracia-Sancho, PhD,^{2,4} Mónica B. Jiménez-Castro, PhD,⁵ and Carmen Peralta, PhD^{1,2,6}

Background. We evaluated the potential dysfunction caused by changes in growth hormone (GH) levels after brain death (BD), and the effects of modulating GH through exogenous epidermal growth factor (EGF) in steatotic and non-steatotic grafts. **Methods.** Steatotic and nonsteatotic grafts from non-BD and BD rat donors were cold stored for 6 hours and transplanted to live rats. Administration of GH and EGF and their underlying mechanisms were characterized in recipients of steatotic and nonsteatotic grafts from BD donors maintained normotensive during the 6 hours before donation. Circulating and hepatic GH and EGF levels, hepatic damage, and regeneration parameters were evaluated. Recipient survival was monitored for 14 days. Somatostatin, ghrelin, and GH-releasing hormones that regulate GH secretion from the anterior pituitary were determined. The survival signaling pathway phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B that regulates inflammation (suppressors of cytokine signaling, high-mobility group protein B1, oxidative stress, and neutrophil accumulation) was evaluated. **Results.** BD reduced circulating GH and increased GH levels only in steatotic livers. GH administration exacerbated adverse BD-associated effects in both types of graft. Exogenous EGF reduced GH in steatotic livers, thus activating cell proliferation and survival signaling pathways, ultimately reducing injury and inflammation. However, EGF increased GH in nonsteatotic grafts, which exacerbated damage. The benefits of EGF for steatotic grafts were associated with increased levels of somatostatin, a GH inhibitor, whereas the deleterious effect on nonsteatotic grafts was exerted through increased amounts of ghrelin, a GH stimulator. **Conclusions.** GH treatment is not appropriate in rat liver transplant from BD donors, whereas EGF (throughout GH inhibition) protects only in steatotic grafts.

(*Transplantation* 2019;103:1349–1359)

Received 3 October 2018. Revision received 11 January 2019.

Accepted 13 January 2019.

¹ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas (CIBEREHD), Barcelona, Spain.

³ Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria, Facultad de Medicina e Ingeniería en Sistemas Computacionales de Matamoros, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Tamaulipas, México.

⁴ Liver Vascular Biology Research Group, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

⁵ Transplant Biomedicals SL, Barcelona Advanced Industry Park, Barcelona, Spain.

⁶ Facultat de Medicina, Universidad Internacional de Cataluña, Barcelona, Spain.

A.I.Á.-M. and E.N.-S. contributed equally to this article.

M.B.J.C. and C.P. contributed equally to this article.

The authors declare no conflicts of interest.

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (grant SAF2015-64857-R), Madrid, Spain; by the European Union (Fondos FEDER, "una manera de hacer Europa"), by CERCA Program/Generalitat de Catalunya and by the Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement (grant 2017_SGR_551), Barcelona, Spain; and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Fondo

Sectorial de Investigación para la Educación [grant 257743]), México. M.B.J.-C. has a contract from the Programa de Promoción del talento y su empleabilidad—Ministerio de Economía y Competitividad (grant EMP-TU-2015-4167), Madrid, Spain. C.G.A.-L. is the recipient of a fellowship from CONACYT (grant 411424), México. M.E.C.-P. has a Sara Borrell contract from the Instituto de Salud Carlos III (grant CD15/00129), Madrid, Spain.

E.N.-S., J.G., and C.G.A.-L. performed experimental groups and participated in data collection. A.C.-R., M.E.C.-P., E.B., and F.R. all contributed in biochemical and histological analyses and data acquisition. J.G.-S. contributed to data analysis/interpretation and critical revision of this article. M.B.J.-C., C.P., and A.I.A.-M. contributed to the study concept/design, acquisition of experimental data, data analysis/interpretation, and drafting and critical revision of this article. All authors have approved the final article.

Supplemental digital content (SDC) is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text, and links to the digital files are provided in the HTML text of this article on the journal's Web site (www.transplantjournal.com).

Correspondence: Carmen Peralta, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Esther Koplowitz Center, Roselló 149–153, 3rd Floor, Office 3.8, E-08036 Barcelona, Spain. (cperalta@clinic.ub.es); Mónica B. Jiménez-Castro, Transplant Biomedicals SL, Barcelona Advanced Industry Park, Marie Curie 8–14, 08042 Barcelona, Spain. (monicabjimenez@hotmail.com).

Copyright © 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.


ISSN: 0041-1337/19/10307-1349

DOI: 10.1097/TP.0000000000002636



Review

The Role of Adipokines in Surgical Procedures Requiring Both Liver Regeneration and Vascular Occlusion

Ana Isabel Álvarez-Mercado ¹ , Esther Bujaldon ¹, Jordi Gracia-Sancho ^{2,3} and Carmen Peralta ^{1,2,4,*}

- ¹ Experimental Liver Surgery and Liver Transplantation, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; analvarezmercado@gmail.com (A.I.A.-M.); ebujaldonormaechea@gmail.com (E.B.)
- ² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas (CIBEREHD), 28029 Madrid, Spain; jordi.gracia@idibaps.org
- ³ Liver Vascular Biology Research Group, IDIBAPS, 08036 Barcelona, Spain
- ⁴ Facultad de Medicina, Universidad Internacional de Cataluña, 08017 Barcelona, Spain
- * Correspondence: cperalta@clinic.ub.es; Tel.: +34-932-275-400

Received: 30 August 2018; Accepted: 26 October 2018; Published: 30 October 2018



Abstract: Liver regeneration is a perfectly calibrated mechanism crucial to increase mass recovery of small size grafts from living donor liver transplantation, as well as in other surgical procedures including hepatic resections and liver transplantation from cadaveric donors. Regeneration involves multiple events and pathways in which several adipokines contribute to their orchestration and drive hepatocytes to proliferate. In addition, ischemia-reperfusion injury is a critical factor in hepatic resection and liver transplantation associated with liver failure or graft dysfunction post-surgery. This review aims to summarize the existing knowledge in the role of adipokines in surgical procedures requiring both liver regeneration and vascular occlusion, which increases ischemia-reperfusion injury and regenerative failure. We expose and discuss results in small-for-size liver transplantation and hepatic resections from animal studies focused on the modulation of the main adipokines associated with liver diseases and/or regeneration published in the last five years and analyze future perspectives and their applicability as potential targets to decrease ischemia-reperfusion injury and improve regeneration highlighting marginal states such as steatosis. In our view, adipokines means a promising approach to translate to the bedside to improve the recovery of patients subjected to partial hepatectomy and to increase the availability of organs for transplantation.

Keywords: ischemic/reperfusion injury; liver regeneration; adipokines; partial hepatectomy

1. Introduction

The ability of the liver to regenerate even when 70% of the organ tissue has been removed [1] together with the shortage of liver grafts from deceased donors have led to an increased interest in living donor liver transplantation (LDLT), where healthy donors undergo anatomical hepatectomy [2], and split liver transplantation from cadaveric donors to be used in two recipients [3]. Both procedures require liver regeneration [4] and are associated with inherent process of cold ischemia, which negatively affect post-operative outcomes [5]. In addition, an important cause and unavoidable consequence of liver damage during partial hepatectomy (PH) associated with tumor hepatic resection is ischemia reperfusion (I/R) injury. I/R accentuates cellular damage [6], significantly reduces liver regeneration, and induces apoptosis and necrosis in hepatocytes [7,8].

The Effect of High-Mobility Group Box 1 in Rat Steatotic and Nonsteatotic Liver Transplantation From Donors After Brain Death

M. E. Cornide-Petronio¹, E. Negrete-Sánchez¹,
M. Mendes-Braz¹, A. Casillas-Ramírez²,
E. Bujaldon¹, N. Meroño¹, L. Martínez-Carreres¹,
J. Gracia-Sancho³, J. Rodés^{1,4},
M. B. Jiménez-Castro^{1,*†} and C. Peralta^{1,*†}

¹Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain

²Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria, Ciudad Victoria, México

³Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain

⁴Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

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

†These authors contributed equally to this work.

High-mobility group box 1 (HMGB1) has been described in different inflammatory disorders, and the deleterious effects of brain death (BD) may counteract the protection conferred by ischemic preconditioning (IP), the only surgical strategy that is being applied in clinical liver transplantation. Our study examined how HMGB1 may affect preconditioned and unpreconditioned steatotic and nonsteatotic liver grafts from donors after BD (DBDs) for transplantation. HMGB1 was pharmacologically modulated in liver grafts from DBDs, and HMGB1-underlying mechanisms were characterized. We found that BD decreased HMGB1 in preconditioned and unpreconditioned livers and was associated with inflammation and damage. Exogenous HMGB1 in DBDs activates phosphoinositide-3-kinase and Akt and reduces hepatic inflammation and damage, increasing the survival of recipients. Combination of IP and exogenous HMGB1 shows additional benefits compared with HMGB1 alone. This study provides new mechanistic insights into the pathophysiology of BD-derived liver graft damage and contributes to the development of novel and efficient strategies to ultimately improve liver graft quality.

Abbreviations: ACH, acetylcholine; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BD, brain death; DBD, donor after brain death; HMGB1, high-mobility group box 1; i.p., intraperitoneally; IP,

ischemic preconditioning; IRI, ischemia–reperfusion injury; Ln, lean; LT, liver transplantation; MDA, malondialdehyde; MPO, myeloperoxidase; Ob, obese; p-Akt, phosphorylated Akt; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; PI3K/Akt inh, PI3K/Akt pathway inhibitors; UW, University of Wisconsin

Received 28 May 2015, revised 02 October 2015 and accepted for publication 03 October 2015

Introduction

Liver transplantation (LT) has become the standard therapy for certain end-stage liver diseases. Currently, 80% of grafts are taken from donors after brain death (DBDs) (1); however, brain death (BD) markedly reduces the tolerance of liver grafts to preservation and reperfusion injury and reduces graft survival (1–3). In addition, steatosis is currently estimated to be present in up to 50% of livers from deceased donors and is recognized as a key donor variable predicting posttransplant outcome (4,5). Steatotic livers exhibit a greater risk of organ dysfunction and primary nonfunction compared with nonsteatotic livers (2). Furthermore, many steatotic livers are discarded, exacerbating the critical shortage of liver donors (6,7).

High-mobility group box 1 (HMGB1) is a 30-kDa DNA-binding protein that exhibits proinflammatory cytokine-like properties. HMGB1 is produced during systemic disorders such as sepsis and hemorrhagic shock and acts as an alarm initiating the inflammatory response (8–12). To our knowledge, the involvement of HMGB1 in LT from DBDs has not been determined previously.

Although ischemic preconditioning (IP) was first described >10 years ago, it has only very recently been applied in clinical LT. Clinical data suggest that IP alone is insufficient to provide demonstrable benefits in the presence of BD (13–15). Similarly, a recent experimental study from our group indicated that the combination of IP and acetylcholine (ACH) reduces hepatic damage induced by BD in LT. Furthermore, this combination is more effective than ACH treatment alone (16). This is not surprising considering (1) the multiple mechanisms of ischemia–reperfusion injury (IRI) in LT and the exacerbated hepatic inflammation induced by BD and (2) the ability of IP to

Chapter

Hepatic Regeneration Under Warm or Cold Ischemia Conditions: Controversies and New Approaches

Maria Eugenia Cornide-Petronio, Mónica B. Jiménez-Castro, Esther Bujaldon, Jordi Gracia-Sancho and Carmen Peralta

Abstract

Ischemia-reperfusion (I/R) associated with hepatic resection and living related liver transplantation is an unsolved problem in clinical practice. Indeed, I/R induces damage and regenerative failure in clinical liver surgery. Signaling pathways regarding the pathophysiology of liver I/R and regeneration making clear distinction between situations of cold and warm ischemia, as well as liver regeneration with or without vascular occlusion, will be addressed. The different experimental models used to date to improve the postoperative outcomes in clinical liver surgery will be also described. Furthermore, the most updated therapeutic strategies, as well as the clinical and scientific controversies in the field, will be discussed. Such information may be useful to guide the design of better experimental models as well as the effective therapeutic strategies in liver surgery that can succeed in achieving its clinical application.

Keywords: liver surgery, regeneration, ischemia–reperfusion injury, warm ischemia, cold ischemia

1. Introduction

Any surgical situation involving liver hepatectomy requires subsequent regeneration in order to restore the liver/body ratio. The liver's ability to restore tissue after loss depends on the interaction of numerous cells and a complex network of mediators [1]. In most cases, in clinical practice, liver surgery involves both ischemia-reperfusion (I/R) injury and regeneration [1]. Liver I/R injury is a pathophysiological event that occurs during surgical interventions such as liver resection or liver transplantation (LT); it controls bleeding during parenchymal dissection and has a significant effect on liver function prognosis [2–6]. I/R injury is a two-stage phenomenon in which cell damage due to hypoxia and the lack of biomechanical stimulus is exacerbated upon the restoration of oxygen delivery and shear stress [7]. However, I/R injury is inevitable in liver surgery and significantly reduces the organ's regeneration after hepatectomy [1]. Mechanisms of liver I/R injury are complex; they include mainly microcirculation failure and the related oxidative stress, a series of cellular and molecular responses, and the interaction between hepatocytes,

ABREVIATURAS

11 β -HSD 1: 11 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa Tipo 1

11 β -HSD 2: 11 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa Tipo 2

3 β -HSD: 3 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa

5 α R1: 5 α -reductasa Tipo 1

5 α R2: 5 α -reductasa Tipo 2

5 β R: 5 β -reductasa

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

ACTH: Hormona adrenocorticotropa o corticotropina

AG: Ácido graso

AKT: Proteína quinasa B

ALP: Fosfatasa alcalina

ALR: Aumentador de la regeneración hepática

ALT: Alanina aminotransferasa

Ang II: Angiotensina II

AST: Aspartato aminotransferasa

ATP: Adenosina trifosfato

Bax: Proteína X asociada a Bcl-2

BCAA: Aminoácidos de cadena ramificada

Bcl-2: célula-B CLL/linfoma 2

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

CAT: Catalasa

CBG: Globulina fijadora de corticosteroides

CDD: dieta deficiente en colina

CDK: Quinasa dependiente de ciclina

cDNA: DNA codificante

ChAT: Colina acetiltransferasa

CIRP: Proteína fijadora de RNA inducible por frío

COX: Ciclooxygenasa

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

Cyt c: Citocromo C

DA: Dopamina

DADLE: [D-Ala2, D-Leu5]-Encefalina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EC: Célula endotelial

EGCG: galato de epigallocatequina

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares

ET: Endotelina

FAK: Quinasa de adhesión focal

FFA: Ácido graso libre

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FLK-1: Quinasa hepática fetal 1

Flt1: Tirosina quinasa relacionada con Fms Tipo 1

Flt4: Tirosina quinasa relacionada con Fms Tipo 4

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GADPH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GLDH: Glutamato deshidrogenasa

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos

GPC: Glicerilfosforilcolina

GPx: Glutatión peroxidasa

GR: Receptor de glucocorticoides

GSH: Glutación

GSSG: Glutación disulfuro

HA: Ácido Hialurónico

HMGB1: Grupo de alta movilidad box 1

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

HO-1: Hemo-oxigenasa 1

HPA: Hipotalámico – hipofisario - adrenal

HRP: peroxidasa del rábano

HVE: Exclusión vascular hepática

i.v.: intravenoso

i.p.: intraperitoneal

I/R: isquemia/reperfusión

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular tipo 1

IFN- γ : Interferón gamma

IGF: Factor de crecimiento insulínico

Ik-B: Inhibidor de kB

IL-1: Interleucina 1

IL-1 α : Interleucina α

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-10: Interleucina 10

IL-13: Interleucina 13

IL-6: Interleucina 6

IL-6R: Receptor de Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IP3: Inositol trifosfato

IRE1: Enzima que precisa inositol

JAK: Janus quinasa

JNK: Quinasa c-Jun N-terminal

KC: Célula de Kupffer

KDR: Receptor con dominio inserto-quinasa

LDH: Lactato deshidrogenasa

Ln: Lean

LPS: Lipopolisacárido

LPT: Lipectomía

LSEC: células endoteliales del sinusoide hepático

LTB4: Leucotrieno B4

mAChR: Receptor muscarínico de la acetilcolina

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1

MDA: Malondialdehido

MDH: Malato deshidrogenasa

MEK: MAPK/ERK quinase

MIP-1: Proteína inflamatoria de macrófagos 1

MIP-2: Proteína inflamatoria de macrófagos 2

MKP-1: MAPK fosfatasa 1

MPO: Mieloperoxidasa

nAChR: Receptor nicotínico de la acetilcolina

NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

NAFLD: Enfermedad del hígado graso no alcohólico

NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NO: Óxido nítrico

NRP-1: Neuropilin 1

Ob: Obeso

OLT: Trasplante hepático ortotópico

PAF: Factor activador de plaquetas

PAI: Inhibidor del activador del plasminógeno-1

PAR-4: Receptor activado por proteasa 4

PEP: Ácido fosfoenolpirúvico

PERK: Proteína quinasa del retículo endoplasmático

PH: Hepatectomía parcial

PH + I/R: Hepatectomía parcial bajo oclusión vascular

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa

PIGF: Factor de crecimiento placentario

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PLA2: Fosfolipasa A2

PLC: Fosfolipasa C

pNP: p-nitrofenol

PPAR α : Receptor activado por proliferador peroxisomal α

PPAR γ : Receptor activado por proliferador peroxisomal γ

RBP4: Proteína captadora de retinol 4

RE: retículo endoplasmático

REL: retículo endoplasmático liso

RER: retículo endoplasmático rugoso

RISK: Quinasa señalizadora de lesión por reperfusión

RLO: Radicales libres de oxígeno

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SAPK: Proteína quinasa activada por estrés

SD: Sprague Dawley

SEC: Células endoteliales sinusoidales

sFlt1: receptor soluble del receptor 1 del VEGFA

siRNA: ARN pequeño de interferencia

SOCS3: Supresor de la señalización de citoquinas 3

SOD: Superóxido dismutasa

StAR: Proteína reguladora de la respuesta esteroideogénica aguda

STAT3: Transductor de la señal y activador de la transcripción 3

TAG: Triglicérido

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TGF- α : Factor de crecimiento transformante α

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

TLR4: Receptor tipo toll 4

TMB: Tetrametilbencidina

TNFR1: Receptor del factor de necrosis tumoral 1

TNFR2: Receptor del factor de necrosis tumoral 2

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TNF- β : Factor de necrosis tumoral β

TUDCA: Ácido tauroursodeoxicólico

UCP-2: Proteína desacopladora mitocondrial 2

UPR: Respuesta a proteínas desplegadas

VCAM-1: Molécula de adhesión de células vasculares tipo 1

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFA: Factor de crecimiento endotelial vascular tipo A

VEGFR1: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular tipo 1

VEGFR2: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular tipo 2

VEGFR3: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular tipo 3

vWF: Factor de von Willebrand

Wnt2: Miembro de la familia Wnt tipo 2

XDH: xantina deshidrogenasa

XOD: xantina oxidasa