



El soporte nutricional y las adipocitoquinas en parcial hepatectomía con oclusión vascular

Mariana Mendes Braz

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.



El soporte nutricional y las adipocitoquinas en parcial hepatectomía con oclusión vascular

Tesis Doctoral presentada por

Mariana Mendes Braz

para optar al título de

DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Director de Tesis:

Dra. Carmen Peralta Uroz

Tutor:

Dra. Laura Baldomà Llavines

Barcelona, Julio 2014



FACULTAT DE FARMÀCIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

El soporte nutricional y las adipocitoquinas en parcial hepatectomía con oclusión vascular

Memoria presentada por Mariana Mendes Braz para optar al título de doctora por la Universidad de Barcelona

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

Dra. Carmen Peralta Uroz

Directora

Dra. Laura Baldomà Llavines

Tutora

Mariana Mendes Braz

Doctoranda

Barcelona, 2014

“SI CAES ES PARA LEVANTARTE, SI TE LEVANTAS ES PARA SEGUIR, SI SIGUES ES
PARA LLEGAR A DONDE QUIERES IR Y SI LLEGAS ES PARA SABER QUE LO MEJOR

ESTA POR VENIR...”

ELBANO MENDOZA

**À minha mãe, ao meu pai,
à minha irmã e aos meus avós.**

Agradecimientos

A mi directora de tesis, la Dra. Carmen Peralta, por permitirme realizar esta tesis doctoral y por haberme enseñado, con mucha paciencia, sabiduría y respeto, sobre los diferentes temas relacionados con los diversos trabajos que tuve el placer de formar parte.

Al Dr. Fernando y a la Dra. Leandra, por haberme ayudado a empezar a escribir mi historia profesional y por las oportunidades que me permitirán ir más lejos.

A la Dra. Araní Casillas-Ramírez y a la Dra. Mónica B. Jiménez Castro por haber enseñado con paciencia y respeto las diferentes técnicas y procedimientos quirúrgicos que serán importantes en mi vida profesional.

A la Dra. Marta Massip, por brindarme siempre con su amabilidad y disposición en ayudarme con lo que necesite.

Gracias a mis compañeros del laboratorio Laia, Noelia y María Eugenia por el apoyo laboral cotidiano y por compartir el trabajo entre risas.

Al personal del estabulario de la Facultad de Medicina, por ayudarme siempre con lo que necesitaba y por haberme tratado siempre con amabilidad y respeto.

A los animales de experimentación que fueron esenciales en el desarrollo de los estudios que forman parte esta tesis.

Agradeço a mina mãe, ao meu pai e a minha irmã, pelo apoio em minhas escolhas, por me amarem e respeitarem incondicionalmente e por acreditarem sinceramente em mim. Ao Dinho por seu companheirismo.

Agradeço aos meus avós, que amorosamente torcem por mim e pelas minhas conquistas.

Agradeço o apoio inigualável dos meus sinceros amigos Mônica e família durante todos estes anos.

Agradeço a presença do meu amigo Enrique em minha vida, pois sempre me ajuda a ter muita calma e paciência.

A todos aquellos que no he mencionado y que en algún momento han estado a mí lado.

Muchas gracias.

INTRODUCCIÓN	1
1. Problemática de la lesión por isquemia-reperfusión en resecciones hepáticas	2
2. Patofisiología de la lesión por isquemia-reperfusión hepática	3
3. La regeneración hepática	4
4. Factores implicados en la lesión por isquemia-reperfusión y en la regeneración	7
5. Controversias acerca de los factores implicados en la lesión por isquemia-reperfusión y en la regeneración	9
5.1 Los radicales libres de oxígeno	9
5.2 Neutrófilos y citoquinas	10
5.3 El óxido nítrico	11
6. La importancia de la esteatosis en la cirugía hepática	12
7. Mecanismos implicados en la lesión por isquemia-reperfusión y fallo en la regeneración en el hígado esteatósico	14
7.1 El estrés oxidativo	14
7.2 La acumulación de neutrófilos y activación de las células de kupffer	15
7.3 Las alteraciones en la microcirculación hepática	16
7.4 El mecanismo de muerte celular	16
7.5 Las alteraciones en el metabolismo energético	17
8. El receptor tipo toll 4	18
8.1 El TLR4 y la lesión por isquemia-reperfusión hepática	21
8.2 El TLR4 y la regeneración hepática	21
9. El tejido adiposo blanco	22
10. Las adipocitoquinas	24
10.1 La adiponectina	24
10.1.1 El papel de la adiponectina en la lesión por isquemia-reperfusión	25
10.1.2 El papel de la adiponectina en la regeneración	26
10.2 La resistina	28
10.2.1 El papel de la resistina en la lesión por isquemia-reperfusión	28
10.2.2 El papel de la resistina en la regeneración	29
10.3 La visfatina	30
10.3.1 El papel de la visfatina en la lesión por isquemia-reperfusión	31
10.3.2 El papel de la visfatina en la regeneración	32

10.3.3	El papel de la visfatina en la homeostasis de los lípidos	34
10.3.4	El papel de la visfatina en el catabolismo de los aminoácidos	36
11.	El efecto de la administracion de lipidos sobre la lesión y la regeneración hepática	38
12.	El efecto de la administracion de glucosa en la lesion y regeneración hepática	41
	OBJETIVOS	43
	MATERIALES y MÉTODOS	45
1.	Modelo experimental de hepatectomía parcial con oclusión vascular	46
1.1	Animales experimentación	46
1.2	Anestesia	47
1.3	Procedimiento quirúrgico	47
2.	Diseño experimental	48
2.1	Diseño experimental del primero estudio	48
2.2	Diseño experimental del segundo estudio	52
3.	Determinaciones bioquímicas	55
3.1	Transaminasas	55
3.2	Factores de crecimiento (HGF y TGF- β)	55
3.3	Medidores inflamatorios	56
3.3.1	Interleuquina-1 y Interleuquina-6	56
3.3.2	Factor de necrosis tumoral- α y Proteína quimioatrayente de monócitos – 1	56
3.3.3	P65-NF- κ B	57
3.4	Adipocitoquinas	57
3.5	ATP y caspasa-8	58
3.6	Nicotinamida adenina dinucleótido	58
3.7	Urea	58
3.8	α -Cetoglutarato	58
3.9	Glutamato deshidrogenasa	58
3.10	Amonio (NH ₄ ⁺)	59
3.11	Nitritos y nitratos	59

3.12 Malondialdehído	59
3.13 Mieloperoxidasa	60
3.14 Citocromo c oxidase	61
3.15 Analisis y extracción de lípidos	61
3.16 Determinación de esfingosina-1-fosfato y ceramidas	61
3.17 Aminoácidos libres y esenciales	62
4. Técnica de Biología Molecular	62
4.1 Proteínas	62
4.2 Western Blot	62
5. PCR a tiempo real	64
6. Estudio histológico	64
6.1 Técnicas de inmunohistoquímica	64
6.2 Estudio histológico con hematoxilina y eosina	66
7. Estudio estadístico	66
RESULTADOS	67
1. Estudio 1	68
2. Estudio 2	87
DISCUSIÓN	113
CONCLUSIONES	124
BIBLIOGRAFIA	127
ANEXOS	149

Abreviaturas

ACC: Acetil-CoA carboxilasa
Akt: Proteína serina/treonina quinasa
ALT: Alanina aminotransferasa
AMPK: Proteína quinasa dependiente de AMP
Ang II: Angiotensina II
Ang 1-7: Angiotensina 1-7
AST: Aspartato aminotransferasa
ATP: Adenosina trifosfato
BrdU - Bromodesoxiuridina
CDases: Ceramidasa
CDK1: Quinasa-dependiente de ciclina 1
CDK2: Quinasa-dependiente de ciclina 2
CDK4: Quinasa-dependiente de ciclina 4
CE: Células endoteliales
CER: Ceramida
Cyt c: Citocromo c
CCL4 - Tetracloruro de carbono
CINC: Quimioatrayente de neutrófilos inducido por citoquinas 1
CK: Células de Kuppfer
COXI: Citocromo c oxidasa subunidad I
COXIV: Citocromo c oxidasa subunidad IV
CPT-1: Carnitina palmitoiltransferasa-1
CPT-2: Carnitina palmitoiltransferasa-2
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial
ERK 1/2: Proteína quinasa regulada por señales extracelulares 1/2
ET: Endotelina
FAS: Sintasa de ácidos grasos
FGF21: Factor de crecimiento fibroblástico
G0: Fase quiescente
G1: Intervalo (procedente del inglés "Gap")
GDH: Glutamina deshidrogenasa
GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GPAT: Glicerol-3-fosfato aciltransferasas
GSH: Glutación
HDL: Lipoproteínas de alta densidad
HIF-1: Factor inducible por hipoxia 1
HMGB1: Proteína de alta movilidad del grupo B1
HGF: Factor de crecimiento hepatocitario
HMW: Peso molecular alto
HSF: Factor de transcripción de choque térmico
H&E: Hematoxilina y Eosina
I/R: Isquemia/Reperfusión
ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1

IFN- γ : Interferón gamma
IL-1: Interleuquina-1
IL-6: Interleuquina-6
IL-10: Interleuquina-10
IL-12: Interleuquina-12
IL-13: Interleuquina-13
IL-17: interleuquina-17
IL-18: Interleuquina-18
IFN β : interferon beta
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
IRAK: Quinasa asociada a IL-1R
IKK: Quinasa de I κ B
I κ B: Inhibidor de NF κ B
IRF: Factor de transcripción regulatorio de interferón
LDL: Lipoproteínas ricas en triglicéridos
LMW: Bajo peso molecular
LPS: Lipopolisacárido
LPT: Lipectomia
LTB4: Leucotrieno B4
M: Fase de Mitosis
MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCAD: Acil-CoA-dehidrogenasa de cadena media
MCP: Proteína quimiotáctica de monocitos
MD2: Diferenciación mieloide 2
MDA: Malondialdehído
MIP: Proteína de los macrófagos inflamatorios-1
MIP: Proteína inflamatoria de macrófagos
MMW: Peso molecular medio
MPO: Mieloperoxidasa
MyD88: Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida
NF κ B: Factor nuclear kappa β
NH $_4^+$: Amonio
NMN: Nicotinamida mononucleótido
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintasa
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
O $_2^-$: Radical superóxido
OONO $^-$: Peroxinitrito
p38: Proteína quinasa activada por mitógeno p38
PBEF: Promotor estimulante de las colonias de células pre-B
PH: Hepatectomia parcial
PI3K: Fosfatidil inositol 3-quinasa
PPAR α : Receptor activador de la proliferación de peroxisomas alfa
RBP4: Proteína de transporte del retinol 4

RLO: Radicales libres de oxígeno

S: Fase de síntesis

SAPK: Proteína quinasa activada por estrés

SCD-1: Estearoil CoA desaturasa 1

SMases: Esfingomielinasas

SPHK: Esfingosina quinasa

S1P: Esfingosina-1-fosfato

SOCS-3: Supresora de la señalización por citocinas-3

SOD2: Superóxido dismutasa 2

SLP: Proteasas secretadas por leucocitos

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

STAT6: Transductor de señal y activador de la transcripción 6

SPHK: Esfingosina quinasa

TAK1: Quinasa asociada a TGF- α

TAB: Tejido adiposo blanco

TAB2: Proteína unida a TAK

TG - Triglicéridos

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

TIRAP: Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR

TLR: Receptores tipo Toll

TLR4: Receptor tipo toll 4

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TNF- β : Factor de necrosis tumoral β

TNFR1: Receptor 1 del TNF- α

TRAF6: Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral 6

TRAM: Molécula adaptadora relacionada con TRIF

TRIF: Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR inductor de interferon β

VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular 1

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

X/XOD: Xantina/Xantina Oxidasa

INTRODUCCIÓN

1. PROBLEMÁTICA DE LA LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN RESECCIONES HEPÁTICAS

La resección hepática es un tratamiento estándar para tumores hepáticos. El objetivo de la resección es eliminar la lesión macroscópica dejando suficiente masa hepática funcional con la preservación del flujo vascular (Garcea G., Maddern G.J., 2009, Garden G. et al., 2006). La hemorragia durante la cirugía del hígado es el riesgo principal durante las resecciones hepáticas. Para reducir este riesgo se utiliza la oclusión vascular del flujo sanguíneo que entra en el hígado, esta maniobra se conoce como la maniobra de Pringle u oclusión de la tríada portal. Consiste en la compresión del ligamento hepatoduodenal. 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 C. et al., 1992, Selzner M. et al., 2000).

Otra técnica que se utiliza, es la exclusión vascular hepática, consiste en la oclusión de la tríada portal y la de la vena cava inferior. Esta técnica aísla completamente el hígado y la vena cava retrohepática del resto de la circulación, y tiene como objetivo 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 extraer un tumor hepático muy extenso o bien situado en el lóbulo posterior del hígado (Huguet C. et al., 1992). Con el fin de minimizar 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 hemihepática (Makuuchi M. et al., 1987, Miyagawa S. et al., 1996, Yanaga K. et al., 1993, Nishizaki T. et al., 1996). Esta técnica consiste en la oclusión de los vasos aferentes (arteria hepática y vena porta) de los lóbulos hepáticos, derechos o izquierdos dependiendo de la situación del fragmento hepático a reseccionar, de manera que se preserva el flujo sanguíneo en el lóbulo hepático contralateral reduciendo así la lesión hepática asociada a la isquemia-reperfusión (I/R) (Miyagawa S. et al., 1996, Yanaga K. et al., 1993, Nishizaki T. et al., 1996). Si bien estos procedimientos reducen el sangrado durante la cirugía, hay que tener presente las lesiones provocadas por la interrupción del flujo sanguíneo en la totalidad del hígado. Además, en pacientes con desórdenes hepáticos como es el caso de la cirrosis hepática los dos tipos de oclusiones vasculares comportan congestión intestinal, con el consiguiente riesgo añadido de sepsis (Makuuchi M. et al., 1987).

2. PATOFISIOLOGÍA DE LA LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN HEPÁTICA

En la literatura, la lesión por I/R se ha dividido en dos fases, la lesión causada por la isquemia y la lesión debida a la reperfusión. La separación de los eventos celulares que ocurren en cada fase no es absoluta, ya que el daño celular en el órgano hipóxico se acentúa después de la restauración del aporte de oxígeno, lo que sugiere que los eventos que suceden en la reperfusión, son la consecuencia de aquellos que se inician durante la isquemia. Además se ha visto que la reperfusión de un hígado expuesto a un periodo de isquemia breve no induce ningún daño detectable, un hallazgo indicativo de que la reperfusión por sí sola no es perjudicial (Casillas-Ramírez A. et al., 2006a).

Durante la isquemia, se interrumpe el aporte de oxígeno al hígado y se detiene la cadena respiratoria mitocondrial, lo que comporta una depleción de los niveles de adenosina trifosfato (ATP). La degradación de ATP estimula la glucólisis anaeróbica con la consiguiente formación de ácido láctico, lo cual altera la cinética normal de las enzimas. El fallo en la homeostasis celular se caracteriza por la pérdida de gradiente de los iones de sodio y de calcio a través de las membranas celulares. Este hecho trae como consecuencia edema intracelular y el consiguiente hinchamiento de las células de Kupffer y las células endoteliales. Estos fenómenos inducen una alteración en los orgánulos citoplasmáticos y en la integridad de la membrana, pudiendo desencadenar en la muerte celular (Casillas-Ramírez A. et al., 2006a).

La reperfusión (restablecimiento del flujo sanguíneo) del hígado previamente isquémico trae consigo dos procesos beneficiosos para el tejido isquémico, por una parte se restablece el aporte de energía recuperando los niveles de ATP deplecionados durante la isquemia y por otra la eliminación de los metabolitos tóxicos formados durante la fase previa, que tienen repercusión a nivel sistémico y local. Desde este punto de vista, la reperfusión podría considerarse como un prerrequisito para la recuperación de la lesión isquémica. Se ha establecido que la lesión hepática causada por la reperfusión tiene lugar en dos etapas. La primera se iniciaría inmediatamente después de la reperfusión con una duración de entre 4 y 6 horas conocida como fase inicial o aguda, y después tendría lugar una segunda fase que se alargaría durante 2 ó 3 días, conocida como fase tardía o subaguda (Cutrin J.C. et al., 2000, Jaeschke H. et al., 1991a, Jaeschke H. et al., 1991b, Jaeschke H et al., 1991c).

3. LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

En vertebrados, la capacidad de regeneración está limitada a muy pocos tejidos, entre ellos el hígado. La inusual capacidad regenerativa del hígado es un mecanismo de adaptación, ya que el hígado es el principal órgano detoxificante del cuerpo. Por tanto, el hígado tiene la capacidad de regenerarse tras una lesión o resección (Koniaris L.G. et al., 2003). Esta capacidad regenerativa no deja de sorprender ya que el hígado es un órgano quiescente, en términos de proliferación celular (Koniaris L.G. et al., 2003), en el cual solamente menos del 0,01% de los hepatocitos se están dividiendo en un momento determinado. Los hepatocitos constituyen el 80-90% de las células hepáticas. El otro 20% está integrado por células de Kupffer, endoteliales, epiteliales biliares y células de Ito.

La regeneración hepática tras la hepatectomía parcial (PH) tiene lugar mediante una proliferación masiva de los hepatocitos supervivientes tras una resección hepática, (Koniaris L.G. et al., 2003) y de todas las células maduras presentes en el órgano (Michalopoulos G.K., 2007). La mayoría de los estudios se centran en la capacidad regenerativa de los hepatocitos ya que son los primeros tipos celulares en proliferar (Grisham J.W. et al., 1962, Rabes H.M. et al., 1976). La síntesis de DNA de los hepatocitos comienza entre las 12 y las 16 horas después de una PH del 70% en animales de experimentación y alcanza su pico máximo entre las 22 y las 24 horas. Así mismo, un segundo pico menos notable se produce entre las 36 y las 48 horas. La síntesis de DNA en las células no parenquimales comienza normalmente un día más tarde, después de la síntesis de DNA de las células del parénquima (Michalopoulos G.K., 1990).

La regeneración hepática se ha dividido en dos etapas:

- 1) La salida del hepatocito de la fase quiescente para entrar en el ciclo celular (iniciación).
- 2) La progresión a través del punto de restricción de la fase G1 del ciclo (progresión).

Se ha propuesto que estas dos etapas tienen un control independiente. En la primera etapa, la iniciación, intervendrían las citoquinas (factor de necrosis tumoral α [TNF- α] y interleuquina-6 [IL-6]). En la progresión intervendrían los factores de crecimiento [el factor de crecimiento hepatocitario (HGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β)] (Fausto N., 2000).

La regeneración hepática es un proceso asociado a cascadas de señalización que implican una compleja red de mediadores (Selzner M. et al., 1999). Las citoquinas tales como el TNF- α y la IL-6 actúan en la fase inicial de la regeneración del hígado, lo que corresponde a la entrada de los hepatocitos quiescentes en el ciclo celular (G0 a G1). La progresión del ciclo celular es favorecida por factores de crecimiento (HGF), que atraviesan el punto de restricción al final de la fase G1 (Fausto N., Campbell J.S., 2006, Zimmermann A. et al., 2004) (Figura 1). Las células no parenquimales del hígado tienen una función importante como fuente de factores de crecimiento y las interleuquinas, las cuales promueven o inhiben la proliferación de los hepatocitos (Figura 1).

Las células de Kupffer son responsables tanto de la producción y liberación de las citoquinas que favorecen la proliferación (TNF- α y IL-6), como de los mediadores que inhiben tal proceso (IL-1 y TGF- β) (Malik R. et al., 2002). Las células endoteliales de los sinusoides son capaces de generar TGF- β , HGF y IL-6. Las células estrelladas hepáticas sintetizan y liberan HGF y TGF- β (Malik R. et al., 2002).

El HGF juega un papel importante en la reparación y regeneración durante el daño hepático (Figura 1). El HGF desencadena una red compleja de rutas de señalización que activan funciones claves para la reparación del hígado, la supervivencia y el control redox celular (Gómez-Quiroz L.E. et al., 2008, Nakamura T. et al., 2010). Todas estas funciones son iniciadas por la unión del HGF a su receptor tirosina quinasa c-Met, el cual después de su autofosforilación, desencadena la transducción de diferentes vías de señalización celular (Palestino-Domínguez M. et al., 2012). Estudios previos en un modelo experimental de trasplante hepático han señalado que la administración de HGF aumenta la regeneración del injerto hepático (Uchiyama H. et al., 1999). En esta misma línea, estudios realizados en un modelo experimental de regeneración por tetracloruro de carbono, demostraron que la administración de anticuerpos anti-HGF inhiben la regeneración hepática (Burr A.W. et al., 1998).

El TGF- β tiene dos funciones: la inhibición de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis (Oberhammer F. et al., 1991, Oberhammer F. A., 1992). El TGF- β actúa sobre el ciclo celular deteniendo la proliferación de las células al final de la fase G1 (Figura 1). Este efecto se consigue tras la represión de c-myc, el cual es un factor transcripcional mitogénico, así como por la inducción de inhibidores de diferentes complejos del ciclo celular (Vilchis-Landeros M.M. et al., 2003). Pocas horas después de realizarse una PH, se inicia la síntesis del TGF- β , alcanzando su máxima concentración alrededor de las 48 horas. Se ha señalado que la administración intravenosa de TGF- β inhibe la fase temprana de la regeneración en modelos experimentales de

PH (Russell W.E. et al., 1988), mientras que tratamientos basados en la administración de anticuerpos anti-TGF- β en PH aumentan la regeneración hepática (Enami Y. et al., 2001).

Con respecto al ciclo celular, el complejo ciclina-CDK4 (quinasa-dependiente de ciclina 4) se activa en la mitad de la fase G1. Los complejos de ciclina E-CDK2 son necesarios para la transición de la fase G1 a S. La ciclina A-CDK2 es clave para la progresión de la replicación del DNA, y la ciclina B-CDK1 para la entrada en la mitosis (Jaumot M. et al., 1999) (Figura 1).

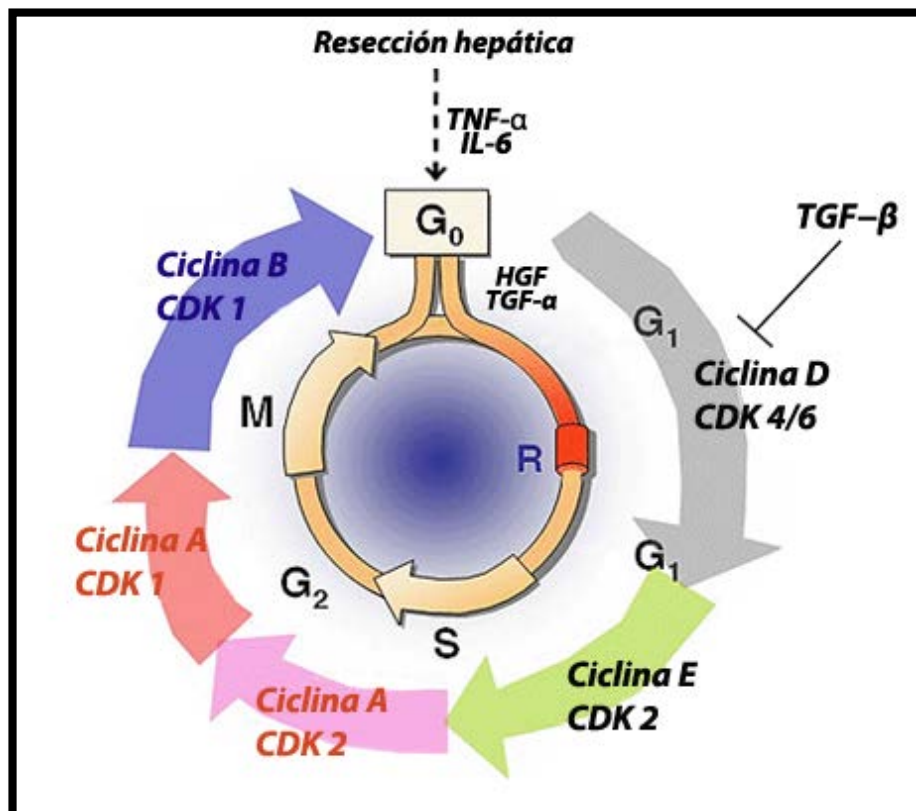


Figura 1. Fases del ciclo celular. G₀: fase quiescente, G₁: intervalo (procedente del inglés "Gap"), R: punto de restricción, S: fase de síntesis, G₂: intervalo (procedente del inglés "Gap"), M: fase de mitosis.

4. FACTORES IMPLICADOS EN LA LESIÓN POR I/R Y EN LA REGENERACIÓN

El daño hepático que sufre el hígado al someterlo a un proceso de I/R así como la respuesta regenerativa del hígado tras una PH es el resultado de la interacción entre diferentes tipos celulares y vías de señalización celular (Figura 2).

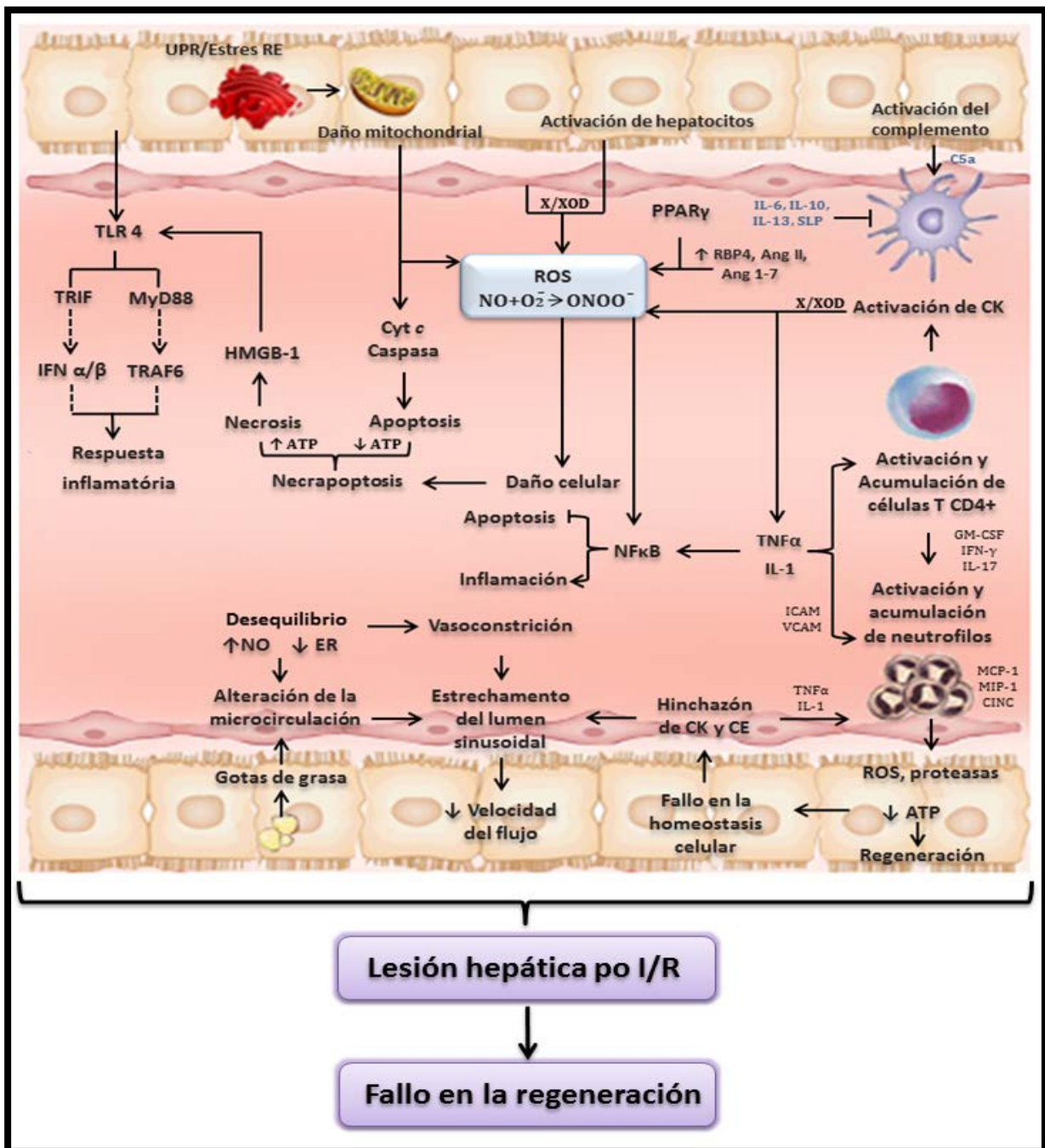


Figura 2. Algunos de los mecanismos involucrados en la patofisiología de la I/R y regeneración hepática. TLR-4: receptor tipo toll 4, TRIF: proteína adaptadora que contiene el dominio TIR inductor de interferon beta, MyD88: proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88, TRAF6: factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral 6, HMGB-1: proteína de alta movilidad del grupo B1, Cyt c: citocromo c, X/XOD: xantina/xantina oxidasa, IL-6: interleuquina-6, IL-10: interleuquina-10, IL-13: interleuquina-13, SLP: proteasas secretadas por leucocitos, RBP-4: proteína de transporte del retinol 4, Ang II: angiotensina I, Ang 1-

7: angiotensina 1-7, TNF- β : factor de crecimiento transformante-beta, INF- γ : interferón gamma, RLO: radicales libres de oxígeno, O₂⁻: radical superóxido, ONOO⁻: peroxinitrito, ATP: adenosina trifosfato, GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, IL-17: interleuquina-17, IL-10: interleuquina-10, ICAM: molécula de adhesión intercelular, VCAM: molécula de adhesión celular vascular; NO: óxido nítrico; ET: endotelina, MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1, MIP: proteína de los macrófagos inflamatorios-1, CINC: quimioatrayente de neutrófilos inducido por citoquinas, CK: células de Kuppfer, CE: células endoteliales.

La deficiencia energética inducida por la isquemia induce un fallo en la homeostasis celular y alteraciones en las CK y las CE. Este hecho, junto con el desequilibrio en la producción de NO y ET contribuye al estrechamiento del lumen sinusoidal. Esto conduce a una acumulación de neutrófilos y a fallos en la microcirculación hepática. La activación de las CK resulta en la liberación de RLO (procedentes del sistema X/XOD y de la mitocondria), TNF- α e IL-1. Diferentes mediadores tales como la Ang II, RBP4 y Ang 1-7 intervienen en la producción de RLO. La liberación de citoquinas, a través de la inducción de moléculas de adhesión (ICAM y VCAM) y de la quimioquina CXC conduce a la acumulación y activación de neutrófilos, causando daño parequimal a través de la producción de RLO y proteasas. De la misma manera, la activación del factor del complemento C5a activa a las CK; los linfocitos T CD4⁺ residentes y los recién acumulados en el hígado pueden producir GM-CSF, INF- γ y TNF- β , los cuales amplifican la activación de las CK y promueven el reclutamiento de neutrófilos en el hígado; quimioquinas tales como MCP-1, MIP-1 y CINC son responsable de la producción de O₂⁻ por parte de los neutrófilos mientras que el leucotrieno B4 (LTB4) puede contribuir a la amplificación de la respuesta de los neutrófilos. Adicionalmente, factores anti-inflamatorios tales como IL-6, IL-10, IL-13 y el inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLP) atenúan la respuesta inflamatoria. Los niveles de ATP serán claves para desencadenar necrosis y/o apoptosis. El daño celular activa vías de señalización como el HMGB-1-TLR4, lo cual amplifica aún más el daño inflamatorio en procesos de PH bajo I/R. Es importante considerar que la lesión por I/R afecta negativamente el proceso de regeneración (Figura 2).

Lo anteriormente expuesto evidencia la multitud de mediadores y factores implicados en la lesión por I/R hepática. Las interrelaciones entre estos mediadores y sus respectivas vías de señalización son muy complejas y aún no es posible hablar con total certeza de los eventos que suceden desde que se inicia la reperfusión hasta el momento en que se evidencian los fallos postoperatorios asociados a la cirugía hepática, pues las diversas investigaciones que abordan el tema no han logrado converger en sus resultados. Este hecho se ve acentuado negativamente por la gran diversidad de modelos y diseños experimentales con los que se trabaja.

5. CONTROVERSIAS ACERCA DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA LESIÓN POR ISQUEMIA – REPERFUSIÓN Y EN LA REGENERACIÓN

A continuación nos centraremos en los diferentes resultados existentes en la literatura acerca de las posibles fuentes generadoras de RLO, la activación y acumulación de los neutrófilos, el papel de algunas citoquinas y los efectos y mecanismos de acción del óxido nítrico (NO). Esto nos permitirá entender porque la lesión por I/R y el fallo en la regeneración asociada a la PH bajo oclusión vascular sigue siendo un problema sin resolver en la práctica clínica.

5.1 LOS RADICALES LIBRES DE OXÍGENO

Los efectos más nocivos se producen a través de su acción sobre las membranas celulares, ya sea a nivel de enzimas, receptores de membrana, mecanismos de transporte o modificando las propiedades de los lípidos y de las proteínas de dichas membranas. También pueden desencadenar los procesos de peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados, afectando directamente las propiedades físicas de la membrana y provocando una depleción de estos ácidos grasos esenciales (Horrobin D.F., 1991, Ferguson D.M. et al., 1991, Kanno M. et al., 1993, Elias-Miró M. et al., 2013).

El estrés oxidativo que acompaña la lesión por I/R hepática es la consecuencia de un desequilibrio entre sustancias pro-oxidantes y anti-oxidantes. Entre los mecanismos que generan sustancias pro-oxidantes se destacan la generación mitocondrial, la generación por parte de los fagocitos y la del sistema xantina deshidrogenasa/xantina oxidasa (XDH/XOD) (Figura 2). En cuanto a los sistemas antioxidantes se destacan la superóxido dismutasa (SOD) y el glutatión (GSH) como sistemas enzimáticos y no-enzimáticos respectivamente. La I/R provoca una disminución de los niveles de SOD y GSH, hecho que agrava aún más los efectos nocivos de los RLO.

Los RLO, al dañar proteínas y DNA tienen una influencia negativa sobre la división celular (Clavien P.A. et al., 1992, Diesen D.L. et al., 2010). Distintos estudios indican que los marcadores de peroxidación lipídica están aumentados durante la reperfusión en trasplante así como en resecciones hepáticas (Biasi F. et al., 1995, Reilly P.M et al., 1991).

Resultados obtenidos en modelos experimentales de hígado perfundido aislado han puesto en tela de juicio la importancia del sistema X/XOD, e indican que la mitocondria podría ser la fuente principal de RLO (Figura 2). Sin embargo, datos obtenidos en un modelo murino de I/R normotérmica *in vivo* constatan que la mitocondria no parece participar activamente en el estrés oxidativo inducido por la reperfusión (Casillas-Ramírez A. et al., 2006b, Elias-Miró M. et al., 2012b).

La variedad de resultados respecto a los mecanismos de generación de RLO en la I/R hepática es evidente. Con el objeto de clarificar la importancia del sistema X/XOD frente a la mitocondria, debe tenerse en cuenta las diferencias existentes entre los modelos experimentales evaluados, incluyendo los tiempos de isquemia. De esta manera, el sistema X/XOD desempeña un papel crucial en el daño hepático por I/R solamente en condiciones en las cuales ocurre una formación importante de XOD, como por ejemplo a las 16 horas de isquemia fría. Sin embargo, este sistema de generación de RLO no parece ser crucial en periodos isquémicos más cortos tales como 6 horas de isquemia fría. (Casillas-Ramírez A. et al., 2006b, Elias-Miró M. et al., 2012a). Por otro lado, también deben considerarse los fármacos usados para inhibir el sistema X/XOD, ya que por ejemplo, el alopurinol parece tener más de un mecanismo de acción. Este no es solamente un inhibidor potente de la XOD, sino que también mejora la disfunción mitocondrial inducida por la isquemia. De la misma manera, es importante señalar que la implicación de los hepatocitos y/o de las CK como fuentes productoras de RLO depende del periodo de isquemia y de la temperatura (4°C y 37°C) a la cual es sometido el hígado durante la isquemia, lo cual probablemente conduce a diferentes mecanismos de daño en la I/R hepática (Casillas-Ramírez A. et al., 2006b, Elias-Miró M. et al., 2012a).

5.2 NEUTRÓFILOS Y CITOQUINAS

Numerosos trabajos han demostrado que la activación de los neutrófilos está implicada en el daño del parénquima hepático y en las alteraciones de la microcirculación asociados con la I/R (Cutrin J.C. et al., 2000, Jaeschke H. et al., 1992, Jaeschke H. et al., 1991c, Jaeschke H., 1990, Hisama N. et al., 1996, Jaeschke H. et al., 1993). La teoría clásica propone que el aumento en la expresión de moléculas de adhesión, tales como ICAM-1 y P-selectina son primordiales para la acumulación de neutrófilos y el consiguiente daño hepático asociado a la I/R (Figura 2). En este sentido, diferentes trabajos han demostrado que al prevenir la infiltración de neutrófilos a los tejidos, tanto disminuyendo el número de neutrófilos como previniendo la adhesión de éstos, se reduce significativamente el fallo microcirculatorio y el daño tisular en modelos animales de I/R (Lentsch A.B., 2000, Martinez-Mier G. et al., 2001) Oponiéndose a esta teoría, también hay resultados que demuestran que la acumulación de neutrófilos observada en el hígado después de la I/R no depende de la sobre-expresión de ICAM-1 o P-selectina (Casillas-Ramírez A. et al., 2006b, Peralta C. et al., 2013).

La citoquina pro-inflamatoria TNF- α puede ser protectora o perjudicial en la lesión y/o regeneración hepática dependiendo del tipo celular y de las condiciones experimentales, pudiendo estimular la muerte celular o inducir efectos hepatoprotectores. El TNF- α juega también un papel en la regeneración hepática, actuando de manera distinta según la dosis que se administre. La administración de dosis altas de TNF- α resulta en una pobre regeneración hepática, mientras que no tiene ningún efecto si se administra a dosis bajas. Por otro lado, esta citoquina induce la síntesis de DNA en cultivos de hepatocitos en presencia de suero, pero sin efecto mitogénico cuando los cultivos de hepatocitos son mantenidos en un medio libre de factores de crecimiento. Todas estas observaciones sugieren que el TNF- α actúa como un agente responsable de la iniciación de la proliferación hepatocitaria en la primera fase de regeneración hepática, dejando las células preparadas para responder a los factores de crecimiento (Fausto N. 2000, Yamada Y. et al., 1997). A través del receptor 1 del TNF- α (TNFR1), podría activar una vía dependiente de IL-6 en la que participa el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (Yamada Y. et al., 1997). Por otro lado, hay que señalar también que existen otros trabajos en PH con knock-out para TNFR1, en los que se demuestra que la proliferación hepática podía ser inducida por dos vías diferentes, una dependiente de TNF- α e IL-6, y una inducida por mitógenos, independiente de estas citoquinas (Ledda-Columbano G.M. et al., 1998).

5.3 EL ÓXIDO NÍTRICO

Algunos autores han observado que el NO ejerce un efecto beneficioso frente al daño por I/R hepática, mientras que otros estudios no destacan efecto alguno del NO, e incluso reportan una acción perjudicial de este mediador vasoactivo en el daño por I/R hepática. Estos efectos diferenciales del NO se pueden explicar por las diferencias en las enzimas productoras de NO (Casillas-Ramírez A. et al., 2006b).

En este contexto, algunos estudios sugieren que aunque la producción de NO derivada de la NOS constitutiva (cNOS) tendría efectos beneficiosos en I/R hepática, la producción de NO derivada de la NOS inducible (iNOS), contribuiría al daño hepático. El NO derivado de la isoforma cNOS, constitutivamente expresada, puede disminuir los desórdenes de la microcirculación durante las primeras horas de reperfusión. En cambio, el NO derivado de la iNOS no puede ser generado hasta varias horas después de la reperfusión debido a que esta isoforma requiere inducción transcripcional. El exceso de producción de NO derivado de la iNOS ya no sería beneficioso a la microcirculación a ese tiempo de reperfusión, y por el contrario se puede

combinar con los RLO y generar ONOO⁻. Además, hay estudios que proponen que el NO derivado de la iNOS induce la liberación de cyt c y de caspasas favoreciendo los procesos pro-apoptóticos. Sin embargo, también existen controversias en relación al papel del NO derivado de la iNOS, ya que otros estudios han sugerido que este NO es beneficioso porque induce la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 e inactiva caspasas (Casillas-Ramírez A. et al., 2006b).

Además, para entender los diferentes resultados en relación al papel del NO en la lesión por I/R hepática, es importante clarificar si la fuente de NO es endógena o exógena. Mientras que se ha demostrado que el NO endógeno puede reducir la acumulación de neutrófilos, la suplementación exógena de NO no modificó este parámetro pero se asoció con una inhibición en la producción de ET (Casillas-Ramírez A. et al., 2006b).

En cuanto a la influencia del NO sobre la regeneración hepática se ha demostrado que el NO es necesario para la viabilidad de los hepatocitos (Fausto N., 2000) y que juega un papel importante en la repoblación hepatocitaria del hígado (Koniaris L.G. et al., 2003). Tras una PH, el hígado remanente recibe el volumen de flujo sanguíneo que recibía el hígado entero y esto lleva a una mayor producción de NO por parte de la eNOS en las células endoteliales, lo cual es esencial para que las células del parénquima hepático entren en la fase G1 y empiece la regeneración hepática. Por otro lado, parece ser que la iNOS tendría un papel importante 6 a 8 horas después de la hepatectomía, y su inducción dependería de citoquinas (TNF- α e IL-6) (Koniaris L.G. et al., 2003). A pesar de estas observaciones existentes en la literatura también se ha descrito los efectos nocivos del NO en condiciones de PH bajo oclusión vascular (Ramalho F.S. et al., 2009).

6. LA IMPORTANCIA DE LA ESTEATOSIS EN LA CIRUGÍA HEPÁTICA

La esteatosis o hígado graso es la acumulación de cantidades excesivas de triglicéridos y otras grasas dentro de las células del hígado. Esta acumulación de grasas, es considerada patológica cuando excede el 5% del peso del hígado (Veteläinen R. et al., 2007).

La esteatosis hepática se puede caracterizar cuantitativamente y cualitativamente (Veteläinen R. et al., 2007). Se clasifica como esteatosis leve cuando menos de un 30% de los hepatocitos contienen grasa, moderada si contienen grasa entre un 30% y un 60% de los hepatocitos, y severa si contienen vacuolas lipídicas más de un 60% de los hepatocitos. La evaluación cualitativa divide la esteatosis en dos tipos: macrovesicular, cuando los hepatocitos contienen una única vacuola de gran tamaño que suele desplazar el núcleo del hepatocito hacia la periferia, y microvesicular, si el hepatocito contiene múltiples vacuolas pequeñas de grasa en el

citoplasma. Las circunstancias más habituales asociadas a esteatosis hepática son la obesidad, la diabetes tipo II, la ingesta de alcohol, la alimentación parenteral, enfermedades metabólicas y ciertos tipos de hepatitis infecciosas (McCormack L. et al., 2011).

La esteatosis hepática es la enfermedad crónica del hígado más común en el mundo y afecta a todos los grupos raciales, étnicos y de edad. Varios estudios han reportado una prevalencia del 10% al 20% de esteatosis en la población delgada, del 60 al 74% entre la población obesa y más de 90% en los obesos mórbidos. Aproximadamente un 3% de los niños delgados están afectados y la prevalencia incrementa hasta en un 53% en niños obesos. Debido al aumento de la obesidad en los países occidentales, se espera que en el futuro aumente la prevalencia de esteatosis hepática (Veteläinen R. et al., 2007).

La esteatosis hepática es un hallazgo histológico común en biopsias de hígado humano, y se estima que más del 20% de los pacientes programados para resección hepática presentan algún grado de esteatosis (Veteläinen V. et al., 2007). En posibles donantes de hígado, la prevalencia de esteatosis hepática es del 26% (Selzner M., Clavien P. A., 2001). En comparación con los hígados no esteatósicos, los hígados esteatósicos muestran fallo en la regeneración y reducción de la tolerancia frente a la lesión inducida por I/R. De hecho, se ha descrito la existencia de fallo hepático post-quirúrgico después de resecciones hepáticas en hígados con esteatosis (Belghiti J. et al., 2000, Behrns K.E. et al., 1998). Además el hecho de utilizar estos hígados en trasplantes hepáticos está asociado a un aumento en el riesgo de disfunción hepática o fallo primario después de la cirugía (Ploeg R.J. et al., 1993, Hayashi M. et al., 1999).

Teniendo en cuenta 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 o fallo primario tras la cirugía hepática y se aumentaría el número de injertos disponibles para ser trasplantados. Para lograrlo, es imprescindible el estudio de los mecanismos que conducen a la mayor susceptibilidad de un hígado esteatósico frente a la lesión por I/R y al fallo en la regeneración. Teniendo en cuenta que la lesión por I/R afecta negativamente el proceso de regeneración hepática, los trabajos descritos en la literatura se han basado principalmente en reducir la lesión inducida por I/R, ya que repercute favorablemente en la regeneración hepática.

7. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA LESIÓN POR ISQUEMIA –REPERFUSIÓN Y FALLO EN LA REGENERACIÓN EN EL HÍGADO ESTEATÓSICO

Como se ha mencionado anteriormente, los hígados esteatósicos toleran peor que los no esteatósicos la lesión por I/R y presentan mayores problemas de regeneración tras la cirugía (Casillas-Ramírez A. et al., 2006b, Selzner M. et al., 2001, Peralta C. et al., 2013, McCormack L. et al., 2011). A continuación se describen algunos de los posibles mecanismos implicados en la mayor susceptibilidad de los hígados esteatósicos frente a la lesión por I/R y al fallo en la regeneración.

7.1 EL ESTRÉS OXIDATIVO

Los hígados esteatósicos son más susceptibles que los no esteatósicos a la peroxidación lipídica debido a sus bajas defensas antioxidantes y/o su mayor producción de RLO. Durante la reperfusión la generación mitocondrial de RLO aumenta considerablemente, esto conduce a que las estructuras mitocondriales se vean expuestas al ataque de los RLO generados tanto fuera como dentro de estos orgánulos, conduciendo a la disfunción mitocondrial y al fallo en la síntesis de ATP. Uno de los efectos importantes de la producción descontrolada de RLO es la peroxidación lipídica de la membrana y de otros lípidos celulares, dando lugar a alteraciones estructurales y al deterioro funcional de los componentes celulares (Elias-Miró M. et al., 2013). Además los productos de la peroxidación lipídica, como por ejemplo el malondialdehído (MDA), podrían actuar como atrayentes de neutrófilos e inducir necrosis celular (Day C.P., James O.F., 1998, Curzio M et al., 1985). La causa de este aumento en la peroxidación lipídica podría ser debido a que en los hígados esteatósicos hay una mayor cantidad de substrato fácilmente oxidable (Letteron P. et al., 1996). En condiciones basales, los sistemas antioxidantes del hígado son suficientes para contrarrestar la peroxidación lipídica que se produce en el hígado. Sin embargo, en hígados esteatósicos sometidos a PH bajo I/R la peroxidación de lípidos se ve muy incrementada y los sistemas antioxidantes del hígado se ven sobresaturados.

Diferentes trabajos se han centrado en prevenir el aumento de estrés oxidativo observado en los hígados esteatósicos. No obstante, los datos obtenidos en los estudios en los que se administraban antioxidantes han sido contradictorios. Algunos de estos estudios en ratas Zucker obesas, modelo bien caracterizado de obesidad, indican que la administración de tocoferol, que tiene propiedades antioxidantes, aumenta la tolerancia del hígado esteatósico a la isquemia caliente. Por otro lado, estudios experimentales en hígados esteatósicos inducidos mediante dieta

deficiente en colina-metionina, mostraron que la administración de precursores de GSH, como la N-acetilcisteína, pueden ayudar a restaurar la integridad hepatocitaria en los hígados esteatósicos pero sin bloquear los RLO. Además, en hígados esteatósicos inducidos por 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 (Elias-Miró M. et al., 2013, Selzner M. et al., 2000, Soltys K. et al., 2001, Nardo B. et al. 2001, Caraceni P. et al., 2005).

7.2 LA ACUMULACIÓN DE NEUTRÓFILOS Y ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS DE KUPFFER

El exceso de grasa en un hígado esteatósico produce alteraciones en la fluidez de las membranas debido a la menor presencia de colesterol y de ácidos grasos poli-insaturados (Fukumori T. et al., 1999). Estas alteraciones, junto con el mayor deterioro que sufren las células endoteliales tras la isquemia, podría derivar en un aumento en la infiltración de neutrófilos en el tejido hepático (Hui A.M. et al. 1994, Fukumori T. et al., 1999, Nakano H. et al., 1997) (Figura 2). La implicación de los neutrófilos en la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos frente a la lesión por I/R está documentada en diversos estudios, especialmente en hígados grasos inducidos por alcohol (Teramoto K. et al., 1993). En un modelo experimental de trasplante hepático en ratas Zucker se ha demostrado que el bloqueo de integrinas y selectinas, moléculas implicadas en la adhesión de los neutrófilos al endotelio sinusoidal, redujo la lesión hepática y aumentó la supervivencia de las ratas tras el trasplante hepático (Amersi F. et al., 2002, Amersi F. et al., 2003, Fondevila C. et al., 2005). Por otra parte, en otros modelos de esteatosis hepática los neutrófilos no parecen ser los responsables de la poca tolerancia de los hígados esteatósicos frente a la lesión por I/R (Serafín A. et al., 2002, Nakano H. et al., 1997, Yamada S. et al., 2000). En este sentido, se ha observado la misma acumulación de neutrófilos en hígados esteatósicos que en no esteatósicos en ratas Zucker sometidas a I/R hepática normotérmica, incluso en modelos de esteatosis hepática inducida por la ingesta de una dieta rica en colesterol (Koneru B. et al., 1995, Sun C.K. et al., 2001). En los hígados grasos, se ha demostrado un aumento en el número y en la actividad fagocítica de las CK, con respecto a los hígados no esteatósicos (Teramoto K. et al., 1993). Este hecho podría explicar la vulnerabilidad de los hígados grasos a la lesión por I/R, ya que las CK son una fuente muy importante de RLO y citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la IL-1. Tales citoquinas inhiben el proceso de regeneración hepática.

7.3 LAS ALTERACIONES EN LA MICROCIRCULACIÓN HEPÁTICA

La acumulación de grasa en el citoplasma de los hepatocitos está asociada con un aumento en el volumen celular, que puede resultar en una obstrucción parcial o total del espacio sinusoidal hepático, causando un aumento en la resistencia intraportal hepática y una disminución del flujo sanguíneo que reciben los hepatocitos con infiltración grasa (Ricci C. et al., 1997). En humanos y modelos experimentales se ha demostrado que en el hígado graso se produce una disminución de aproximadamente el 50% del flujo sanguíneo sinusoidal, respecto a los hígados no esteatósicos lo que podría inducir un estado de hipoxia crónica (Hayashi M. et al., 1999, Seifalian A.M. et al., 1998, Teramoto K. et al., 1993, Hakamada K. et al., 1997, Teramoto K. et al., 1994, Wada K et al., 1974). Esta disminución en el flujo sanguíneo se debe al aumento de tamaño de los hepatocitos debido a la presencia de vacuolas lipídicas en su citoplasma y a un estrechamiento de la luz sinusoidal (Teramoto K. et al., 1993, Hakamada K. et al., 1997, Teramoto K. et al., 1994, Wada K. et al., 1974). Estas alteraciones en la microcirculación podrían amplificar los efectos negativos producidos por la I/R sobre la lesión y regeneración hepática.

7.4 EL MECANISMO DE MUERTE CELULAR

Se ha de mencionar también, que una característica clave del daño isquémico en el hígado no esteatósico es la apoptosis, una forma activa de muerte celular que requiere energía. La apoptosis permite la eliminación de células dañadas con la mínima respuesta inflamatoria (Selzner M. et al., 2000, Selzner M. et al., 2001, Selzner M. et al., 2003a, Jaeschke H. et al., 2003, Hong F. et al., 2004). En cambio, la muerte celular predominante en los hígados esteatósicos es la necrosis. En la muerte celular por necrosis se produce una rotura inespecífica de los orgánulos celulares y de la membrana citoplasmática, así pues se libera el contenido celular, agravando la lesión inflamatoria hepática (Selzner M. et al., 2001, Behrns K.E. et al., 1998, Crowley H. et al., 2000).

Se ha demostrado que los hígados esteatósicos presentan alteraciones en la vía de señalización apoptótica. En consonancia, estrategias terapéuticas basadas en la inhibición de la apoptosis, que reducen el daño isquémico en hígados no esteatósicos, no son capaces de proteger en presencia de esteatosis (Casillas-Ramírez A. et al., 2006b, Selzner M. et al., 2000).

El término “necrapoptosis” se utiliza para describir un proceso que empieza con una señal de muerte celular común y el cual culmina ya sea en lisis celular (muerte celular necrótica) o en reabsorción celular programada (apoptosis) (Casillas-Ramírez A. et al., 2006b, Peralta C. et al., 2013). 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 M. et al., 2001, Behrns K.E. et al., 1998, Crowley H. et al., 2000).

7.5 LAS ALTERACIONES EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO

El restablecimiento de los niveles de ATP durante la restauración del flujo sanguíneo tras la isquemia hepática en ratas ha sido reportado como un determinante de la viabilidad del tejido hepático y de la tasa de supervivencia (Vollmar B. et al., 1994). El ATP es una molécula necesaria para la síntesis de DNA (Harvey P.R. et al., 1988). Durante la regeneración del hígado, el ATP es esencial en la transición del ciclo celular de la fase G1 a la fase S (Lee D.G., Bell S.P., 2000). Resultados obtenidos en un modelo de PH mostraron que existe una relación estrecha entre los niveles de ATP en el hígado remanente y la regeneración hepática del mismo (Maruyama H. et al., 1995). Existe una correlación directa entre el contenido de ATP en el hígado al final de la isquemia fría y la recuperación del paciente trasplantado (Harvey P. R. et al., 1988). Diversos estudios muestran que tras varias horas de isquemia normotérmica o fría los hígados esteatósicos presentan una depleción de los niveles de ATP mayor que la sufrida por los hígados no esteatósicos (Fukumori T. et al., 1997, Selzner N. et al., 2003a). Por el contrario, en otros estudios llevados a cabo en un modelo de isquemia hepática normotérmica se observaron niveles semejantes de ATP en ambos tipos de hígados durante la isquemia pero una recuperación del metabolismo energético más lenta durante la reperfusión en los hígados esteatósicos (Trevisani F. et al., 1996). Según estos datos, la esteatosis no afecta directamente al metabolismo energético de los hepatocitos durante la isquemia, pero reduce la capacidad de las mitocondrias de generar ATP al iniciarse la reperfusión (Hui A.M. et al., 1994, Fukumori T. et al., 1997, Fromenty B. et al., 1997, Miki C. et al., 1998, Chavin K.D. et al., 1999, Cortez-Pinto H. et al., 1999, Rashid A. et al., 1999, Caraceni P. et al., 2004). Para explicar tales resultados, diversos autores postulan que la presencia de grasa en el hepatocito produce diversas alteraciones en las mitocondrias que se hacen mucho más evidentes tras un proceso de I/R y que dan lugar a la producción de RLO y a un significativo deterioro del metabolismo energético tras el trasplante, siendo ambos factores responsables de la poca tolerancia que presentan los hígados esteatósicos a la lesión por I/R y al

fallo en la regeneración (Hui A.M. et al., 1994, Fukumori T. et al., 1997, Miki C. et al., 1998, Nardo B. et al., 2000, Vendemiale G. et al., 2001).

8. EL RECEPTOR TIPO TOLL 4

Los receptores TLR son proteínas transmembrana tipo I. Hasta el momento se han identificado 11 receptores TLR en humanos, mientras que en ratón se han identificado 13 TLR. Los TLR 1-9 están conservados en el hombre y el ratón (Medzhitov R. et al., 1997, Takeda K. et al., 2005).

En cuanto a la localización celular de los receptores TLR, los receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 se localizan en la membrana plasmática, mientras que el TLR7, TLR8 y TLR9 se localizan en los endosomas (Takeda K. et al., 2005, Akira S. et al., 2003).

De todos los TLR, el primero identificado en humanos y mejor caracterizado es el TLR4. Es una proteína transmembrana que existe principalmente en los macrófagos, como las CK del hígado, y que juega un papel esencial en la respuesta inflamatoria (O'Neill L.A. et al., 2007).

El ligando específico para el receptor TLR4, es el LPS, componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. El TLR4 no reconoce directamente al LPS, sino que debe unirse a la proteína adaptadora MD-2 en su parte extracelular (Figura 3). El LPS a su vez, se une a la proteína de unión a LPS y a la proteína CD14 localizada en la superficie de los fagocitos.

La interacción ligando-receptor provoca una dimerización del mismo y el inicio de la cascada de señalización en el que intervienen varias proteínas adaptadoras. La vía de señalización consiste, al menos, en dos rutas: vía dependiente del MyD88, común a todos los receptores TLR excepto al TLR3 y la vía independiente de MyD88, propia del TLR4 (Akira S. et al., 2003).

Tras la unión del ligando, el receptor dimeriza y se inicia la vía dependiente del MyD88. El receptor cambia su conformación y facilita la unión de proteínas adaptadoras a través dominio TIR: la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR (TIRAP), también llamada Mal. La proteína MyD88 recluta y activa a IRAK-4 (quinasa asociada a IL-1R) que fosforila a IRAK-1, necesario para formar un complejo con el factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral 6 (TRAF6). La formación del complejo IRAK-4/IRAK-1/TRAF6 induce un cambio conformacional que libera el complejo del receptor. A continuación este complejo interacciona en la membrana con la proteína unida a TAK (TAB2) lo que provoca la liberación de las proteínas IRAK y la formación de un nuevo complejo compuesto por TAB2, TAK1 (quinasa asociada a TGF- α), TAB1 y TRAF6 que se libera al citosol. La

translocación al citosol hace que TAK1 se active y provoque la activación de las MAPK y de la quinasa de I κ B (IKK) que fosforila a I κ B (inhibidor de NF κ B), degradándose ésta y liberando a NF κ B, este pasa al núcleo e induce la expresión de mediadores inflamatorios tales como la iNOS, la ciclooxigenasa-2 (COX2) y citocinas inflamatorias (Takeda K. et al., 2005, Akira S. et al., 2003, O'Neill L.A. et al., 2007).

En la vía independiente de MyD88, la estimulación con LPS provoca la interacción del receptor con dos proteínas adaptadoras, la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM) y la que induce Interferon β (IFN β) y que contiene el dominio TIR (TRIF), produciéndose la activación del factor de transcripción IRF-3 (factor regulador de interferón) que se fosforila y se transloca al núcleo donde induce la producción de IFN β . Éste último activa a las proteínas STAT (transductor de señal y activador de la transcripción) con la consiguiente activación de genes inducibles por interferón como IFN β , IRF-1, IP-10 o VCAM-1 (Akira S. et al., 2003, Toshchakov V. et al., 2002) (Figura 3.).

8.1 EL TLR4 Y LA LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN HEPÁTICA

Estudios previos señalan la implicación del TLR4 en el daño hepático en diversos modelos experimentales de inflamación (Gong Q. et al., 2010, Kang J.W. et al., 2011). La inhibición de la expresión del gen de TLR4 puede reducir la lesión hepática en modelos experimentales de daño hepático agudo (Zhai Y. et al., 2004). El tratamiento con E5564, un antagonista de TLR4, mejora la tasa de supervivencia de ratas con fallo hepático fulminante inducido por D-galactosamina y LPS (Kitazawa T. et al., 2010).

Numerosos estudios han señalado que la vía de señalización del TLR4 es responsable del daño por I/R en hígados no esteatósicos sometidos a isquemia normotérmica (Zhai Y. et al., 2004, Tsung A. et al., 2005, Shen X.D. et al., 2007, Zhai Y. et al., 2008, Jiang N. et al., 2011, Ellett J.D. et al., 2011, Mandal P. et al., 2010) o trasplante hepático (Shen X.D. et al., 2007, Shen X.D. et al., 2011). Además, la interrupción de la señalización de TLR4 tiene efectos beneficiosos sobre la lesión hepática en hígados esteatósicos sometidos a I/R normotérmica.

Aunque la señalización del TLR4 es relevante en la lesión por I/R hepática, existe cierta controversia sobre cuáles de las vías de señalización (MyD88 y/o TRIF) es la activada tras la I/R hepática (Kang J.W. et al., 2011, Zhai Y. et al., 2004). Hasta la fecha, no se ha descrito cuál es el papel del TLR4 en injertos hepáticos esteatósicos sometidos a PH bajo oclusión vascular.

8.2 EL TLR4 Y LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Los resultados sobre el papel de la vía del TLR4 en la regeneración hepática han sido motivo de controversia (Li X. et al., 2004, Yee S.B. et al., 2003). Los estudios, realizados en modelos experimentales de CCL4 mostraron que la vía TLR4/MyD88 era crítico para la iniciación de la regeneración del hígado (Li X. et al., 2004) ya que ratones mutantes para el TLR4 no pudieron restaurar su función normal hepática (Su G.L. et al., 2004). Siguiendo con la misma línea, un fallo en la regeneración hepática se observó en ratones deficientes en MyD88 tras una PH sin oclusión vascular. Este fenómeno se asoció con la disminución en la expresión de genes implicados en la replicación de hepatocitos, en la expresión de STAT3 y en la producción de TNF- α /IL-6 en CK. Por otro lado, estudios posteriores en PH sin oclusión vascular indican que ratones deficientes en MyD88 no expresaron fallo en la regeneración hepática (Campbell J. S. et al., 2006). Las diferencias en la técnica quirúrgica y en las condiciones experimentales pueden ayudar a explicar, al menos parcialmente, los diferentes hallazgos sobre el papel de la vía del TLR4, específicamente la vía dependiente de MyD88 en la regeneración hepática (Yin S., Gao B., 2010). Se desconoce el papel

de la vía del TLR4 en la lesión y regeneración en hígados esteatósicos y no esteatósicos sometidos a PH bajo oclusión vascular.

9. EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

El tejido adiposo se encuentra compuesto por células especializadas, denominadas adipocitos, que almacenan grandes cantidades de triacilgliceroles en forma de gotas de grasa que ocupan casi totalmente la célula. Los adipocitos se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo y son metabólicamente muy activos y responden rápidamente a estímulos hormonales en coordinación metabólica con el hígado, el músculo esquelético y el corazón.

Como otros tipos celulares, los adipocitos tienen un activo metabolismo glucolítico, utilizan el ciclo del ácido cítrico para oxidar el piruvato y los ácidos grasos y realizan la fosforilación oxidativa mitocondrial. En periodos de elevada ingesta de glúcidos, el tejido adiposo puede convertir la glucosa (a través de la formación de piruvato y acetil-CoA) en ácidos grasos, convertir los ácidos grasos en triglicéridos (TG) y almacenarlos como grandes glóbulos de grasa, aunque en los seres humanos la mayor parte de la síntesis de ácidos grasos tiene lugar en los hepatocitos. Los adipocitos también almacenan TG, que proceden del hígado (transportados en la sangre en forma de VLDL) y del tracto intestinal (transportados en los quilomicrones) (Nelson L., Cox M., 2006).

El tejido adiposo puede diferenciarse morfológica y funcionalmente en tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón, que difieren entre sí, en cuanto a color, morfología, distribución, genes y función (Guisado-Requena I.M. et al., 2009). El tejido adiposo blanco (TAB) es el tipo de tejido adiposo predominante en los seres humanos (Ahima R.S., Flier J.S., 2000) y se encuentra distribuido en el organismo en tres distintas zonas: la subcutánea, la dermis y la intraperitoneal (Hausman D. B. et al., 2001). Tiene una estructura intracelular uniforme, cada adipocito contiene una gran gota central de TG (Subramanian V. et al, 2004). Además contiene fibroblastos, células endoteliales, preadipocitos, y macrófagos (Blancas-Flores G. et al., 2010).

El TAB tiene las siguientes funciones: reservorio de energía, almacena ácidos grasos y los libera a la circulación para mantener adecuadas concentraciones sistémicas; sintetiza lípidos a partir de excedentes de hidratos de carbono o proteínas; responde a estímulos hormonales y nerviosos; y secreta sus propias hormonas, las llamadas adipocitoquinas (Trayhurn P., Beattie J.H., 2001) (Figura 4). Recientemente se está proponiendo al tejido adiposo como una fuente importante de células madre adultas (Fernyhough M. E. et al, 2008).

Al TAB actúa como un órgano endocrino encargado de secretar diferentes adipocitoquinas tales como citoquinas, hormonas y factores de crecimiento. Intervienen en la regulación de la homeostasis energética, sensibilidad insulínica, metabolismo de lípidos y carbohidratos (Havel P. J., 2004) y regeneración hepática (Ezaki H. et al., 2009, Tsai C. Y et al., 2011) (Figura 4).

En resecciones hepáticas el hígado no es capaz de mantener la homeostasis de la glucosa debido a su tamaño reducido, lo que conduce a una hipoglucemia considerable (Rao M.S., Reddy J.K., 2000). En el inicio de la regeneración del hígado, los hepatocitos remanentes utilizan la β -oxidación de los ácidos grasos en lugar de la glucosa como fuente de energía (Wang G. et al., 2004). El hígado en regeneración desencadena vías de señalización con la finalidad de que los ácidos grasos sean liberados del tejido adiposo periférico y captados por el hígado, lo cual a su vez puede promover lipogénesis hepática y conduce a la rápida acumulación intracelular de TG (Newberry E.P. et al., 2008) (Figura 4).

Palmero E. et al. (1999) señalaron que ratas sometidas a PH presentaban un aumento en la actividad de la lipoproteína lipasa en el TAB y en el músculo esquelético. Estudios recientes han demostrado por diferentes estrategias farmacológicas (como clofibrato, leptina, o propranolol) y genéticas (basadas en alteraciones de la expresión del receptor de glucocorticoides) que la inhibición de la regeneración hepática tras una PH es debida a una disminución de la acumulación de grasa hepática (Srinivasan S.R. et al., 1990, Shteyer E. et al., 2004, Walldorf J. et al., 2010, Shteyer E. et al., 2004). Estos resultados indicarían un papel indispensable de la esteatosis hepática transitoria en la regeneración del hígado tras una PH. Sin embargo, a pesar de que la regeneración del hígado está fisiológicamente asociada con una esteatosis transitoria, existen considerables evidencias de que la acumulación de grasa en el hígado es un factor que afecta negativamente el proceso de regeneración hepática (Zhang B.H. et al., 1999).

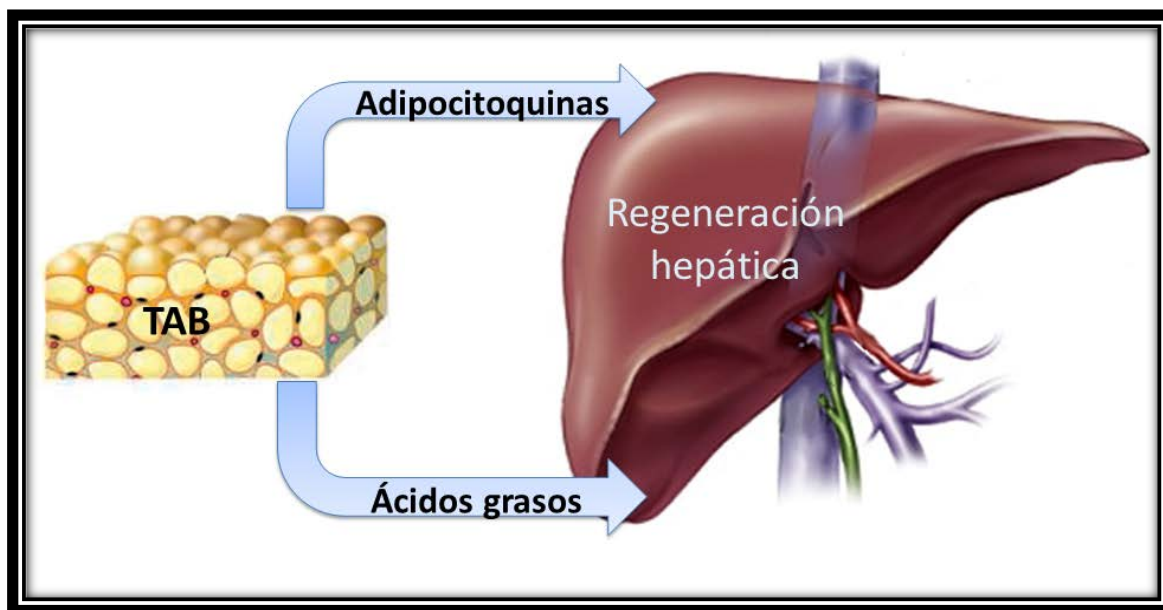


Figura 4. Funciones del tejido adiposo blanco (TAB) en la regeneración

10. LAS ADIPOCITOQUINAS

El término “adipocitoquinas” (citoquinas del tejido adiposo) comprende a factores polipeptídicos sintetizados mayoritariamente en el tejido adiposo. En los últimos años, las investigaciones se han centrado en las adipocitoquinas como potenciales dianas terapéuticas en distintas patologías relacionadas con la obesidad y el síndrome metabólico. Las adipocitoquinas regulan la esteatosis, inflamación y fibrosis (Marra F., Bertolani C., 2009). Estudios recientes han implicado a las adipocitoquinas en la vulnerabilidad de los hígados esteatósicos a la lesión por I/R normotérmica (Massip-Salcedo M. et al., 2008, Man K. et al., 2005, Casillas-Ramírez A. et al., 2011, Elias-Miró M., 2012b). Tal y como se expondrá a continuación, no existen estudios acerca del papel de las adipocitoquinas tales como la adiponectina, visfatina y resistina en la lesión por I/R y en la regeneración hepática en condiciones de PH ni en los hígados esteatósicos ni en los no esteatósicos.

10.1 LA ADIPONECTINA

La adiponectina es una proteína que circula en el plasma como una estructura trimérica de peso molecular bajo (LMW), estructura hexamérica de peso molecular medio (MMW) y polimérica o de peso molecular alto (HMW), pero las actividades metabólicas se relacionan principalmente con la forma HMW que es la forma más activa en el hígado (Wang Y. et al., 2009, Whitehead J.P. et al., 2006, Wang Y. et al., 2006).

Los principales receptores de la adiponectina *in vivo* son AdipoR1 y AdipoR2 que pertenecen a la familia de receptores que contienen dominios transmembrana. AdipoR1 se expresa abundantemente en el músculo y está estrechamente vinculado a la activación de la vía de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) que regula la inhibición de la gluconeogénesis junto con una mayor oxidación de ácidos grasos. AdipoR2 se expresa en el músculo y en el hígado, y parece asociarse con la activación del PPAR α , la inhibición de la inflamación y del estrés oxidativo (Yamauchi T. et al., 2007).

Se sabe que la adiponectina se sintetiza mayoritariamente en el tejido adiposo. Por otro lado, existen controversias en relación a la síntesis de esta adipocitoquina en hígado. Mientras unos autores señalan que la adiponectina es captada por los hepatocitos a partir de la circulación (Wang Y. et al., 2006, Neumeier M. et al., 2006), otros sugieren que el hígado es capaz de sintetizar tal adipocitoquina (Kaser S. et al., 2005).

10.1.1 EL PAPEL DE LA ADIPONECTINA EN LA LESION POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

La adiponectina se considera como un posible regulador de la esteatosis e inflamación hepática asociada a diferentes desórdenes hepáticos (Schaffler A. et al., 2005, Polyzos S.A. et al., 2010, Czaja M.J., 2004, Mandal P. et al., 2010, Marra F., Bertolani C., 2009, Schaffler A. et al., 2005, Polyzos S.A. et al., 2010, Czaja M.J., 2004, Park P.H. et al., 2006, Xu A. et al., 2003). Debido a las propiedades anti-obesidad y anti-inflamatorias de la adiponectina, el uso de esta adipocitoquina podría ser un estrategia prometedora para el tratamiento de hígados esteatósicos sometidos a I/R. Es bien conocido el papel de la infiltración grasa y la inflamación en la vulnerabilidad de los hígados esteatósicos frente a la lesión por I/R (Casillas-Ramírez A, et al., 2006b, Selzner M., Clavien P.A., 2001, Massip-Salcedo M. et al., 2007). Sólo dos estudios han descrito un papel de la adiponectina en los hígados esteatósicos sometidos a I/R (Massip-Salcedo M. et al., 2008, Man K. et al., 2006). En el primero de tales estudios (Massip-Salcedo M. et al., 2008), se mostraron efectos perjudiciales de la adiponectina en hígados esteatósicos sometidos a isquemia normotérmica. En estas condiciones, los hígados esteatósicos mostraron niveles mayores de adiponectina (tanto de mRNA como de proteína) al compararlos con los hígados no esteatósicos. El tratamiento con silenciadores de adiponectina, redujo el estrés oxidativo y las lesiones hepáticas en los hígados esteatósicos. En el mismo estudio, el preconditionamiento isquémico redujo la acumulación de adiponectina en los hígados esteatósicos y sus efectos negativos sobre el estrés oxidativo y el daño hepático. En otro estudio, realizado en injertos hepáticos esteatósico de tamaño reducido, se

demonstraron niveles séricos elevados de adiponectina posterior al trasplante (Man K. et al., 2006). El tratamiento con adiponectina ejerció efectos anti-inflamatorios y mejoró la microcirculación hepática. Los efectos anti-inflamatorios de la adiponectina fueron mediados por la Akt y el NO (Figura 5). Los efectos beneficiosos de la adiponectina han sido también demostrados en trasplante con injerto esteatósico de tamaño estandar (Jiménez-Castro M.B. et al., 2013). El papel protector de la adiponectina fue descrito también descrito por Zhang C. et al. (2013) en hígados de ratas no esteatósicos sometidos a I/R, donde la administración de adiponectina redujo la respuesta inflamatoria y la apoptosis de los hepatocitos, lo que está relacionado con la capacidad de la adiponectina para activar la vía del AMPK/eNOS (Figura 5).

10.1.2 EL PAPEL DE LA ADIPONECTINA EN LA REGENERACIÓN

La adiponectina juega un papel clave en el metabolismo lipídico, energético y en la proliferación celular los cuales son esenciales en la regeneración hepática (Michalopoulos G. K., DeFrances M.C., 1997). Shu R. Z. et al. (2009) señalaron que se requiere adiponectina para la progresión de la regeneración hepática. Estos autores demostraron que en ratones knock-out de adiponectina, sometidos a PH del 70% se observó un fallo en la regeneración hepática y alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos. Tales efectos fueron asociados a una reducción del STAT3 y a un aumento de la expresión génica del supresora de la señalización por citocinas-3 (Socs3) (Figura 5). De la misma manera Ezaki H. et al. (2009) demuestran que ratones knock-out de adiponectina, sometidos a PH del 70%, presentan un retardo en la regeneración hepática debido a la reducción en la expresión de la ciclina y disfunciones en la oxidación de ácidos grasos. Además, la expresión del receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR α) y de la carnitina palmitoiltransferasa-1 (CPT-1), una enzima importante para la oxidación mitocondrial del ácido graso, estaba disminuida en estos animales, lo que sugiere que la ausencia de esta adipocitoquina es responsable de las alteraciones en el metabolismo lipídico (Shu R.Z. et al., 2009). Adicionalmente, Man K. et al. (2006) demostraron las propiedades anti-obesidad y regenerativas de la adiponectina en trasplantes con injertos esteatósicos de tamaño reducido, señalando que la adiponectina era capaz de regular la expresión de FAS y UCP2 y aumentar de los niveles hepáticos de ATP (Figura 5).

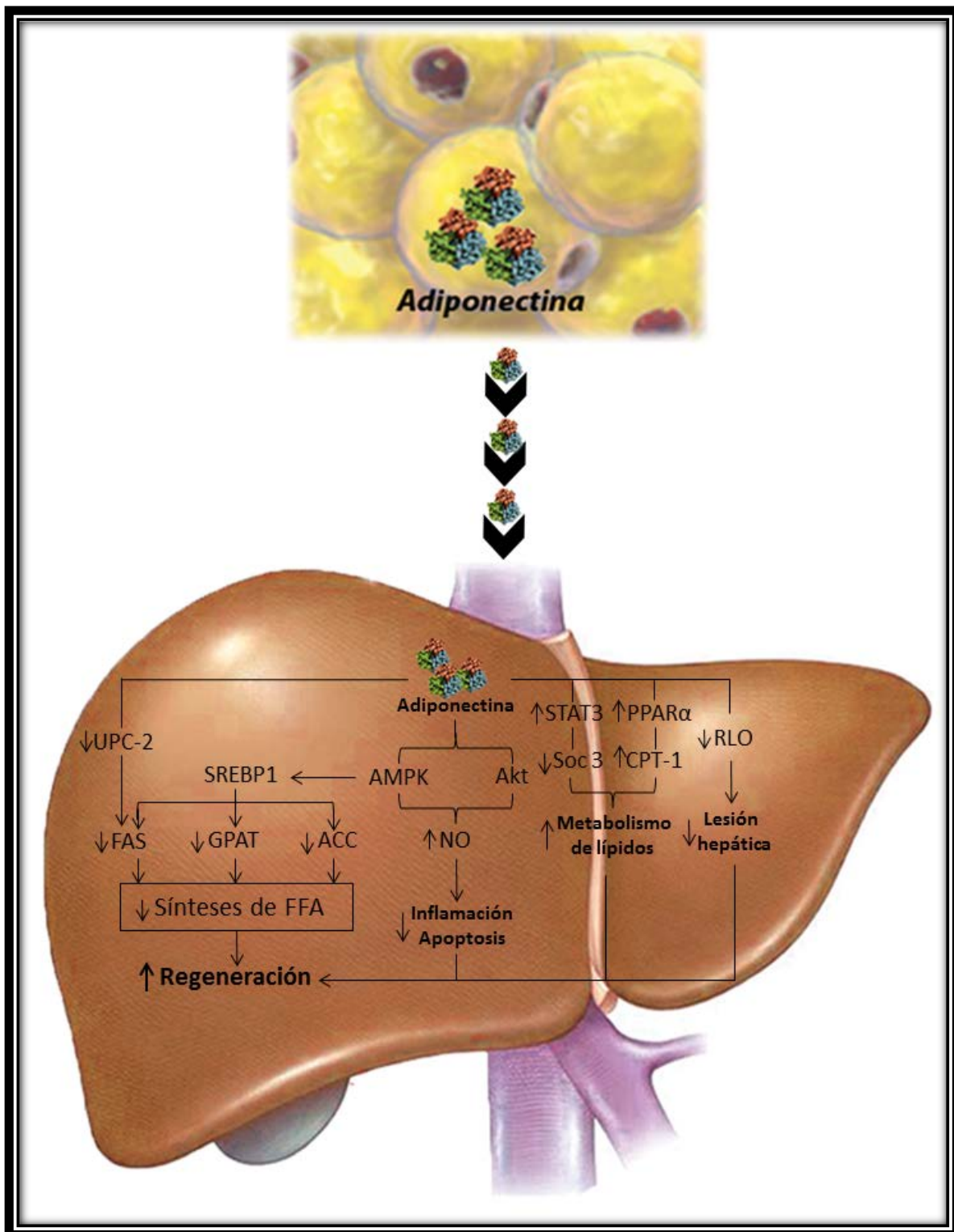


Figura 5. Efecto de la adiponectina sintetizada en el tejido adiposo sobre las vías de señalización implicadas en la lesión y la regeneración hepática. UPC: proteína mitocondrial desacoplante, FAS: sintasa de ácidos grasos, SREBPS: proteínas ligadoras de elementos reguladoras de esterol, GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferasas, ACC: acetil-CoA carboxilasa, AMPK: proteína quinasa dependiente de AMP, Akt: proteína serina/treonina quinasa, Socs 3: supresora de la señalización por citocinas-3, CPT-1: carnitina palmitoiltransferasa-1, NO: óxido nítrico, RLO: radicales libres de oxígeno.

10.2 LA RESISTINA

La resistina es una hormona dimérica de 114 aminoácidos y de 12,5 kDa (Bokarewa M. et al., 2005). La resistina recibe su nombre por su supuesto efecto en la inducción de resistencia a la insulina en ratones (Kusminsky C.M. et al., 2005). Se ha encontrado en adipocitos, macrófagos y en otros tipos de células (Steppan C. M. et al., 2001). En roedores, se expresa casi exclusivamente en los adipocitos (Kershaw E.E. et al., 2004, Steppan C. M., Lazar M.A., 2004), mientras que en los seres humanos la expresión de resistina es difícilmente detectable en los adipocitos y se encuentra principalmente en monocitos/macrófagos (Lehrke M. et al., 2004, Savage D.B. et al., 2001, Steppan C.M., Lazar M.A., 2004). Estos diferentes patrones de expresión posiblemente se traducen en diferentes propiedades biológicas de la resistina en roedores y seres humanos (Steppan C.M., Lazar M.A., 2004).

La resistina circula en sangre bajo dos formas distintas de ensamblaje: HMW y LMW, siendo esta última la biológicamente activa. Hasta el momento no se conocen con exactitud las posibles funciones biológicas de la resistina. Se ha propuesto que la resistina podría jugar un papel en el desarrollo de resistencia a la insulina, en la adipogénesis y en la inflamación, aunque existen grandes divergencias entre los diferentes estudios. Estas discrepancias pueden deberse a la metodología empleada en su determinación, a diferencias en el comportamiento de la misma en los distintos modelos animales empleados y a que pueda ser diferente su regulación dependiendo de si se trata de una situación fisiológica o de una patología (Kusminsky C.M. et al., 2005, Steppan C. M., Lazar M. A., 2004).

10.2.1 EL PAPEL DE LA RESISTINA EN LA LESION POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

La resistina es capaz de inducir y de responder a los estímulos inflamatorios, incluyendo las citoquinas, los mitógenos y las endotoxinas (Tarkowski A. et al., 2010). En pacientes sometidos a cirugía cardíaca con bypass cardiopulmonar se ha identificado un aumento de la resistina, lo que permite a los autores relacionar la ocurrencia de la lesión por I/R con el proceso inflamatorio. Se encontró que los altos niveles de resistina pueden ser considerados como factores predictivos de mortalidad en pacientes con infarto agudo del miocardio (Liangos O. et al., 2010). La resistina agrava significativamente la lesión inducida por I/R cardíaca en ratas a través del TNF- α , vía NF- κ B (Rothwell S. E. et al., 2006) (Figura 6). La resistina protege frente a la apoptosis de los miocitos en infarto de miocardio a través de la activación de la vía PI3K/Akt/PKC ϵ /KATP (Figura 6). Además de

lo anteriormente mencionado, los niveles circulantes de resistina se asociaron a un mayor riesgo de incidencia de isquemia cerebral (Rajpathak S. N. et al., 2011) (Figura 6).

Se ha descrito que la resistina ejerce un efecto perjudicial en patologías hepáticas. Las evidencias vinculan la resistina con la inflamación hepática, y señalan que el hígado puede contribuir más al aumento de los niveles de resistina en circulación que el tejido adiposo (Marra F., Bertolani C., 2009). De hecho, niveles incrementados de resistina se han relacionado con la severidad de la enfermedad en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (Pagano C. et al., 2006) y en pacientes con cirrosis (Bahr M.J., et al., 2006). En ratones, la administración de la resistina empeora significativamente la inflamación y la lesión hepática inducida por LPS (Beier J. I. et al., 2008).

10.2.2 EL PAPEL DE LA RESISTINA EN LA REGENERACIÓN

Hay pocos estudios sobre los efectos proliferativos de la resistina en las células. Se ha mencionado que la resistina induce la proliferación de células humanas aórticas del músculo liso a través de las vías de señalización ERK1/2 y de PI3K/Akt (Calabro P. et al., 2004) (Figura 6). Siguiendo con la misma línea, la resistina induce la proliferación y la migración de células endoteliales humanas y promueve la formación de capilares, incrementa la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y de las metaloproteinasas de matriz, y activa las vías ERK 1/2 y p38 (Jung H. S. et al., 2006, Burnett M. S. et al., 2005) (Figura 6). Por lo tanto, la resistina puede desempeñar un papel importante en los trastornos vasculares asociadas con la angiogénesis. La participación de la resistina en los efectos inducidos por la adiponectina sobre la lesión hepática, la supervivencia y la proliferación celular en el trasplante de hígados esteatósicos en ratas ha sido identificado por Jiménez-Castro M. et al. (2013) (Figura 6). En tal estudio, la resistina aumentó la expresión de la vía PI3K/Akt, la cual juega un papel crucial en la supervivencia celular (Liu C. M. et al., 2013, Casillas-Ramírez A. et al., 2006b) (Figura 6). Se desconoce si tales efectos podrían ser extrapolados a condiciones quirúrgicas de PH bajo oclusión vascular.

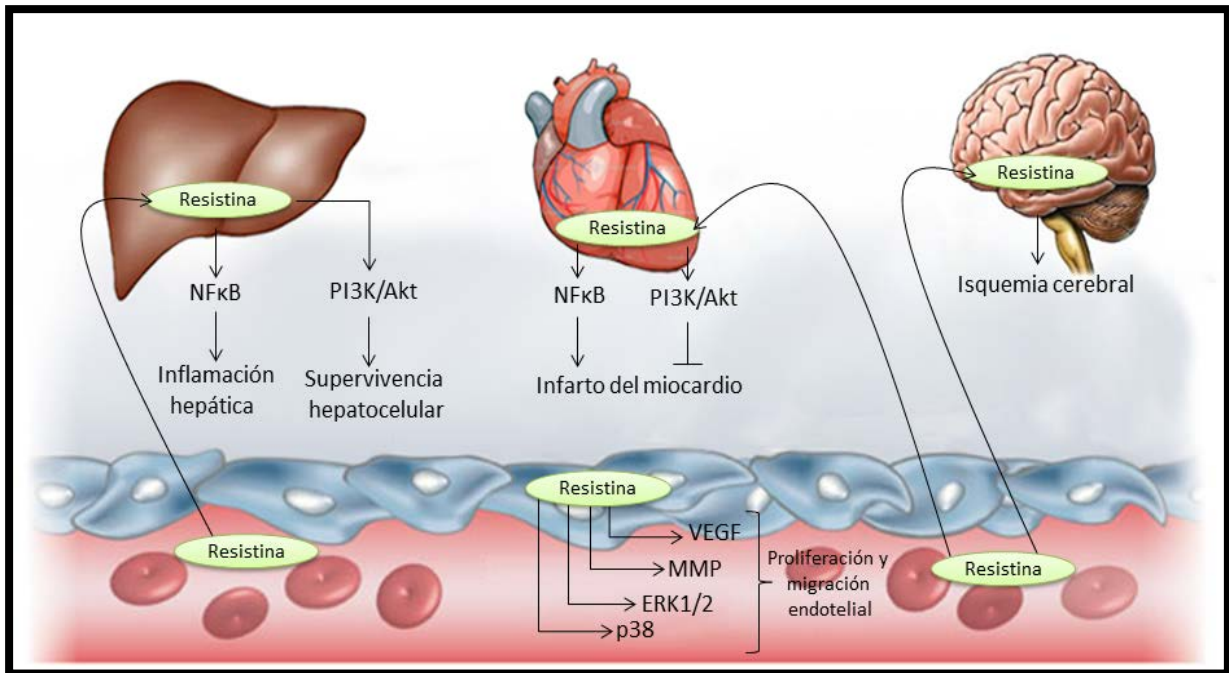


Figura 6. Efecto de la resistina en diferentes patologías. NFκB: Factor nuclear kappa β, PI3K/Akt: fosfatidil inositol 3 quinasa/ proteína serina/treonina quinasa, VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular, MMP: metaloproteasa de la matriz, ERK1/2: quinasa regulada por señales extracelulares, p38: proteína quinasa activada por mitógenos.

10.3 LA VISFATINA

La visfatina denominada inicialmente como nicotinamida fosforribosil transferasa (Nampt), es una proteína de 52 kDa, sintetizada por células de la médula ósea, del hígado, del músculo y linfocitos. Inicialmente se le identificó como un factor estimulante de las colonias de células pre-B (PBEF) que inhibe la apoptosis de los neutrófilos activados y aumenta la maduración de precursores de células β en presencia de IL-7. Posteriormente, Nampt/PBEF fue reconocida como una citoquina liberada por el tejido adiposo y se le dio el nombre de visfatina. La fuente principal de la visfatina son los macrófagos infiltrados en el tejido adiposo visceral, en respuesta a un proceso inflamatorio (Revollo J. et al., 2007, Fukuhara A. et al., 2005).

La visfatina extracelular ha sido identificada como una adipocitoquina preferentemente liberada por la grasa visceral (Fukuhara A. et al., 2005). Mientras que los niveles circulantes de visfatina han sido reportados en pacientes afectados por trastornos metabólicos, como la diabetes mellitus, la obesidad o el síndrome metabólico (Chen M. P. et al., 2006, Filippatos T. D. et al., 2007), la relevancia fisiopatológica de la visfatina sigue siendo poco conocida. El aumento de los niveles circulantes de visfatina se ha asociado con el aumento de los niveles plasmáticos de marcadores inflamatorios (Chen M. P. et al., 2006), con el daño vascular y la disfunción endotelial

(Takebayashi K. et al., 2007, Yilmaz M. I. et al., 2009) (Figura 7). Lee W.J. et al. (2009), demostraron que la visfatina extracelular estimula la síntesis de varias citoquinas pro-inflamatorias en las células endoteliales humanas a través de la activación de NF- κ B. Recientemente se demostró la existencia de una correlación entre los niveles circulantes de visfatina y la lesión hepática. En este sentido, los niveles circulantes de visfatina se han considerado como factores pronóstico de una inflamación hepática portal en los pacientes con hepatopatía grasa no alcohólica (Aller R. et al., 2009).

Varios años después de su descubrimiento, se demostró que la visfatina tenía a nivel intracelular una función enzimática responsable de catalizar el paso limitante en la biosíntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), al participar en la conversión de nicotinamida a nicotinamida mononucleótido (NMN). El NAD es una coenzima que juega un papel clave en las vías energéticas celulares y en las reacciones de oxido-reducción. Estudios recientes han demostrado que NAD está implicado en procesos tan diversos como reacciones inmunológicas, procesos inflamatorios, funciones biológicas y en el desarrollo del cáncer. La visfatina interviene en la regulación del metabolismo energético celular al poder regular los niveles celulares de NAD (Rongvaux A. et al., 2002).

10.3.1 EL PAPEL DE LA VISFATINA EN LA LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

La visfatina ha sido capaz de activar la iNOS en cultivo de células musculares lisas de la aorta humana. La inducción de iNOS fue paralela a la activación de NF- κ B, y de quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2) (Romacho T. et al., 2009). Se desconocen los mecanismos por los cuales la visfatina puede ejercer sus efectos. La inhibición enzimática de la visfatina con APO866 en células inflamatorias peritoneales de ratón y en células dendríticas y monocitos humanos redujo el contenido de NAD intracelular y la síntesis de citoquinas inflamatorias (Busso N. et al., 2008). Los citados estudios señalan que la visfatina está implicada tanto en el metabolismo del NAD como en la respuesta inflamatoria. Otros estudios han propuesto que los efectos de la visfatina en monocitos y la activación de las células endoteliales pueden estar mediados por un receptor aún no identificado. Las controversias acerca del papel de la visfatina quedan evidenciadas por estudios que indican que niveles elevados de visfatina en obesidad tienen efectos hepatoprotectores (Jarrar M. H. et al., 2008), o incluso no se encuentran asociados con la inflamación (Gonzalez-Gay M. A. et al., 2010).

La hipoxia, mediada por HIF1 α , aumenta la expresión de visfatina en adipocitos y en células tumorales (Bae S. K. et al., 2006, Segawa K. et al., 2006). Montecucco et al. (2013), demostraron que la inhibición de la visfatina con APO866, reduce la lesión, la infiltración de neutrófilos, y la generación de RLO en ratones sometidos a I/R cardíaca. La visfatina está implicada en la reacción inflamatoria en isquemia cerebral (Yin C. G. et al., 2013) y en el trasplante renal (Yilmaz M.I. et al., 2009) (Figura 7). El tratamiento con FK866, un inhibidor de la visfatina, inhibió la producción de citoquinas pro-inflamatorias, la activación de NF- κ B, y mejoró la supervivencia en modelos experimentales de I/R intestinal (Matsuda A. et al., 2014) (Figura 7). No existen estudios en la literatura sobre el papel de la visfatina en la lesión inducida por la I/R hepática.

10.3.2 EL PAPEL DE LA VISFATINA EN LA REGENERACIÓN

Se han descrito diferentes efectos de la visfatina en relación a la regeneración en función del tipo celular. La visfatina aumenta la proliferación celular y la diferenciación de las células B (Rongvaux A. et al., 2002). Por otro lado, también se ha descrito el papel inhibitorio de la visfatina en tejidos periodontales (Nokhbehshaim M. et al., 2013). No existen datos en la literatura sobre el efecto de la visfatina en regeneración hepática en condiciones de PH bajo oclusión vascular.

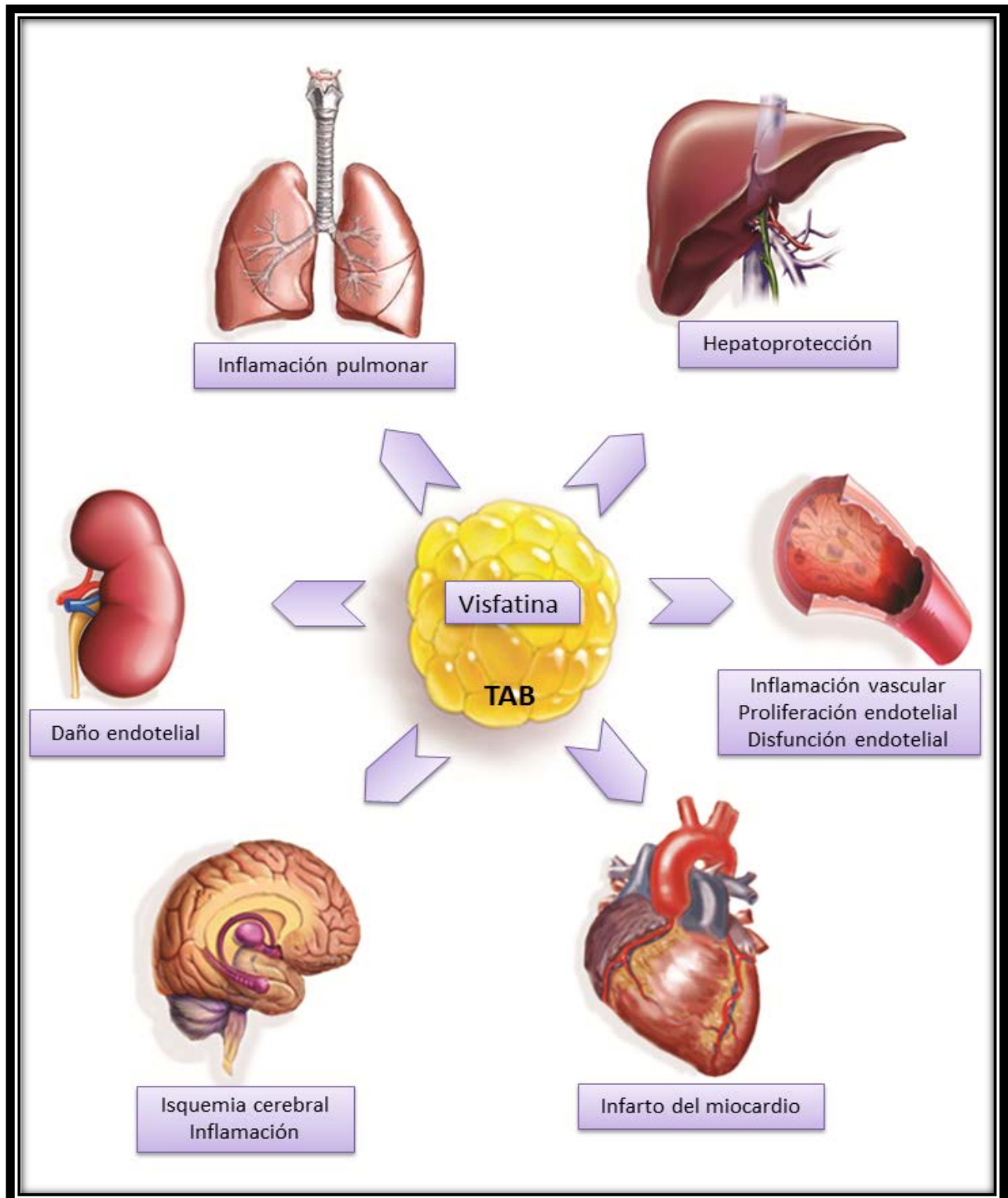


Figura 7. Representación esquemática de la naturaleza pleiotrópica de la visfatina. TAB: tejido adiposo blanco.

10.3.3 EL PAPEL DE LA VISFATINA EN LA HOMEOSTASIS DE LOS LÍPIDOS

Tal y como se ha mencionado anteriormente, las acciones de la visfatina pueden explicarse por su actividad en la biosíntesis del NAD. Este cofactor interviene en el metabolismo lipídico (metabolismo catabólico y oxidación de los ácidos grasos y síntesis de los ácidos grasos) y en el estado redox mitocondrial (Figura 8). La asociación de la visfatina con TG, colesterol, enzimas hepáticas y los marcadores pro-inflamatorios sugieren una implicación de tal adipocitoquina en la dislipidemia, en la enfermedad del hígado graso y en la inflamación crónica asociada a la obesidad (Catalán V. et al., 2011). Estudios recientes en humanos han demostrado que la visfatina puede estar conectada con el metabolismo lipídico a través de la biosíntesis del NAD dada su actividad enzimática. Se ha demostrado que el ácido nicotínico aumenta el colesterol-HDL y también reduce las lipoproteínas ricas en triglicéridos (LDL) en humanos con enfermedades coronarias (Chapman M.J. et al., 2004). El metabolismo del NAD está relacionado con la lipogénesis (Bowlby S.C. et al., 2012) y se sabe que el aumento de visfatina es capaz de estimular la expresión de la FAS en los adipocitos diferenciados (Yang C.C. et al., 2010). Bowlby S. C. et al. (2012) sugirieron que el bloqueo de la visfatina podría servir como una nueva estrategia terapéutica para inhibir la síntesis de ácidos grasos e inducir la muerte de las células tumorales. Tao R. et al. (2011) señalaron que la visfatina puede jugar un papel crítico en el metabolismo hepático de los lípidos. Esta hipótesis se apoya en los datos que muestran que la sobre-expresión de la visfatina reduce la lipogénesis y aumenta la oxidación de ácidos grasos en hepatocitos primarios. Por lo tanto, se requiere el mantenimiento de la concentración de NAD para que ocurra la oxidación mitocondrial de ácidos grasos (Hwang J.H. et al., 2009, Puigserver P. et al., 2003). El aumento transitorio del nivel de NAD acompañado de la disminución de los niveles de nicotidamina adenina dinucleótido reducido (NADH) en el citosol, provoca la fosforilación oxidativa mitocondrial y a largo plazo, la inducción del aumento de la relación NAD/NADH (Hwang J.H. et al., 2009). Se ha demostrado que el aumento de la expresión de la visfatina induce inflamación en el tejido adiposo, lo cual estimula la lipólisis, la liberación de ácidos grasos a la circulación y su posterior recaptación por el hígado (Chang Y.C. et al., 2010)

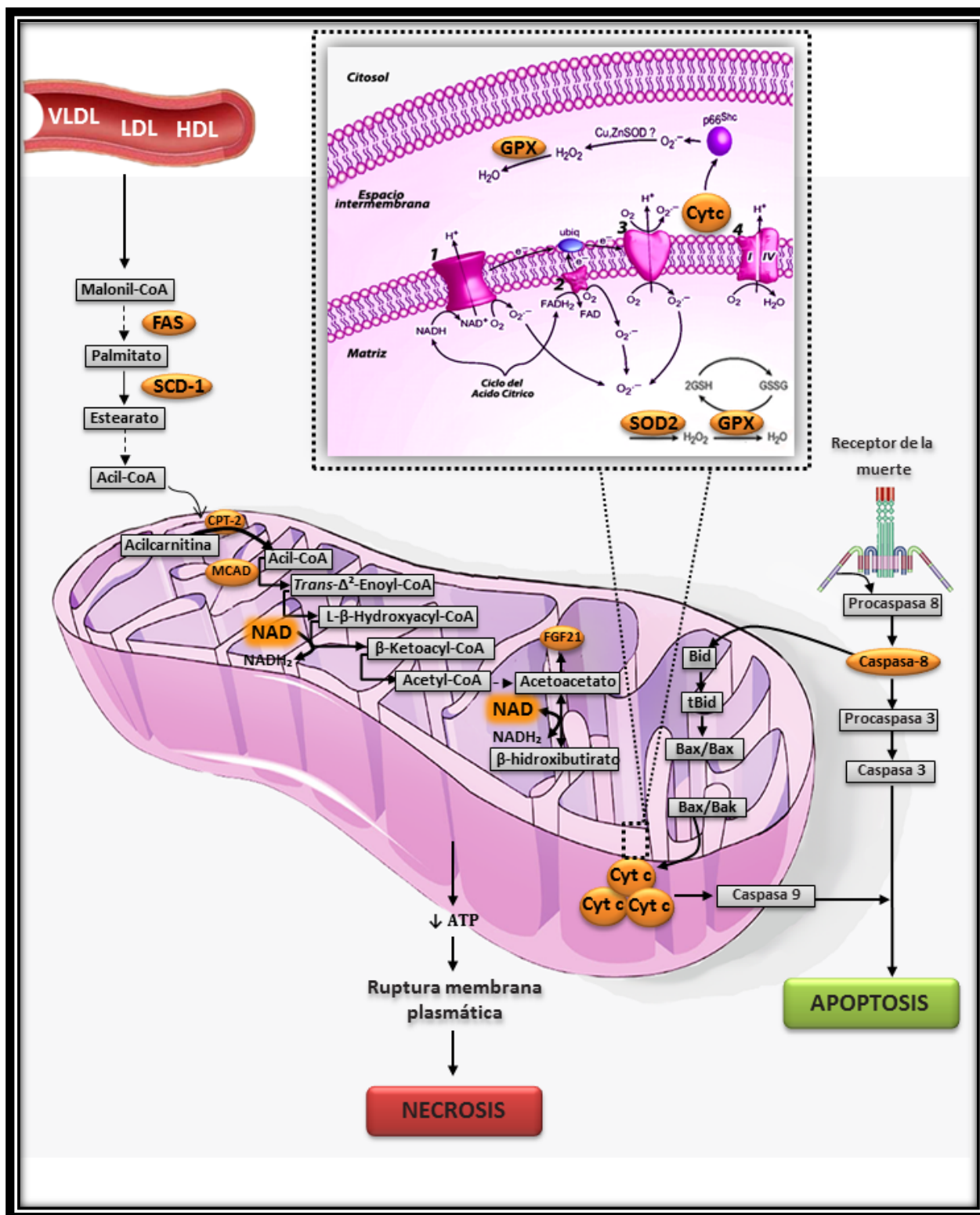


Figura 8. Participación del NAD en las diferentes vías del metabolismo lipídico. CPT2, MCAD y FgF21 (reguladores claves del metabolismo catabólico y oxidación de los ácidos grasos mitocondriales); SCD1 y el FAS (reguladores claves de la síntesis de ácidos grasos). COX1, COX4, GPX1 y SOD2 (función mitocondrial y estado redox). VLDL: lipoproteína de muy baja densidad, LDL: lipoproteínas de alta densidad, HDL: lipoproteínas de alta densidad, FAS: sintasa de ácidos grasos, SCD-1: esteroil CoA

desaturasa 1, CPT-2: carnitina palmitoiltransferasa-2, MCAD: acil-CoA deshidrogenasa de cadena media, NAD: nicotinamida adenina dinucleótido, NADH₂: Nicotidamina adenina dinucleótido reducido, FGF21: factor de crecimiento de fibroblastos 21, Cyt c: citocromo c, GPX: glutatión peroxidasa, SOD2: superóxido dismutasa 2, ATP: adenosina trifosfato, 1: complejo 1, 2: complejo 2, 3: complejo 3, 4: complejo 4.

10.3.4 EL PAPEL DE LA VISFATINA EN EL CATABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS

La principal vía para la formación de amonio (NH₄⁺) es a través del catabolismo de los aminoácidos (Figura 9), por lo general en el hígado. La mayoría de los L-aminoácidos son primero transaminados para formar glutamato. El glutamato es entonces desaminado para formar NH₄⁺ y α-cetoglutarato. Éste último es catalizado por la glutamato deshidrogenasa (GDH) (Wright P.A., 1995), la cual utiliza NAD o NADP como co-factor (Stanley C.A., 2004) (Figura 9). Cambios en la tasa [NAD⁺]/[NADH] mitocondrial en hígado afecta las concentraciones de NH₄⁺ (Veech R. L. et al., 1973). El ciclo de la urea es el principal mecanismo de detoxificación del NH₄⁺, que se lleva a cabo en el hígado y su producto final es la urea, un compuesto neutro que se transporta desde la sangre hacia los riñones para excretarse a la orina (Jiménez-Pérez M. et al., 2013). El ciclo de la urea se ha considerado una importante vía para la eliminación del bicarbonato generado metabólicamente, y en la homeostasis del pH hepático (Hallemeesch M.M. et al., 2003). La hiperamonemia es la acumulación de NH₄⁺ en la sangre que resulta de un desequilibrio entre su producción y su eliminación (Jiménez-Pérez M. et al., 2013). En el hígado, la actividad elevada de GDH puede llevar a hiperamonemia (Stanley C.A., 2004). Los niveles de NH₄⁺ elevados alteran la función mitocondrial (Kosenko E. et al., 1997a), lo que puede conducir a una disminución de la síntesis de ATP y también a una mayor formación de RLO (Kosenko E. et al., 1997b).

Los principales efectos tóxicos del NH₄⁺ implican cambios en el pH celular y en la reducción de ciertos intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en particular α-cetoglutarato. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el exceso de NH₄⁺ induce la síntesis de NO, que se traduce en estrés oxidativo y daño hepático (Kosenko E. et al., 2000; Schliess F. et al., 2002). La arginina es un intermediario en el ciclo de la urea en el hígado (Luiking Y.C. et al., 2012) y está implicada en el ciclo de la urea y en la formación de NO mediante la NOS (Marletta M.A. et al., 1994, Wu G. et al., 1998) (Figura 9).

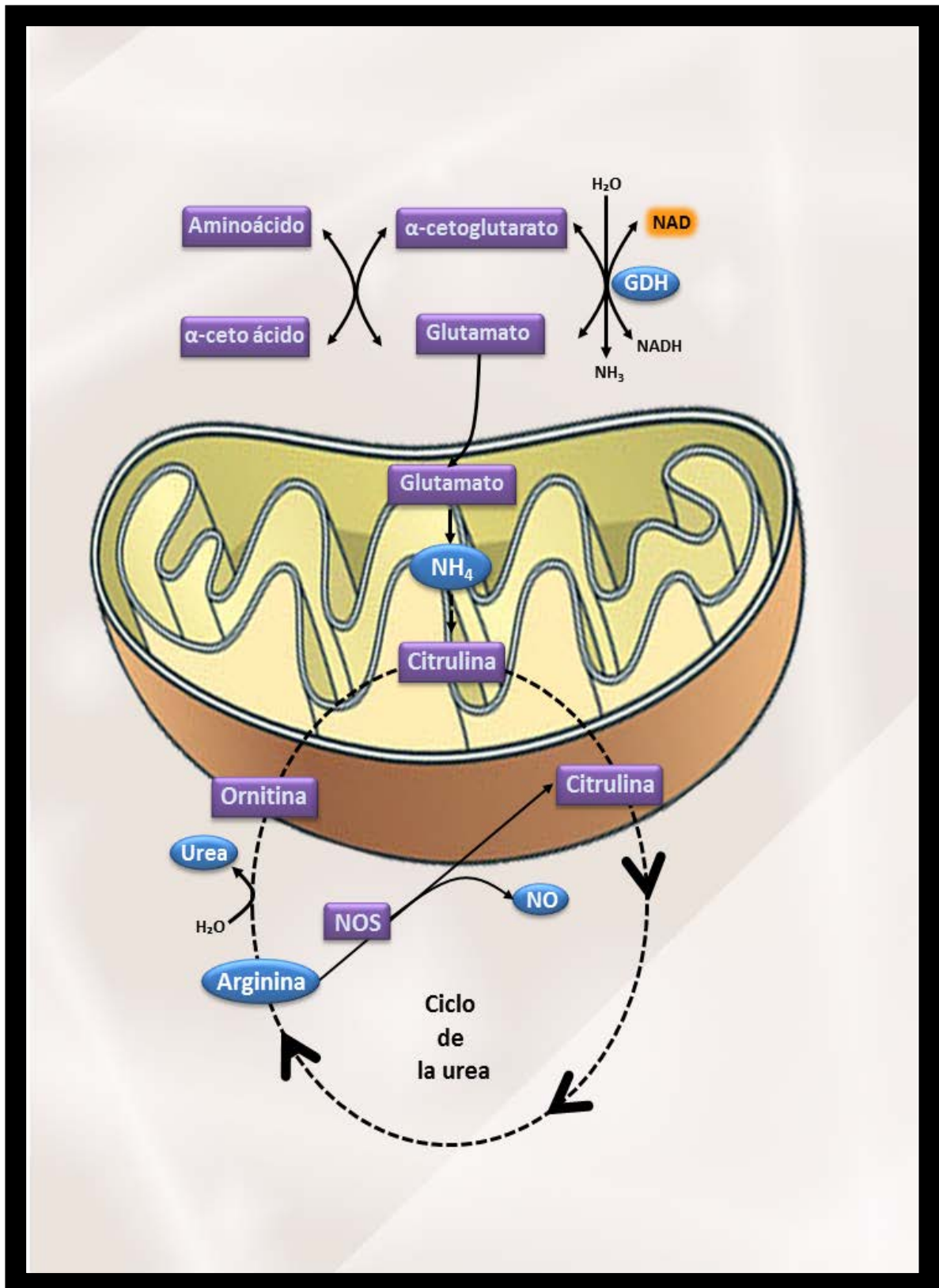


Figura 9. Efecto del NAD en el metabolismo proteico y el ciclo de urea. GDH: glutamate dehydrogenase, NH₄⁺: amonio, NOS: óxido nítrico sintetasa, NO: óxido nítrico.

11. EL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LÍPIDOS SOBRE LA LESIÓN Y LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Los lípidos pueden ser una fuente de energía para la regeneración de hígado. Se sabe que algunos pacientes que sufren enfermedades hepáticas severas muestran mala digestión y mala absorción de lípidos. En tales casos, está contraindicada la administración de lípidos por ruta enteral. Sin embargo, muchos estudios han demostrado que los lípidos son bien tolerados, incluso en pacientes cirróticos, cuando son administrados vía parenteral (Nagayama M. et al., 1989; Müller M. J. et al., 1992). La hipótesis de que los lípidos administrados por vía parenteral pueden ser un sustrato óptimo para la regeneración del hígado se ha confirmado previamente en PH sin I/R. El efecto proliferativo de los lípidos administrados parenteralmente también se ha observado en ratas tratadas con CCL4 (Holecek M. et al., 1999). No existen datos sobre los efectos de la administración de lípidos en modelos de PH con I/R (cirugía normalmente utilizada en la práctica clínica) y en presencia de esteatosis.

Los lípidos no son sólo fuente de energía. Se sabe que los ácidos grasos activan la vía del TLR4, la cual induce alteraciones en mediadores que promueven la regeneración tras la PH (Shi H. et al., 2006, Suganami T. et al., 2007, Sachithanandan N. et al., 2007, Campbell J. S. et al., 2006). A parte de influenciar la vía del TLR4, los ácidos grasos modifican la vía de los esfingolípidos. De hecho, los esfingolípidos, específicamente las ceramidas (CER) y la esfingosina-1 fosfato (S1P) juegan un papel importante en la muerte celular y en la proliferación. La hidrólisis de la esfingomielina mediante enzimas como la esfingomielinasas (SMases) libera la ceramida (CER) (Zabielski P. et al., 2010) (Figura 10). Las CERs inhiben el crecimiento celular e inducen la apoptosis en diversos tipos celulares (Zabielski P. et al., 2008). Una posterior degradación de la CER por ceramidasa (CDases) libera la esfingosina, que puede ser fosforilada por la enzima esfingosina quinasa (SPHK) para producir la S1P. La esfingosina y la S1P influyen en la homeostasis de calcio intracelular y regulan la proliferación de los hepatocitos (Zabielski P. et al., 2008).

En un modelo de PH sin I/R, la PH estimula la vía de los esfingolípidos en el hígado de rata y aumenta la producción de los esfingolípidos pro-mitóticos, como la S1P. La CER puede desencadenar la muerte de los hepatocitos a través de la activación de la caspasa-3, la alteración de la función mitocondrial y la estimulación de la producción de RLO. La CER induce un aumento en el contenido de RLO y la liberación de citocromo C de la mitocondria y desencadena la muerte celular programada (Zabielski P. et al., 2008). Zabielski P. et al. (2008) ha demostrado que dietas ricas en grasas y ácidos grasos insaturados regulan la vía de los esfingolípidos. La síntesis de S1P

inducida por una dieta rica en ácidos grasos reduce la lesión y aumenta la regeneración hepática (Zabielski P et al., 2010). Las CERs, las cuales inducen lesión y fallo en la regeneración, pueden acumularse también en respuesta a una dieta rica en ácidos grasos o administración de glucosa (Véret J. et al., 2011, Blachnio-Zabielska A. et al., 2010). Índices elevados de S1P/CER disminuyen la susceptibilidad de los hepatocitos a factores pro-apoptóticos tales como los RLO o las citoquinas pro-inflamatorias, y estimula la proliferación (Zabielski P. et al., 2010). Se desconoce el efecto de la PH bajo I/R sobre la vía de los esfingolípidos en hígados esteatósicos y no esteatósicos.

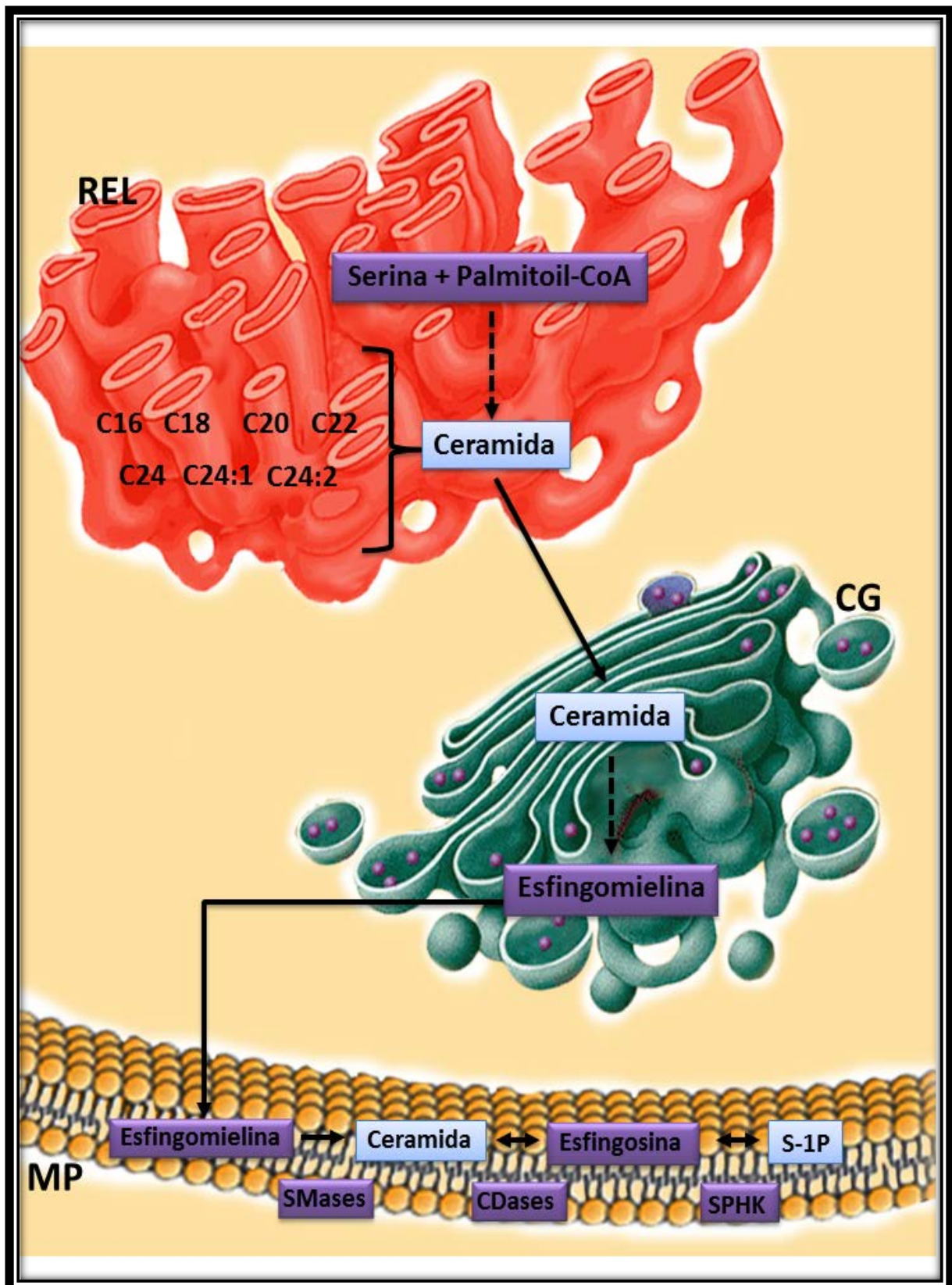


Figura 10. Síntesis y transporte de los esfingolípidos en la célula. REL: retículo endoplasmático liso, CG: aparato de Golgi, SMases: esfingomielinasas, CDases: ceramidasa, SPHK: esfingosina quinasa, MP: Membrana plasmática, S-1-P: esfingosina-1-fosfato.

12. EL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE GLUCOSA EN LA LESIÓN Y REGENERACIÓN HEPÁTICA

El glucógeno es esencial para mantener la integridad y la función hepatocelular ya que suministra glucosa para la generación de ATP (Klover P.J., Mooney R.A., 2004, Caraceni P. et al., 1999). Se sabe que la glucólisis anaeróbica hepatocelular es la fuente primordial de ATP, gracias a la cual se mantiene la integridad y la función hepatocelular durante la isquemia hepática. Por tal motivo, la falta de ATP hepatocelular es un determinante fundamental en la patogénesis de daño por isquemia hepática. Una vez agotada la glucosa hepatocelular, los niveles de ATP disminuyen rápidamente, desencadenando edema y necrosis hepatocelular (Tang L. et al., 2007). Selzner M. et al. (2007) demostró que los hígados añosos (procedentes de animales con edad avanzada) son más vulnerables a las disfunciones mitocondriales y alteraciones en el metabolismo energético asociadas a la I/R. Se ha observado que la administración de glucosa protege frente a tales disfunciones. Resultados similares se obtuvieron en humanos, tras la administración de una alta concentración de glucosa 24 horas antes de la intervención quirúrgica (Tang L. et al., 2007).

La glucosa se utiliza a menudo como una fuente de energía para los pacientes con trastorno hepático grave, aunque se desconoce la efectividad de la glucosa como fuente de energía después de un daño hepático severo (Chanda S. et al., 1995). En el año 1972, Weinbren K. y Dowling F. demostraron que la administración de glucosa aumenta la mitosis después de la intervención quirúrgica en un modelo de PH del 82%. Caruana J.A. et al. (1986) indicaron que la ingesta de glucosa aumentó la supervivencia y la regeneración después de una PH del 90%. Sin embargo, los efectos beneficiosos de la glucosa no se observaron en un modelo de PH del 70%, ya que inhibió la regeneración hepática (Chanda S. et al., 1995). Estudios recientes mostraron que la glucosa disminuye la tasa de síntesis de DNA durante la fase S del ciclo celular y disminuye la mitosis en ratas con PH (Zabielski P. et al., 2010). La inhibición de la regeneración inducida por la glucosa se ha explicado por un aumento en la expresión de factores que reducen la mitosis (C/EBP α , p21, and p27) y una reducción en la expresión de factores inductores de mitosis (FoxM1) (Weymann A. et al., 2009). También se sabe que la glucosa puede evitar la β -oxidación de los ácidos grasos (Nolan C.J. et al., 2006) (Holecsek M., Simek J., 1988) e influenciar negativamente en la movilización de ácidos grasos libre del tejido adiposo (Baker N. et al., 1968) (Figura 11).

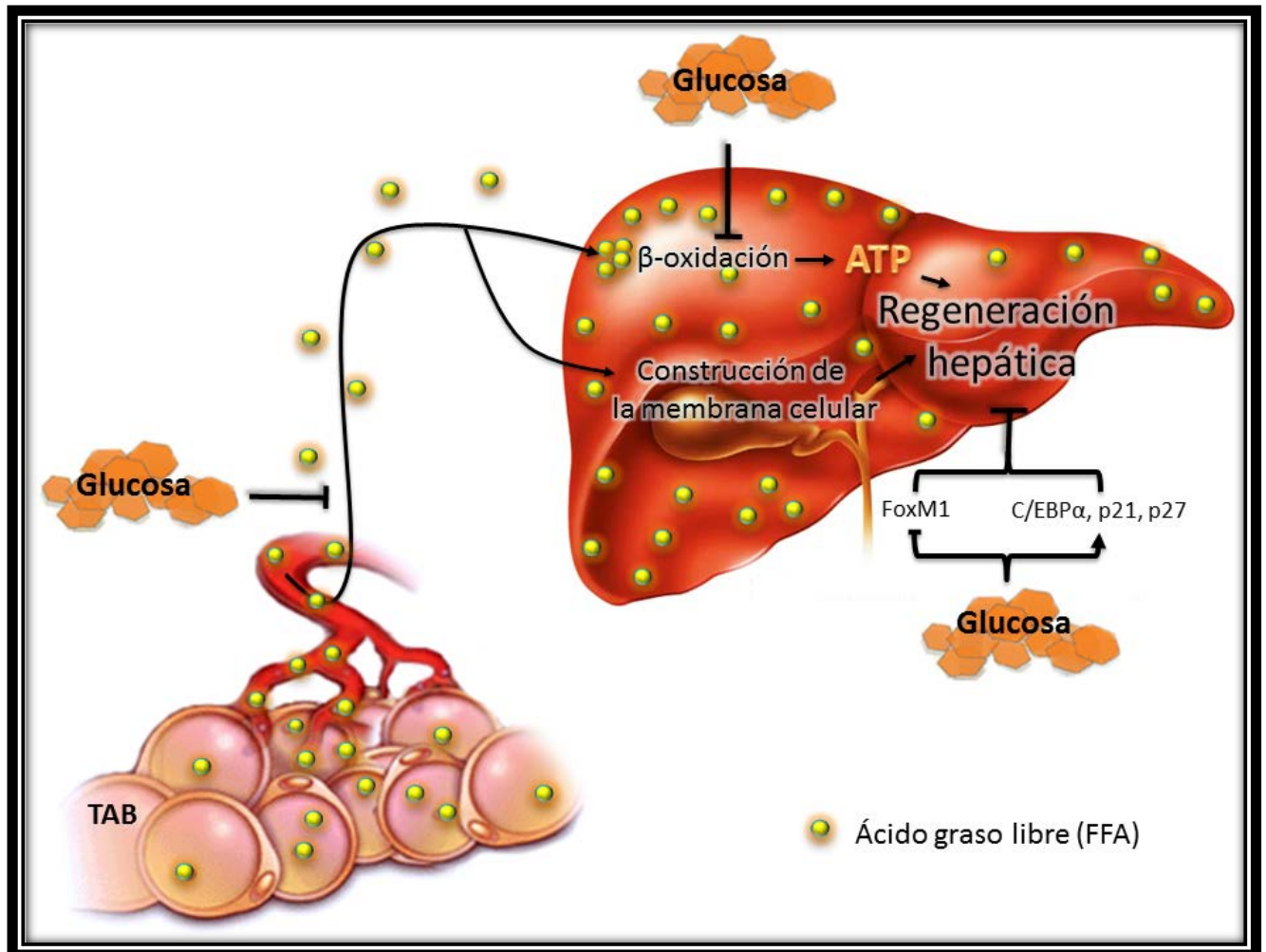


Figura 11. Efecto de glucosa sobre la regeneración hepática. TAB: tejido adiposo blanco, ATP: trifosfato de adenosina

OBJETIVOS

La esteatosis hepática es un factor de riesgo en PH bajo I/R, situación quirúrgica normalmente aplicada 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 efecto de una suplementación lipídica o glucídica sobre la lesión y fallo en la regeneración de hígados esteatósicos y no esteatósicos sometidos a PH bajo I/R.
- Evaluar el efecto de la administración de los lípidos y de la glucosa sobre el contenido de ATP hepático y la relevancia de tejido adiposo sistémico como fuente de energía para la regeneración de ambos tipos de hígados sometidos a cirugía.
- Analizar los niveles de S1P y CER en hígados sometidos a PH bajo I/R y tratados con lípidos o glucosa. Se evaluará además la posible implicación de la vía TLR4 en los efectos de la suplementación lipídica en la lesión y regeneración hepática.

ESTUDIO 2.

- Determinar la generación de resistina y de visfatina en hígados esteatósicos y no esteatósicos sometidos a PH bajo I/R.
- Investigar el papel del tejido adiposo como fuente de tales adipocitoquinas en condiciones de PH bajo I/R.
- Investigar si la modulación de la resistina y/o de la visfatina podría proteger los hígados esteatósicos y no esteatósicos frente a la lesión y fallo en la regeneración tras la cirugía hepática.

MATERIALES y MÉTODOS

1. Modelo experimental de hepatectomía parcial con oclusión vascular

1.1 Animales experimentación

En los estudios de esta tesis se utilizaron ratas macho de la cepa Zucker (Iffa-Credo, L'Abresle, France) mantenidas en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, como mínimo durante una semana antes de llevar a cabo la intervención quirúrgica. Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes, temperatura 21-22°C, humedad relativa del 70% y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con las normas regulatorias de la Unión Europea para modelos de experimentación animal (Directiva 86/609/ECC).

Para los diversos experimentos se utilizaron ratas Zucker macho homocigotas (Ob) (400-450 g) y heterocigotas (Ln) (350-400 g). Los animales se alimentaron ad-libitum con una dieta con 12% de grasa, un 28% de proteínas y un 60% de hidratos de carbono (5001 rodent diet; PMI Inc., Brentwood, MO, USA). Las ratas Zucker presentan dos fenotipos diferentes: las ratas Zucker homocigotas fa/fa de fenotipo obeso (Ob), carecen de receptores cerebrales de leptina y desarrollan obesidad a las 8 semanas de edad debido al aumento de la ingestión de comida y a la disminución del gasto energético; y las ratas Zucker heterocigotas fa/-, que tienen receptores cerebrales de leptina y mantienen un fenotipo delgado a lo largo de toda la vida (Ln) (Bray G.A., 1977). También se utilizaron ratas macho Wistar (200-220 g) que fueron alimentadas con dieta deficiente en colina por 10 días (Vendemiale G. et al., 2001). Con respecto al modelo de esteatosis inducida por dieta deficiente en colina, el tipo de dieta fue la siguiente: 90 g/kg harina de cacahuete sin alcohol, 80 g/kg proteína de soja (baja en colina), 2 g/kg L-Cisteína, 10 g/kg fibra de celulosa, 100 g/kg almidón de maíz, 100 g/kg dextrina, 413 g/kg sacarosa, 10 g/kg caseína libre de vitamina, 35 g/kg sales, 100 g/kg primex (aceite vegetal hidrogenado), 10 g/kg mezcla de vitamina y 50 g/kg aceite de maíz.

Los animales Ob Zucker y Ob Wistar presentaron infiltración de grasa macro y microvesicular (esteatosis 60 – 70%) en los hepatocitos. Por el contrario, los animales Ln no mostraron evidencias de esteatosis.

1.2 Anestesia

La cirugía se realizó bajo anestesia inhalatoria (Fluorane Abbot Laboratories, Madrid). La inducción se hizo con isoflurano al 4% y con un flujo de oxígeno de 2,5 a 3 l/min. El mantenimiento de la anestesia en los animales consistió en la inhalación de isoflurano al 1,5 – 2% y flujo de oxígeno de 1-1,5 l/min.

1.3 Procedimiento quirúrgico

La hepatectomía parcial (PH) del 70% bajo oclusión vascular de 60 minutos se realizó en base al modelo descrito por Selzner M. et al. (1999).

Una vez inducida la anestesia en la rata, se rasuró el abdomen, se colocó en posición decúbito supino sobre la mesa de operación y se inmovilizó. Previo lavado del abdomen con povidona iodada, 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 las vísceras para mejorar la visibilidad (Figura 12A).

Primeramente se pinzó el lóbulo derecho – triangular con una Statinsky para facilitar el aislamiento de la tríada portal (Figura 12B). A continuación, se puso un clamp microvascular durante 60 minutos en la ramificación portal que abastece el lóbulo medio (30%) e izquierdo. La congestión intestinal se evitó durante el período de isquemia con la preservación del flujo portal en los lóbulos caudados y derecho. El lóbulo izquierdo se ligó con seda 2/0 y se reseccionó. Seguidamente se ligó con seda 4/0 el lóbulo derecho triangular y se reseccionó (Figura 12C).

Transcurridos 60 minutos de isquemia, se ligaron los lóbulos caudados y derecho con seda 2/0 y se extirparon, permaneciendo sólo el lóbulo medio, que representa un 30% del hígado total. La reperusión del lóbulo medio se inició tras la liberación del clamp vascular. Para finalizar la intervención se cerró el animal con sutura continua de la capa muscular y la piel con seda 2/0.

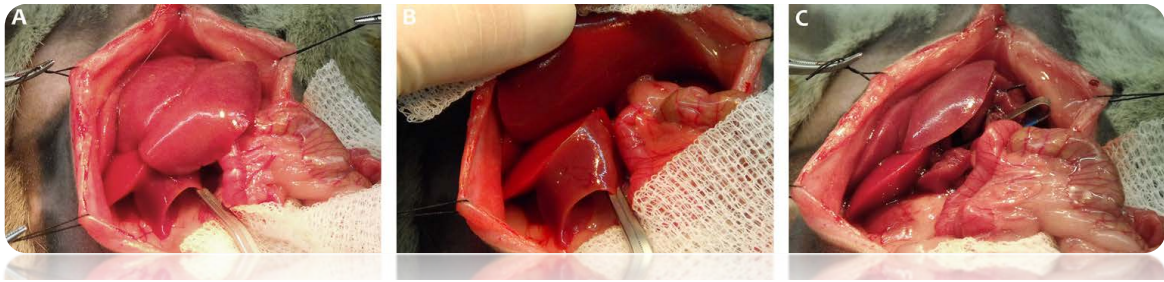


Figura 12: Hepatectomía parcial con oclusión vascular. A) Lóbulos hepáticos; B) Lóbulo triangular clampado; C) Oclusión vascular y extirpación de los lóbulos izquierdo y triangular.

2. Diseño experimental

2.1 Diseño experimental del primero estudio (Figura 13)

Protocolo 1: Efectos de la administración de glucosa y lípidos sobre el daño hepático y la regeneración en hígados estatósicos y no esteatósicos a las 12, 24 y 48 h después de la realización del procedimiento quirúrgico tanto en modelos experimentales de obesidad genética como nutricional.

Los animales Ob y Ln se sometieron a PH bajo oclusión vascular y recibieron cantidades isoenergéticas de lípidos y glucosa por vía intravenosa. Los grupos que se realizaron son los siguientes:

- 1) Sham: los animales se sometieron a anestesia, incisión en la línea media umbilical y disección de los vasos del hilio hepático.
- 2) Hepatectomía parcial + isquemia (PH+I/R): 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).
- 3) PH+I/R + Glucosa: igual que el grupo 2, pero con la administración intravenosa de 5 ml de solución de glucosa (28%, energía corresponde a 4,6 MJ/1000 ml, Sigma Aldrich, España) administrada inmediatamente después de la cirugía, durante 4 horas (Holecek M., Simek J., 1988).
- 4) PH+I/R + Lípidos: igual que el grupo 2, pero con la administración de 5 ml de solución lipídica (10% Intralipid: 4,6 MJ/1000 ml, Fresenius Kabi, España) inmediatamente después de la cirugía durante 4 horas (Holecek M., Simek J., 1988). La emulsión se compone de 52% de ácido linoleico, 22% ácido oleico, 13% ácido palmítico, 8% ácido linolénico y 4% ácido

- 5) esteárico, 1% de otros ácidos grasos, 8,184 g/l de fosfolípidos de huevo y 15 g/l glicerina (Holecek M., Simek J., 1988, Goetze O. et al., 2007, Eldor J., Kotlovker V., 2012).

La lesión hepática (transaminasas y necrosis hepática) y la regeneración hepática (índice mitótico, porcentaje de hepatocitos Bromodesoxiuridina (BrdU)-positivos y Ki-67 positivos, HGF, TGF- β , nivel de ciclina E y ciclina A) se determinaron a las 12, 24 y 48 horas después de la cirugía hepática. Para el estudio de supervivencia, las ratas Ln y Ob se sometieron a intervenciones similares a las descritas en los grupos 2-4 (protocolo 1). Se monitorizó la durante 14 días tras la cirugía hepática (Jiménez-Castro M.B et al., 2012).

Protocolo 2: Mecanismos de protección de la glucosa y de los lípidos en los hígados esteatósicos y no esteatósicos a las 24 horas después de realizar la PH bajo la oclusión vascular.

Los efectos de la glucosa y de los lípidos exógenos sobre el ATP y la vía del TLR-4 (MyD88 y TRIF) y la señalización inflamatoria (TNF- α , IL-1 β , MCP-1, NF- κ B y IL-6) se analizaron en los grupos correspondientes al protocolo 1 a las 24 horas después de la cirugía hepática. Se determinaron además los esfingolípidos (S1P y CER), TG, lipoproteínas de alta densidad (LDL), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), ácidos grasos libres (FFA), colesterol total y fosfolípidos.

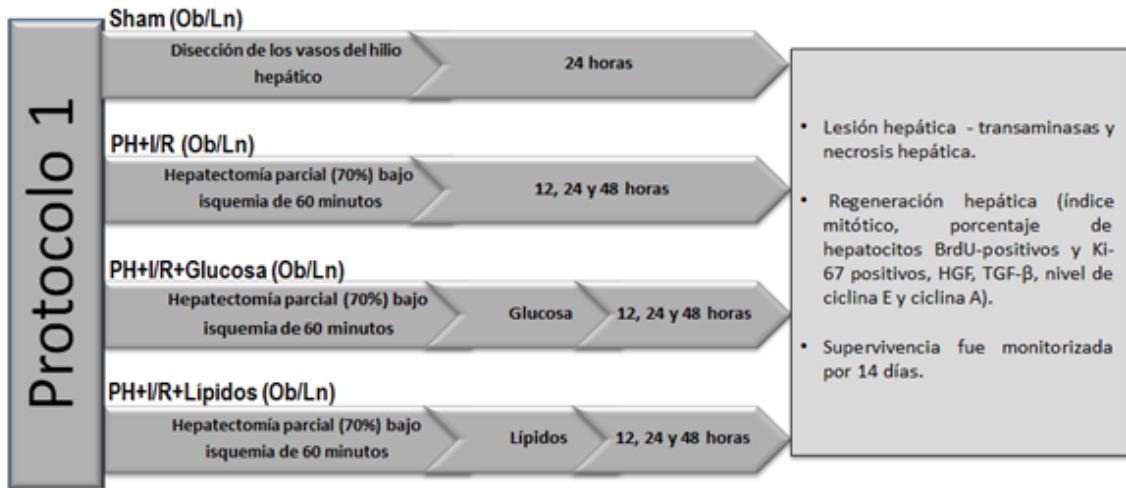
Protocolo 3: Papel del tejido adiposo en la regeneración de los hígados esteatósicos y no-esteatósicos a las 24 horas después de la cirugía hepática.

- 6) Sham + lipectomía del tejido adiposo blanco (Sham + LPT): igual que el grupo 1, pero el tejido adiposo mesentérico, perirenal y retroperitoneal y epididimal fue reseccionado y extraído (Hausman D.B et al., 2004, Shi H. et al., 2007).
- 7) PH+I/R + lipectomía del tejido adiposo (PH+I/R+LPT): 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 (Hausman D.B. et al., 2004, Shi H. et al., 2007).
- 8) PH+I/R + LPT + Glucosa: igual que el grupo 6, pero con la administración intravenosa de 5 ml de solución de glucosa (28%, energía correspondiente a 4,6 MJ/1000 ml, Sigma Aldrich, Spain) inmediatamente después de la cirugía, durante 4 horas (Holecek M., Simek J., 1988).
- 9) PH+I/R + LPT + Lípidos: igual que el grupo 6, pero con la administración de 5 ml de solución lipídica (10% Intralipid: 4,6 MJ/1000 ml, Fresenius Kabi, Spain) inmediatamente después de

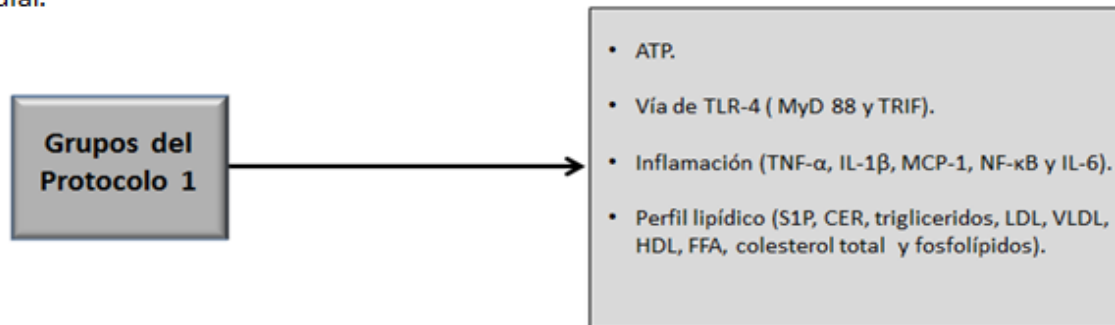
la cirugía, durante 4 horas (Holecek M., Simek J., 1988, Goetze O. et al., 2007, Eldor J., Kotlovker V., 2012).

La lesión hepática (transaminasas y necrosis hepática) y regeneración hepática (porcentaje de hepatocitos BrdU-positivos y Ki-67 positivos, HGF, TGF- β), el nivel de ATP y de adiponectina se determinaron a las 24 horas después del procedimiento quirúrgico. La dosis y el tiempo de pretratamiento de los diferentes fármacos usados se seleccionaron a partir de investigaciones previas realizadas en hígados no esteatósicos sometidos a PH sin oclusión vascular (Holecek M., Simek J., 1988, Simek J. et al., 1965) y estudios preliminares de nuestro grupo. El tipo de hígado utilizado en cada uno de los grupos experimentales de los diferentes protocolos, así como el número de animales, se especifica en los pies de figura que se encuentran incluidas en la sección de resultados.

PROTOCOLO 1 – Efectos de la administración de glucosa y lípidos sobre el daño hepático y la regeneración de los hígados esteatósicos y no esteatósicos a las 12, 24 y 48 h después de la realización del procedimiento quirúrgico en modelos experimentales de la obesidad genética o nutricional.



PROTOCOLO 2 - Mecanismos de protección de la glucosa y de los lípidos sobre los hígados esteatósicos y no esteatósicos a las 24 horas después de la hepatectomía parcial bajo oclusión vascular.



PROTOCOLO 3 – El papel del tejido adiposo en la regeneración de los hígados esteatósicos y no esteatósicos a las 24 horas después de la cirugía hepática.

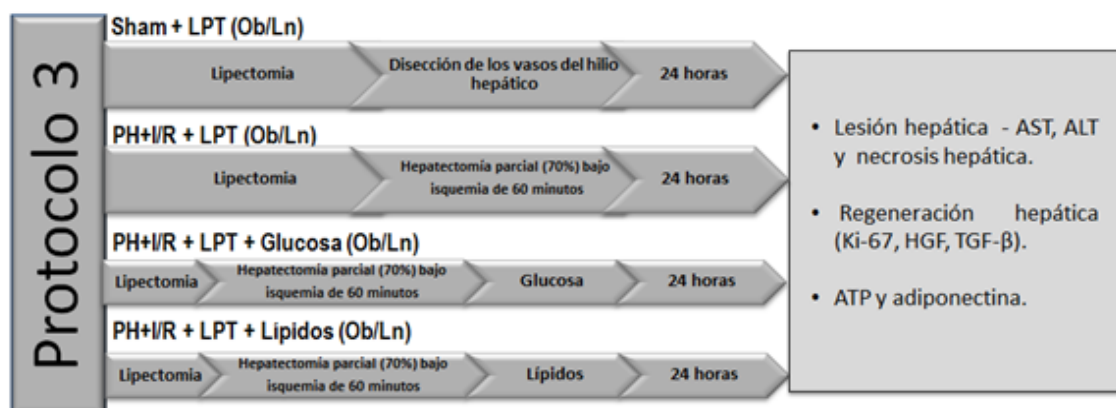


Figura 13. Intervenciones y determinaciones del estudio 1.

2.2 Diseño experimental del segundo estudio (Figura 14)

Protocolo 1: La resistina y la visfatina en el hígado esteatósico y no esteatósico de ratas Zucker sometidas a PH+I/R.

- 1) Sham: los animales se sometieron a anestesia, incisión en la línea media umbilical y disección de los vasos del hilio hepático.
- 2) PH+I/R: los animales se sometieron a PH del 70% bajo oclusión vascular (isquemia) de 60 minutos, siguiendo la técnica de Selzner M, et al., 1999.
- 3) PH+I/R + anti-resistina: igual que el grupo 2, pero con la administración intravenosa de un anticuerpo anti-resistina (1mg/Kg, Merck Millipore, USA) 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico (Steppan C. M. et al., 2001).
- 4) PH+I/R + anti-visfatina: igual que el grupo 2, pero con la administración intravenosa del anticuerpo anti-visfatina (500 µg/Kg, Adipogen inc., Korea) 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico (Hong S. B. et al., 2008).
- 5) PH+I/R + anti-resistina + anti-visfatina: igual que el grupo 2, pero con la administración intravenosa de los anticuerpos anti-resistina (Steppan C. M. et al., 2001) y anti-visfatina (Hong S. B. et al., 2008).
- 6) PH+I/R + resistina: igual que el grupo 2, pero con la administración intravenosa de resistina recombinante (100 µg/Kg, PeproTech Inc., USA) 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico (Li Y. et al., 2007).
- 7) PH+I/R + visfatina: igual que el grupo 2, pero con la administración intravenosa de visfatina recombinante (50 µg/Kg, Enzo LifeScience, Switzerland) 10 minutos antes del procedimiento quirúrgico (Park B.S. et al., 2011).
- 8) PH+I/R + lipectomía del tejido adiposo (PH+I/R+LPT): igual que el grupo 2, pero se eliminó el tejido adiposo mesentérico, perirenal, retroperitoneal y epididimal (Hausman D. B. et al., 2004) antes de iniciar la PH+I/R.
- 9) PH+I/R + LPT + anti-resistina: igual que el grupo 8, pero con la administración intravenosa del anticuerpo anti-resistina (Steppan C. M. et al., 2001).
- 10) Sham + anti-resistina: igual que el grupo 1, pero con la administración intravenosa del anticuerpo anti-resistina (Steppan C. M. et al., 2001).
- 11) Sham + anti-visfatina: igual que el grupo 1, pero con la administración intravenosa del anticuerpo anti-visfatina (Hong S. B. et al., 2008).

Protocolo 2: Efecto de la modulación farmacológica de la resistina y de la visfatina en hígados esteatósicos de ratas Zucker sometidas a PH o I/R.

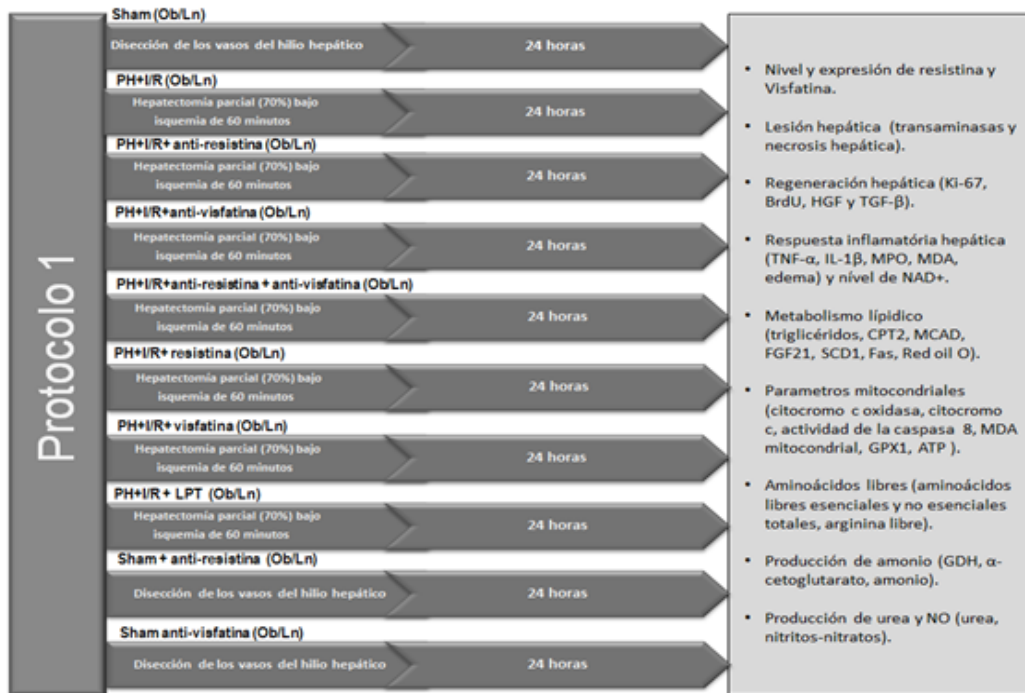
- 12) PH: animales sometidos a hepatectomía parcial (70%).
- 13) I/R: animales sometidos a isquemia de 60 minutos.
- 14) PH + anti-resistina: igual que el grupo 12, pero con administración intravenosa del anticuerpo anti-resistina (Steppan C. M. et al., 2001).
- 15) I/R + anti-resistina: igual que el grupo 13, pero con administración intravenosa del anticuerpo anti-resistina (Steppan C. M. et al., 2001).
- 16) PH + anti-visfatina: igual que el grupo 12, pero con administración intravenosa del anticuerpo anti-visfatina (Hong S. B. et al., 2008).
- 17) IR + anti-visfatina: igual que el grupo 13, pero con administración intravenosa del anticuerpo anti-visfatina (Hong S. B. et al., 2008).

Protocolo 3: Producción de resistina y visfatina en hígados esteatósicos y no esteatósicos de ratas Wistar sometidas a PH+I/R.

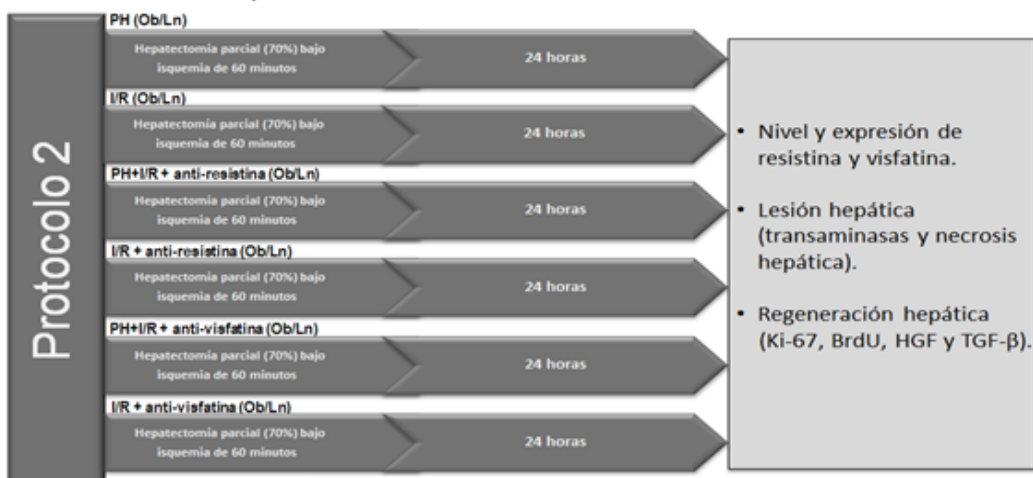
- 18) Sham: los animales se sometieron a anestesia, incisión en la línea media umbilical y disección de los vasos del hilio hepático.
- 19) PH+I/R: inicialmente los animales se alimentaron con una dieta deficiente en colina durante 10 días (Vendemiale G. et al., 2001) para inducir la obesidad nutricional experimental. Posteriormente se sometieron a PH + I/R, siguiendo la técnica Selzner M. et al. (1999).

Las muestras de plasma, hígado y tejido adiposo se recogieron a las 24 horas tras la reperusión. Para medir la tasa de síntesis de DNA, se administró BrdU (50 mg/kg, i.p.) 1 hora antes del sacrificio y se procesó la incorporación de BrdU (Saile B. et al., 2004; Elias-Miró M. et al., 2012c). Para evaluar la respuesta inflamatoria, los animales se sometieron a intervenciones quirúrgicas similares a las descritas en los grupos 2-7, pero las muestras hepáticas se obtuvieron a las 6 y 12 horas después de la finalización de la cirugía hepática.

PROTOCOLO 1 – La resistina y la visfatina en el hígado esteatósico y no esteatósico de ratas Zucker sometidas a hepatectomía parcial bajo oclusión vascular.



PROTOCOLO 2 – Efecto de la modulación farmacológica de la resistina y de la visfatina en hígados esteatósicos de ratas Zucker sometidas a PH o I/R.



PROTOCOLO 3 – Formación de la resistina y de la visfatina en hígados esteatósicos y no esteatósicos de ratas Wistar sometidas a la PH+I/R.



Figura 14. Intervenciones y determinaciones del estudio 2

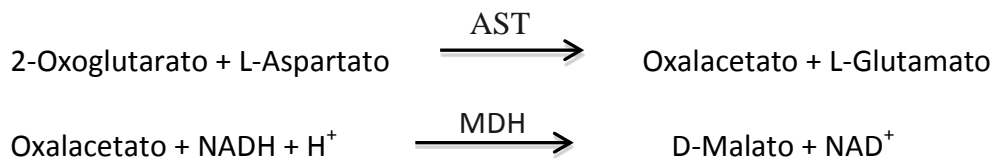
3. Determinaciones bioquímicas

3.1 Transaminasas

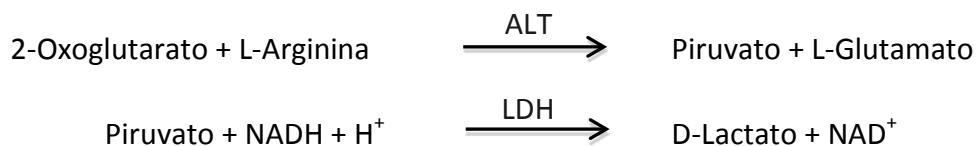
Las transaminasas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) son enzimas citoplasmáticas muy abundantes en el hígado que se encargan de realizar la conversión de un aminoácido en un ácido carboxílico y participan en el metabolismo de los aminoácidos. En condiciones normales estas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

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

Para la AST:



Para la ALT:



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

3.2 Factores de crecimiento (HGF y TGF-β)

Para las determinaciones del HGF las muestras de hígado se homogenizaron en un tampón que contenía tris (hidroximetil) aminometano-HCl 20 mM, NaCl 2M, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM, ácido etilendiaminotetraacético 1mM, ácido polixietilensorbitano mono-oleato al 0,1%. El homogenado se centrifugó a 20000g durante 1 hora y a 4°C. El sobrenadante se guardó a -80°C. En las muestras de plasma y homogenado se determinó la concentración de HGF mediante un kit de Elisa comercial distribuido por el Instituto de Inmunología de Tokio (Japón).

Para la determinación del TGF- β , las muestras de hígado se homogenizaron en tampón fosfato, pH=7.4, que contenía PMSF 2mM y pepstatina A 1mg/ml, a 4°C. Los homogenados se centrifugaron a 10000g durante 10 minutos y a 4°C. Se recogió el sobrenadante del cual se determinó la concentración de TGF- β activo. Para medir el TGF- β total (activo + latente) las muestras se acidificaron con HCl 1M y luego se neutralizaron con NaOH 1M. Se utilizó un kit comercial de ELISA (R&D systems, Minneapolis, USA).

3.3 Medidores inflamatorios

3.3.1 Interleuquina-1 (IL-1) y Interleuquina-6 (IL-6)

- IL-1: las muestras de hígado se homogenizaron en tampón fosfato 50 mM a pH 6.0, conteniendo PMSF 2 mM, antipaina 1 mg/ml, leupeptina 1mg/ml y pepstatina A 1 mg/ml. Los homogenados se centrifugaron a 100000g durante 1 hora a 15°C y los sobrenadantes se conservaron a -80°C para su posterior determinación de IL-1 β (Serafín A. et al., 2004).
- IL-6: las muestras de hígado se homogenizaron en un tampón que contenía Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, tritón-X100 y un cocktail de inhibidores de proteasas (Complete mini, Roche, Switzerland). El homogenado se centrifugó a 3000g durante 15 minutos a 4°C (Selzner N. et al., 2003b). La detección de IL-6 se realizó mediante un kit comercial de ELISA (rat IL-6 ELISA kit, Biosource, Camarillo, CA).

3.3.2 Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y Proteína quimioatrayente de monócitos – 1(MCP-1)

- TNF- α : El TNF- α libre se determinó en plasma mediante un kit de ELISA (Biosource, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- MCP-1: La homogenización de las muestras fue de acuerdo con el procedimiento técnico previamente publicado (Woo C. W. et al., 2008). La detección de MCP-1 se realizó mediante un kit comercial de ELISA (ELISA kits for MCP-1, Biosource, Camarillo, CA).

3.3.3 P65-NF- κ B

Los extractos nucleares a partir de muestras hepáticas se prepararon utilizando el kit Nuclear Extract Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Active Motif). La actividad de unión de NF-kappa B se determinó utilizando el kit TransAM NF- κ B Transcription Factor ELISA Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Active Motif) (Goto T. et al., 2006).

3.4 Adipocitoquinas

Para determinar los niveles de las adipocitoquinas tales como la adiponectina, resistina y visfatina, las muestras de tejido hepático y tejido adiposo se homogenizaron en frío en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Deoxicolato de sodio 1% y Nonidet P40 1%) conteniendo también EDTA 5mM, Na_3VO_4 1 mM, NaF 50 mM, DTT 1 mM y una tableta del cóctel de inhibidores de proteasas Complete por cada 50 ml de tampón (Roche, Basilea, Suiza). Los homogenados se incubaron 20 minutos en hielo y después se centrifugaron a 10000g durante 30 minutos a 4°C (Bhattacharya N. et al., 2005). Se recuperaron los sobrenadantes y se determinaron la adiponectina, resistina y visfatina en los mismos utilizando un kit comercial para adiponectina y resistina respectivamente (AdipoGen, Seúl, Corea; B-Bridge International, CA, USA) y otro kit comercial para visfatina (AdipoGen, Seúl, Corea). Los niveles de las adipocitoquinas también se determinaron en el plasma. A continuación se describe brevemente el protocolo general que se siguió para el ensayo inmunienzimático de la adiponectina que es extrapolable al de resistina y visfatina respectivamente.

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

3.5 ATP y caspasa-8

- ATP: Las muestras de hígado se homogenizaron en 100 μ l solución tampón (ATP Assay Buffer). Los homogenados se centrifugaron en 13000 rpm durante 2–5 minutos a 4°C. La detección de NAD⁺ se realizó mediante kit comercial [ATP Assay Kit (Colorimetric/ Fluorometric), Abcam, Cambridge, UK].
- Caspasa-8: Las muestras hepáticas se homogeneizaron en tampón de lisis (HEPES 50 mM, pH 7,4, CHAPS 5 mM, DTT 5 mM), y se centrifugaron a 10.000g durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se utilizaron para determinar la actividad de la caspasa-8 mediante un kit comercial de ELISA (caspase 8 activity assay kit, Biotium, Inc., CA, USA) (de Oliveira M. R. et al., 2009).

3.6 Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD)

Las muestras de hígado se homogenizaron en 400 μ l solución tampón (NADH/NAD⁺ Extraction Buffer). Los homogenados se centrifugaron en 14000 rpm durante 5 minutos. La detección de NAD⁺ se realizó mediante un kit comercial (NAD⁺/NADH colorimetric kit, BioVision Inc., CA, USA).

3.7 Urea

Las muestras de hígado se homogenizaron en 100 μ l solución tampón (Assay buffer). Los homogenados se centrifugaron en 15000g durante 10 minutos. La detección de GDH se realizó mediante un kit comercial (Urea Assay Kit, BioVision Inc., CA, USA).

3.8 α -Cetoglutarato

Las muestras de hígado se homogenizaron en 100 μ l solución tampón (α –CG Assay buffer). Los homogenados se centrifugaron en 15000g durante 10 minutos. La detección de GDH se realizó mediante un kit comercial (α -Ketoglutarate Colorimetric/Fluorometric Assay kit, BioVision Inc., CA, USA).

3.9 Glutamato deshidrogenasa

Las muestras de hígado se homogenizaron en 200 μ l solución tampón (Assay buffer). Los homogenados se centrifugaron en 1300g durante 10 minutos. La detección de GDH se realizó

mediante un kit comercial (Glutamate dehydrogenase activity colorimetric assay kit, BioVision Inc., CA, USA).

3.10 Amonio (NH_4^+)

Las muestras de hígado se homogenizaron en 100 μl solución tampón (Assay buffer). Los homogenados se centrifugaron en 1300g durante 10 minutos. La detección de NH_4^+ se realizó mediante un kit comercial (Ammonia Colorimetric Assay kit, BioVision Inc., CA, USA).

3.11 Nitritos y nitratos

El tejido hepático se homogenizó en tampón Tris-HCl 100 mM pH=7.4 y a 4^o C. Para desproteínizar el homogenado, 500 μl del mismo se mezclaron con 100 μl de HCl 1N. Después de una centrifugación, el sobrenadante se ajustó a pH=7.6 con 100 μl de solución NaOH 1N y 300 μl de Tris-HCl 100mM. La concentración de nitritos y nitratos se realizó mediante el uso de un kit comercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Para transformar el nitrato en nitrito se incubó durante 3 horas en presencia de NADPH y FAD. Los nitritos se determinaron con el reactivo de Griess, leyendo la absorbancia a 540 nm (Peralta C. et al., 1999, Hortelano S. et al., 1992).

3.12 Malondialdeido

El malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica y se utilizó como parámetro bioquímico indirecto de estrés oxidativo inducido por los RLO (Baykal A. et al., 1998). El MDA fue determinado en el tejido hepático y en la suspensión mitocondrial hepática:

Los niveles de MDA se determinaron en muestras de hígado mediante el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Ohkawa H. et al., 1979). En condiciones ácidas y a altas temperaturas el MDA reacciona con el TBA para dar lugar a un compuesto de color rosa, cuantificable por espectrofotometría. El MDA tisular fue determinada a través de muestras de tejido hepático congelado homogeneizadas en 2 ml de tampón Tris Base 0.1 M a pH 7 y se determinó la concentración de proteínas totales en el mismo, siguiendo el procedimiento descrito previamente en el apartado correspondiente. A 250 μl de este homogenado se le añadieron 250 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 40% para precipitar las proteínas. Se mezclaron en un agitador tipo vórtex y se centrifugaron a 3000rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se le añadió 250 μl de TBA 0.67% y se llevó a ebullición a 100°C durante 15 minutos con lo que se

desarrolló un color proporcional a la cantidad de MDA presente en las muestras (Serafín A. et al., 2004).

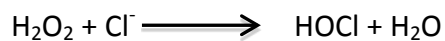
Para la elaboración de la recta patrón, se preparó un estándar de MDA disolviendo 120 μ l de 1,1,3,3-tetrahidroxipropano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en 50ml de HCl 0.1M; esta solución se calentó durante una hora a 50°C. Para la preparación de la recta de calibración se añadieron 50 μ l de esta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

Para la determinación del MDA mitocondrial, las mitocondrias fueron aisladas siguiendo protocolos estándar (Zhou M. et al., 2008) y los niveles de MDA se determinaron utilizando un kit comercial (TBARS assay kit, Cayman Química, Ann Arbor, MI).

3.13 Mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa (MPO) es un enzima que se encuentra en el interior de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos polimorfonucleares; y se utiliza como marcador de la presencia de estas células en el tejido inflamado (Colletti L.M. et al., 1990, Schmekel B. et al., 1990). En esta tesis se utilizó como parámetro de infiltración y actividad de neutrófilos en el tejido hepático.

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



El método se basa en la reacción de la tetrametilbencidina catalizada por la MPO. Es importante conseguir una buena extracción de la enzima; para ello las muestras se homogenizaron en tampón fosfato (KH_2PO_4 0,05 M, pH=6; Hexadecirtrimetilamonio de bromuro 0,5%) y posteriormente se sonicaron 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 C. et al., 2001). A 5 μ l del sobrenadante se le añadieron 10 μ l de reactivo de

tetrametilbencidina (5mg/ml disuelto en dimetilsulfóxido). A tiempo $t=0$ se añadió 70 μl de tampón fosfato (KH_2PO_4 8 mM, $\text{pH}=5.4$) con H_2O_2 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.

3.14 Citocromo c oxidase

La extracción de mitocondria se realizó de acuerdo con la técnica descrita previamente (Shaki F. et al., 2012). La citocromo c oxidase activo se evaluó utilizando un kit comercial de ELISA (cytochromo c oxidase assay kit, Sigma, MO, USA).

3.15 Analisis y extracción de lípidos.

Para llevar a cabo la extracción de lípidos totales en tejido hepático, las muestras de hígado se pesaron y se homogenizaron en una mezcla de cloroformo: metanol en una relación 2:1 respectivamente. Tras la homogenización, se añadió metanol y posteriormente se procedió a centrifugar a 3000g durante 15 minutos. Se descartó el precipitado. Posteriormente se añadió agua en proporción 1/5 del volumen del homogenado y se procedió a centrifugar a 3000g durante 15 minutos para separar las fases. La fase superior se descartó ya que es la fase no lipídica, y la fase inferior es la fase lipídica que es la que necesitamos. Para acabar de extraer, se hicieron tres lavados de la interfase con una mezcla cloroformo: metanol: agua que contiene la relación siguiente de los tres solventes 3:48:47 respectivamente, y en cada lavado se descartó la fase superior. Finalmente se añadió metanol y este extracto se hizo servir para determinar el contenido en TGs del hígado (Folch J. et al., 1957). La determinación TGs, LDL, VLDL, HDL, FFA, colesterol total y fosfolípidos se llevó a cabo siguiendo protocolo estándares (Kamisoyama H. et al., 2008, Reddy R. R. et al., 2011, Newberry E. P. et al., 2003).

3.16 Determinación de S1P y ceramidas

La extracción de S1P y CER en muestras hepáticas se realizó mediante protocolos previamente descritos (Japtok L et al., 2012, Bhabak K. P. et al., 2013). El análisis de los esfingolípidos se realizó por cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC-MS/MS). Las separaciones cromatográficas del S1P y de las diferentes CERs se llevaron a cabo, respectivamente, por la columna X-Bridge (Waters GmbH, Eschborn, Germany) y por la columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). La elución de S1P se realizó utilizando un gradiente que consiste en eluyente A (agua / ácido fórmico 100:0,1 v/v) y el

eluyente B (acetonitrilo / tetrahidrofurano / ácido fórmico 50:50:0,1 v/v). Para las CERs, se utilizó un solvente que consta de acetonitrilo/2-propanol 3:2 con 1% de ácido fórmico y una tasa de flujo de 1 ml/min durante 15 min.

3.17 Aminoácidos libres y esenciales

Las concentraciones de aminoácidos libres esenciales totales y aminoácidos no esenciales se determinó en plasma de acuerdo con el método de Trak Amino Acid Derivatization kit (Waters, MA, CA), usando carbamato de 6 aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo y cromatografía en fase líquida de alta resolución (HLPC). La cuantificación se hizo con detector de ultravioleta a 260 nm.

4. Técnica de Biología Molecular

4.1 Proteínas

Las proteínas se determinaron con el método colorimétrico de Bradford y se utilizó un reactivo comercial de BioRad (Richmon, CA, USA). Este ensayo se basa en la reacción de una solución ácida del colorante azul de Coomasie en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. La concentración de proteínas en la muestra es directamente proporcional a la absorbancia observada a una longitud de onda de 595 nm. Como recta patrón se utilizó una solución de albúmina cuyo punto más concentrado era de 4.75 mg/ml, a partir de esta concentración se realizaron 6 diluciones seriadas a la mitad.

4.2 Western Blot

Determinación de MAPK (TLR-4, TRIF, MyD88), ciclinas (ciclina A y ciclina E) y citocromo c:

- MAPK: Las muestras se homogenizaron en frío utilizando el siguiente tampón: 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 x100 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 M. B. et al., 2012).
- Ciclinas: Las muestras se homogenizaron en frío en el siguiente tampón RIPA: 50 mM Tris-HCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.25% deoxicolato de sodio, 1 mM EDTA con inhibidor de fosfatase (1 mM Ortovanadato de Sodio, 40 mM NaF, 10 mM glicerofosfato y 5mM

pirofosfato) e inhibidor de proteasas por cada 50 ml de tampón (Complete, Roche) a un pH 7.4 (Sekine S. et al., 2007).

- Citocromo c: Las muestras se homogenizaron en frío en el siguiente tampón: 20mmol/l Tris-HCl, pH 7,5, 150 mmol/l de NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,1% de SDS, 1% de desoxicolato de sodio, 2 mmol/l EDTA, 1 mmol/l de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 2 mg/ml de aprotinina, 10 mg/ml de leupeptina, y 5 mg/ml de pepstatina. El homogenado se centrifugó a 12.000g durante 10 minutos a 4° C, y se recogió el sobrenadante. La determinación de citocromo c se realizó siguiendo protocolos previamente descritos (Soeda J. et al., 2001).

En cada ensayo se utilizó la misma concentración de proteínas para todas las muestras. Las proteínas se mezclaron con el mismo volumen de tampón de carga de electroforesis (95% Laemli/ 5% β -mercaptoetanol) y se desnaturalizaron calentando la mezcla a 95°C durante 10 min. Las proteínas se separaron de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en un gel de poliacrilamida/SDS al 12% para MyD88, al 8% para TRIF, al 7,5% para TLR4, al 10% para ciclina A y E, al 15% para el citocromo c y a un voltaje constante de 120 mV. Posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF (0,2 μ m) con una intensidad de 350 mA durante 120 minutos en un tampón 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 20% etanol. 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 uno de los siguientes anticuerpos: anticuerpo primario policlonal anti-MyD88, anticuerpo primario monoclonal anti-TLR4 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA, dilución 1:500), anticuerpo primario policlonal anti-TRIF (Abcam, UK, dilución 1:500), anti-ciclina A (Santa Cruz, diluición 1:500), anti-ciclina E (Millipore, Billerica, MA, diluición 1:500), anti-citocromo c total, anti-citocromo c citosólico (Cell Signaling, Beverly, MA, diluición 1:500) y disueltos en tampón de bloqueo. A la mañana siguiente 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. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con peroxidasa respectivamente (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) que fue preparado en dilución 1:2000 y disuelto en tampón de bloqueo. Después de sucesivos lavados, la detección de las proteínas se llevó a cabo mediante un kit de quimioluminiscencia de acuerdo con las instrucciones del mismo. Un estándar pre-teñido se utilizó como marcador de peso molecular. Las membranas se incubaron con anticuerpos frente a al β -actina para confirmar que se cargaron las mismas cantidades de proteínas en cada pocillo.

La estimativa cuantitativa de las proteínas en las membranas se realizó por análisis densitométrico de las bandas de proteínas mediante el Programa QuantityOne, y se corrigió mediante la cantidad de β -actina, que se utilizó como control. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (Mayoral P. et al., 1999, Atkinson L. L. et al., 2002, Vázquez-Gil M. J. et al., 2004).

5. PCR a tiempo real

La extracción de RNA se realizó usando unos kits comerciales de la casa Qiagen, RNeasy Lipid tissue kit para los hígados grasos y RNeasy Mini para los no esteatósicos. En ambos casos se partió de 30 mg de tejido congelado y se procedió de acuerdo a las especificaciones de cada kit de extracción. Posteriormente se cuantificó el RNA y se llevó a cabo su retrotranscripción a cDNA usando un kit comercial de retrotranscripción de la casa Amersham. En este caso se partió de 5 μ g de RNA y se siguieron las especificaciones del fabricante. Finalmente se realizó la PCR a tiempo real usando sondas TaqMan prediseñada y validadas por la casa comercial Applied Biosystems y siguiendo las especificaciones del fabricante. Las sondas usadas fueron las siguientes: Rn00566673_m1, HGF; Rn00595224_m, resistina; Rn00822043, visfatina; Rn00563995_m1, carnitina-palmitoil transferase II (CPT2); Rn00566390, Acil-CoA-dehidrogenasa de cadena media (MCAD); Rn00590706, factor de crecimiento fibroblástico (FGF21); Rn00566942_g1, superóxido dismutasa-2 (SOD2); Rn00577994_g1, glutatión peroxidasa-1 (GPX1); Rn00594894_g1, esteroil CoA desaturasa -1 (SCD1); Rn00685720_m1, ácido-graso-sintetasa (FAS); Rn03296721_s1, citocromo c oxidasa subunidad I (COXI); Rn00567950_m1, citocromo c oxidasa subunidad IV (COXIV); Rn00667869_m1, β -actina. Para la evaluación de los resultados se llevaron a cabo experimentos control de eficiencia y se aplicó el método de $\Delta\Delta$ Ct usando la β -actina como gen de referencia y el grupo Sham como calibrador (Livak & Schmittgen, 2001). La PCR se llevó a cabo en un termociclador iCycler Thermal Cycler de la casa Bio-Rad.

6. Estudio histológico

6.1 Técnicas de inmunohistoquímica

Las muestras de tejido hepático se fijaron en paraformaldehído tamponado al 4% y pasadas 24 horas se incluyeron en parafina. En el ultramicrotomo se realizaron los cortes histológicos de 3 μ m de grosor. Los cortes se desparafinaron con xilol y se hidrataron con soluciones de etanol de concentraciones decrecientes y fueron sometidos al método inmunohistoquímico para los siguientes marcadores:

- Bromodesoxiuridina (BrdU) - El uso de la incorporación de BrdU al DNA es una técnica bien establecida y de uso común para la identificación de células que se dividen in vivo y en cultivos celulares. El BrdU es una pirimidina análogo de la timidina que se incorpora en el DNA de las células en la fase S del ciclo celular. La Inyección intraperitoneal de BrdU resulta en la incorporación nuclear sólo donde se está replicando activamente el DNA (Gratzner H. G., 1982; Dolbeare F. et al., 1983; Morstyn G. et al., 1983, Hayes N. L. et al., 2000). Para medir la síntesis del DNA, el BrdU fue administrado (50 mg/Kg, i.p.) 1 hora antes del sacrificio. Las muestras hepáticas se procesaron según el procedimiento estándar mencionado inicialmente y células que incorporaron el BrdU fueron identificadas usando anticuerpo primario anti-BrdU (GE Healthcare, USA). Después de incubar con el anticuerpo secundario, las muestras se trataron con DAB y el sustrato cromógeno que da un precipitado marrón a las células en división.

- Ki-67 - la proteína Ki-67 es conocida por ser un antígeno nuclear de proliferación presentes en las células en las fases G1, S, G2, y M del ciclo celular. Es parte de la matriz nuclear y es una proteína con un peso molecular de 740 kDa. Informes indican que es un marcador fiable de la actividad regenerativa (Kaita K.D. et al., 1997). La inmunohistoquímica se llevó a cabo mediante un kit comercial (DAKO Envision+System, peroxidase (DAB); Dako, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar se bloqueó la peroxidasa interna de la muestra. Se incubó con el anticuerpo primario anti Ki-67 (clon SP6; Abcam, Cambridge, MA). Después de incubar con el anticuerpo secundario, las muestras se trataron con DAB y el sustrato cromógeno que da un precipitado marrón a las células en división.

- Visfatina: La inmunohistoquímica fue el método de elección para identificar la localización intrahepática de la visfatina. La técnica se llevó a cabo mediante un kit comercial (DAKO Envision + System, peroxidase (DAB); Dako, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar se bloqueó la peroxidada interna de la muestra. Para cada detección, se incubó con el anticuerpo primario policlonal anti-visfatina (Abcam, UK). Después de incubar con el anticuerpo secundario, las muestras se trataron con DAB y el sustrato cromógeno que da un precipitado marrón.

Se tiñeron los cortes con hematoxilina para dar una tinción de contraste y se montaron los portaobjetos. El índice de marcaje del BrdU, de Ki-67 y visfatina se 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.

6.2 Estudio histológico con Hematoxilina y Eosina

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 C. H. et al., 1999). El índice mitótico se valoró por H&E siguiendo protocolo previamente descrito (Veteläinen R. et al., 2007) y se determinó mediante el conteo de núcleos teñidos en 30 campos de gran aumento. Y los datos se expresan como el porcentaje de células teñidas respecto al número total de hepatocitos. Para evaluar el grado de esteatosis se congeló el tejido y se utilizó la tinción de Red Oil o en secciones de 3 μm de acuerdo con los procedimientos estándar.

7. Estudio estadístico

El estudio estadístico se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y seguidamente se determinó el nivel de significación estadística con un test Student-Newman-Kels. Las tasas de supervivencia se estimaron por el método de Kaplan Meier y comparadas mediante el test de Log Rank. 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

1. Estudio 1

The effects of glucose and lipids in steatotic and non-steatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischaemia-reperfusion

Mariana Mendes-Braz, Maria Elias-Miró, Burkhard Kleuser, Susann Fayyaz, Mónica B. Jiménez-Castro, Marta Massip-Salcedo, Jordi Gracia-Sancho, Fernando S. Ramalho, Juan Rodes, Carmen Peralta.

Liver International. 2013. doi: 10.1111/liv.12348. [Epub ahead of print]

Antecedentes: La esteatosis es un factor de riesgo en la hepatectomía parcial (PH) bajo isquemia-reperfusión (I/R), técnica quirúrgica utilizada comúnmente en la práctica clínica para reducir el sangrado durante las resecciones hepáticas. Se desconoce el efecto del suplemento nutricional así como el papel de tejido adiposo periférico como fuente de energía en la regeneración del hígado tras la cirugía hepática. **Objetivos:** Investigar si la administración de glucosa o una emulsión lipídica podrían proteger a los hígados esteatósicos y no esteatósicos frente al daño y fallo en la regeneración hepática en un modelo experimental de PH bajo I/R. Se investigó la relevancia del tejido adiposo periférico en la regeneración del hígado tras la cirugía. **Métodos:** Los hígados esteatósicos y no esteatósicos de ratas se sometieron a procedimiento quirúrgico y se evaluaron los efectos del tratamiento con glucosa o lípidos sobre el daño y la regeneración hepática, así como los posibles mecanismos protectores subyacentes. **Resultados:** En hígados no esteatósicos, tanto el tratamiento con lípidos como con glucosa ofreció la misma protección frente al daño y el fallo en la regeneración y el contenido de ATP. El tejido adiposo no influyó la regeneración del hígado no esteatósico. En la presencia de esteatosis hepática, sólo el tratamiento con lípidos protegió frente a la lesión y fallo en la regeneración. Tales efectos beneficiosos cursaron mediante la inducción del ciclo celular, mantenimiento de los niveles de ATP y aumento en la tasa de S-1-P/CER y niveles de fosfolípidos. El tejido adiposo fue esencial para la regeneración del hígado esteatósico pero no se utilizó como fuente de energía. **Conclusión:** En condiciones de PH bajo I/R, el tratamiento con lípidos en el hígado no esteatósico proporcionó la misma protección que la glucosa, mientras que es preferible el tratamiento con lípidos para reducir los efectos perjudiciales de la cirugía hepática en presencia de esteatosis.

ORIGINAL ARTICLE

The effects of glucose and lipids in steatotic and non-steatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischaemia-reperfusion

Mariana Mendes-Braz^{1,2,*}, Maria Elias-Miró^{1,*}, Burkhard Kleuser³, Susann Fayyaz³, Mónica B. Jiménez-Castro¹, Marta Massip-Salcedo^{1,4}, Jordi Gracia-Sancho⁵, Fernando S. Ramalho², Juan Rodes^{1,4} and Carmen Peralta^{1,4}

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

2 Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

3 Institute of Nutritional Science, University of Postdam, Postdam, Germany

4 Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain

5 Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain

Keywords

hepatic steatosis – ischaemia – liver surgery – regeneration – resection

Abbreviations

ALT, alanine aminotransferase; ANOVA, analysis of variance; AST, aspartate aminotransferase; BrdU, bromodeoxyuridine; CER, Ceramides; ESI, electrospray ionization; H&E, Haematoxylin and Eosin; HDL, high-density lipoprotein; HGF, hepatocyte growth factor; I/R, ischaemia-reperfusion; IL-1 β , interleukin-1 β ; IL-6, interleukin-6; LC-MS/MS, liquid chromatography/tandem mass spectrometry; LDL, low-density lipoprotein; Ln, lean; LPT, lipectomy; MCP1, monocyte chemoattractant protein-1; MyD88, myeloid differentiation factor 88; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; Ob, obese; PH, partial hepatectomy; QTOF, quadrupole/time-of flight; S1P, sphingosine-1-phosphate; TGF- β , transforming growth factor- β ; TLR4, toll-like receptor 4; TNF- α , tumour necrosis factor- α ; TRIF, TIR domain-containing-adaptor inducing IFN-beta; VLDL, very-low-density lipoprotein.

Correspondence

Dr Carmen Peralta, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Esther Koplowitz Center, Roselló 149-153, 3rd floor, 08036 Barcelona, Spain
Tel: +34 9 3227 5400 ext 4177
Fax: +34 9 3312 9406
e-mail: cperalta@clinic.ub.es

Received 10 May 2013

Accepted 25 September 2013

DOI:10.1111/liv.12348

Abstract

Background: Steatosis is a risk factor in partial hepatectomy (PH) under ischaemia-reperfusion (I/R), which is commonly applied in clinical practice to reduce bleeding. Nutritional support strategies, as well as the role of peripheral adipose tissue as energy source for liver regeneration, remain poorly investigated. **Aims:** To investigate whether the administration of either glucose or a lipid emulsion could protect steatotic and non-steatotic livers against damage and regenerative failure in an experimental model of PH under I/R. The relevance of peripheral adipose tissue in liver regeneration following surgery is studied. **Methods:** Steatotic and non-steatotic rat livers were subjected to surgery and the effects of either glucose or lipid treatment on damage and regeneration, and part of the underlying mechanisms, were investigated. **Results:** In non-steatotic livers, treatment with lipids or glucose provided the same protection against damage, regeneration failure and ATP drop. Adipose tissue was not required to regenerate non-steatotic livers. In the presence of hepatic steatosis, lipid treatment, but not glucose, protected against damage and regenerative failure by induction of cell cycle, maintenance of ATP levels and elevation of sphingosine-1-phosphate/ceramide ratio and phospholipid levels. Peripheral adipose tissue was required for regenerating the steatotic liver but it was not used as an energy source. **Conclusion:** Lipid treatment in non-steatotic livers provides the same protection as that afforded by glucose in conditions of PH under I/R, whereas the treatment with lipids is preferable to reduce the injurious effects of liver surgery in the presence of steatosis.

*Both authors contributed equally to this work

In clinical situations, partial hepatectomy (PH) under ischaemia-reperfusion (I/R) is usually performed to control bleeding during parenchymal dissection (1, 2). Hepatic steatosis, a major risk factor for liver surgery, is associated with increased complication index and post-operative mortality after major liver resection (3–5). Indeed, it is estimated that more than 20% of patients undergoing liver resection have some degree of steatosis, usually related to obesity (3, 4, 6). A further increase in the prevalence of steatosis in hepatic surgery is expected (7).

It has been reported that lipids, rather than carbohydrates, are the preferred energy substrate for non-steatotic livers in conditions of PH without I/R (8–10). To explain this fact authors suggest that adipose tissue supplies the energy needed by the remnant liver (11–13), and that glucose administration might block the mobilization of fatty acids from adipose tissue by the liver to obtain energy (14). Whether glucose or lipids is the preferred substrate for regeneration in both steatotic and non-steatotic livers after PH under I/R remains unknown.

Lipids are not only a source of energy. Indeed, sphingolipids, specifically ceramides (CER) and sphingosine-1-phosphate (S1P), have attracted significant attention because of its dynamic role in cell death and proliferation. S1P synthesis induced by a diet rich in fatty acids is a key signal for reducing hepatic damage and improving liver regeneration (15). CER, which induce necrosis and regenerative failure (16), can be intracellularly accumulated in response to a diet rich in fatty acids, or to glucose administration (17, 18). Given these data, one might assume that the final effect of strategies based in lipid or glucose infusion would partially depend on the hepatic accumulation of both S1P and CER, or in other words, in the S1P/CER ratio.

It has been demonstrated that fatty acids activate the toll-like receptor 4 (TLR4) pathway (19–21), which ultimately induce alterations in mediators/factors that promote liver regeneration after PH (22). In addition, a recent study from our group indicated that TLR4 activation protected steatotic livers against I/R damage associated with transplantation (23). Therefore, it is possible that activation of the TLR4 pathway could also occur if a lipid supplement is given in liver surgical conditions requiring both a process of liver regeneration and protection against I/R.

In the present study, we aimed to compare the benefits of a lipid supplement on damage and regeneration in both steatotic and non-steatotic livers with those obtained when glucose was administered. We evaluated the effect of lipid or glucose administration on hepatic ATP content and the relevance of systemic adipose tissue as an energy source for regenerating both types of livers in the setting of PH under I/R. In addition, we determined S1P and CER levels in steatotic and non-steatotic livers undergoing PH under I/R treated or not with lipids or glucose, and the possible involvement of

TLR4 pathway in the effects of lipid supplementation on damage and liver regeneration.

Materials and methods

Experimental animals

Male homozygous obese (Ob) (400–450 g) and heterozygous lean (Ln) Zucker rats (350–400 g) for genetic obesity experimental model, and male Wistar rats (200–220 g) fed with a choline-deficient or standard chow diet for 10 days (24) for nutritional obesity experimental model were used. Control rats consumed a semipurified diet containing adequate levels of choline. Both diets were purchased from Dyets (Bethlehem, PA). The analytical composition of the choline deficient diet (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. The standard diet was enriched with 14.48 g/kg of choline at the expense of sucrose.

Ob Zucker and Ob Wistar rats showed severe macrovesicular and microvesicular fatty infiltration in hepatocytes (60–70% steatosis). All procedures were performed under isoflurane anaesthesia. This study complied with European Union regulations on animal experiments.

Surgical procedure

The experiments in this study employed a rat model of PH (70%) under 60 min of ischaemia, period of time currently used in liver surgery, as previously described (25, 26). Briefly, after anaesthesia with isoflurane and resection of left hepatic lobe, a microvascular clamp was placed for 60 min across the portal triad supplying the median lobe. Congestion of the bowel was avoided during the clamping period by preserving the portal flow through the right and caudate lobes. At the end of ischaemia time, the right lobe and caudate lobes were resected, and reperfusion of the median lobe was achieved by the release of the clamp (25, 26).

Protocol 1

Effects of lipid and glucose administration on hepatic damage and regenerative failure in steatotic and non-steatotic livers at 12, 24 and 48 h after liver surgery in either genetic or nutritional obesity experimental model.

Ln and Ob animals were subjected to PH under I/R and isoenergetic amounts of lipids or glucose were intravenously infused.

The experimental groups are the following:

- (i) Sham: the hepatic hilar vessels were dissected.
- (ii) PH+I/R: animals subjected to PH (70%) under 60 min of ischaemia (25, 26).
- (iii) PH+I/R+Glucose: same as group 2 but animals were intravenously infused for 4 h with 5 ml of a glucose solution (28%, energy content 4.6 MJ/1000 ml, Sigma Aldrich, Madrid, Spain) immediately after surgery (27).
- (iv) PH+I/R+Lipid: same as group 2 but animals were intravenously infused for 4 h with 5 ml of a lipid solution (10% Intralipid; 4.6 MJ/1000 ml, Fresenius Kabi, Barcelona, Spain) immediately after surgery (27). The emulsion comprised 52% linoleic acid, 22% oleic acid, 13% palmitic acid, 8% linolenic acid, 4% stearic acid, 1% other fatty acids, 8.184 g/l egg phospholipids and 15 g/l glycerine (27–29).

Hepatic injury (transaminases and damage score) and liver regeneration [mitotic index, percentage of BrdU-positive hepatocytes, percentage of Ki67 positive hepatocytes, hepatocyte growth factor (HGF) and transforming growth factor β (TGF- β), and levels of cyclin E and cyclin A] were determined at 12, 24 and 48 h after liver surgery. For survival studies, Ln and Ob rats were subjected to intervention similar to that used for groups 2–4 (protocol 1) and the survival was monitored for 14 days (23).

Protocol 2

Underlying mechanisms of glucose and lipids effects in steatotic and non-steatotic livers at 24 h after liver surgery.

The effects of exogenous glucose and lipids on ATP, TLR4 pathway (MyD88; myeloid differentiation factor 88 and TRIF: TIR domain-containing-adaptor inducing IFN β) and inflammatory signalling [tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1), nuclear factor-kappa B (NF-kB) and IL-6] were examined in groups included in protocol 1 at 24 h after liver surgery. Sphingolipids (S1P and CER), triglycerides, low-density lipoprotein (LDL), very-low-density lipoprotein (VLDL), high-density lipoprotein (HDL), free fatty acids (FFA), total cholesterol and phospholipids were also evaluated.

Protocol 3

Role of adipose tissue in steatotic and non-steatotic livers regeneration at 24 h after liver surgery.

To investigate the relevance of adipose tissue in steatotic and non-steatotic livers regeneration the following groups were studied:

- (v) Sham+lipectomy of white adipose tissue (Sham+LPT): same as group 1, but mesenteric, perirenal, retroperitoneal and epididymal adipose tissue were resected and extracted (30, 31).

- (vi) PH+I/R+lipectomy of white adipose tissue (PH+I/R+LPT): same as group 2, but mesenteric, perirenal, retroperitoneal and epididymal adipose tissue were resected and extracted before starting PH+I/R (30, 31).
- (vii) PH+I/R+LPT+Glucose: same as group 6 but animals were intravenously infused for 4 h with 5 ml of a glucose solution (28%, energy content 4.6 MJ/1000 ml, Sigma Aldrich, Spain) immediately after surgery (27).
- (viii) PH+I/R+LPT+Lipid: same as group 6 but animals were intravenously infused for 4 h with 5 ml of a lipid solution (10% Intralipid; 4.6 MJ/1000 ml, Fresenius Kabi, Spain) immediately after surgery (27–29).

Hepatic injury (transaminases and damage score), liver regeneration (percentage of Ki67 positive hepatocytes, HGF and TGF- β), ATP and adiponectin levels were determined at 24 h after liver surgery.

The interventions and measurements for protocols 1, 2 and 3 are shown in Figure 1. Doses and times used for the different treatments were selected on the basis of previous studies in non-steatotic livers undergoing partial hepatectomy without I/R (27, 32), and preliminary studies from our group.

Biochemical determinations

Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), HGF, total and active TGF- β , TLR4, MyD88 and TRIF, TNF- α , IL-1 β , MCP1, p65-NF-kB, IL-6, adiponectin and ATP levels were measured as described elsewhere (26, 33–37). HGF is a potent mitogen, whereas active TGF- β has been considered as the main inhibitor of hepatocyte proliferation (33, 38). LDL, VLDL, HDL, free fatty acids, triglycerides, total cholesterol and phospholipids were measured following standard procedures (39–41).

Determination of S1P by mass spectrometry

S1P was extracted by a modified two-step lipid extraction technique previously described (42). Sample analysis was performed by rapid resolution liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using a quadrupole/time-of flight (QTOF) 6530 mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) operating in the positive electrospray ionization (ESI) mode. Chromatographic separations were performed by a X-Bridge column (C18, 4.6 \times 150 mm, 3.5 μ m particle size, 138 Å pore size, Waters GmbH, Eschborn, Germany). Elution was performed using a gradient consisting of eluent A (water/formic acid 100:0.1 v/v) and eluent B (acetonitrile/tetrahydrofuran/formic acid 50:50:0.1 v/v). The precursor ions of S1P (m/z 380.2560) and C17-S1P (m/z 366.2404) were cleaved into the fragment ions of m/z 264.2700 and m/z

Protocol 1

1. Sham (Ob and Ln rats)	Hepatic hilar vessels dissected	24 h
2. PH+I/R (Ob and Ln rats)	Partial hepatectomy (70%) + 60 min Ischemia	12, 24 and 48 h
3. PH+I/R+Glucose (Ob and Ln rats)	Partial hepatectomy (70%) + 60 min Ischemia + Glucose	12, 24 and 48 h
4. PH+I/R+Lipid (Ob and Ln rats)	Partial hepatectomy (70%) + 60 min Ischemia + Lipid	12, 24 and 48 h

Test at 12, 24 and 48 h after liver surgery. Transaminases, damage score, mitotic index, Ki-67 positive hepatocytes, BrdU incorporation, HGF, TGF- β , cyclin E and cyclin A. Survival was monitored for 14 days.

Protocol 2

Test at 24 h after liver surgery. ATP, TLR4 pathway (MyD88 and TRIF) and inflammatory signalling (TNF- α , IL-1 β , MCP1, NF- κ B and IL-6) and lipid profile (S1P, CER, triglycerides, LDL, VLDL, HDL, FFA, total cholesterol and phospholipids) (Groups from Protocol1).

Protocol 3

5. Sham+LPT (Ob and Ln rats)	Lipectomy + Hepatic hilar vessels dissected	24 h
6. PH+I/R+LPT (Ob and Ln rats)	Lipectomy + Partial hepatectomy (70%) + 60 min Ischemia	24 h
7. PH+I/R+LPT+Glucose (Ob and Ln rats)	Lipectomy + Partial hepatectomy (70%) + 60 min Ischemia + Glucose	24 h
8. PH+I/R+LPT+Lipid (Ob and Ln rats)	Lipectomy + Partial hepatectomy (70%) + 60 min Ischemia + Lipid	24 h

Test at 24 h after liver surgery. Transaminases, damage score, Ki-67 positive hepatocytes, HGF, TGF- β , ATP and adiponectin.

Fig. 1. Flow chart of the interventions and measurements corresponding to protocols 1, 2, 3 and 4. (Protocol 1) Effects of glucose and lipid emulsion administration on hepatic damage and regenerative failure in steatotic and non-steatotic livers at 12, 24 and 48 h after liver surgery and survival studies in either genetic or nutritional obesity model, (Protocol 2) Molecular mechanisms of glucose and lipids in steatotic and non-steatotic livers at 24 h after liver surgery, and (Protocol 3) Role of adipose tissue in regeneration of steatotic and non-steatotic livers at 24 h after liver surgery.

250.2529 respectively. Quantification was performed with Mass Hunter Software.

Measurement of CER by mass spectrometry

Tissue samples were homogenized and different ceramides were extracted as previously described (43). Sample analysis was performed by rapid resolution LC-MS/MS using a QTOF 6530 mass spectrometer. Chromatographic separations were obtained using a ZORBAX Eclipse XDB-C18 (C18, 4.6 \times 50 mm, 1.8 μ m particle size, 80 \AA pore size, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). An isocratic solvent system consisting of acetonitrile/2-propanol 3:2 with 1% formic acid and a flow rate of 1 mL/min over 15 min was used. Quantification of the fragment ion of m/z 264.270 was performed using Mass Hunter Software.

Western blotting

Western blotting for TLR4 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), TRIF (Abcam, Cambridge, UK), MyD88 (Santa Cruz Biotech), cyclin E (Santa Cruz Biotech) and cyclin A (Santa Cruz Biotech) was performed as described elsewhere (23, 44). Immunoreactive protein bands were visualized with chemiluminescence reagents

and were quantified densitometrically with Quantity One software.

Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction

Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Madrid, Spain). Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis were performed with Assays-on-Demand TaqMan probes (Rn00566673_m1, HGF and Rn0 0667869_m1, β -actin) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's protocol.

Histology, oil red staining and immunohistochemistry

To appraise the severity of hepatic injury we graded haematoxylin and eosin-stained sections with a point-counting method on an ordinal scale: (0) minimal or no evidence of injury; (1) mild injury consisting of cytoplasmic vacuolation and focal nuclear pyknosis; (2) moderate to severe injury with extensive nuclear pyknosis, cytoplasmic hypercosinophilia and a loss of intercellular borders; (3) severe necrosis with disintegration of hepatic cords, haemorrhaging, and neutrophil infiltration and (4) very severe necrosis with disintegration of

hepatic cords, haemorrhaging and neutrophil infiltration (26, 35). Liver steatosis was evaluated via oil red staining on frozen specimens, and the percentage of steatosis was calculated by image analysis according to the standard procedure (26, 35). For liver regeneration, liver samples were immunostained with a rabbit monoclonal antibody against Ki-67 (clone SP6, Abcam, Cambridge, MA, USA), developed with diaminobenzidine, and counterstained with haematoxylin (26). The percentages of proliferating hepatocytes were also estimated through the quantification of hepatocytes that incorporated bromodeoxyuridine (BrdU). For this, BrdU was administered intraperitoneally at 50 mg/kg 1 h before the animals were sacrificed, and BrdU-positive cells were detected with a mouse anti-BrdU antibody (GE Healthcare, Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA) (26, 45). The mitotic index was determined in haematoxylin and eosin-stained liver sections (26, 33). At least 30 high-power fields were counted.

Statistics

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

Results

Effects of lipid and glucose administration on hepatic damage and regeneration in steatotic and non-steatotic livers

In non-steatotic livers, PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid exhibited reduced hepatic damage measured as transaminases levels when compared with the PH+I/R group (Fig. 2A). The histological study of non-steatotic livers from the PH+I/R group showed multifocal areas of moderate coagulative necrosis and neutrophil infiltration, randomly distributed throughout the parenchyma at 24 h after liver surgery. PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid livers reduced extent and number of necrotic areas in non-steatotic livers in comparison with the PH+I/R group. The damage score values in non-steatotic livers for the different groups (PH+I/R, PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid), 24 h after liver surgery are shown in Fig. 2B. No differences in hepatic damage parameters were observed comparing both nutritional supplementation strategies.

Next, we evaluated which energy substrate (glucose or lipid) is more efficient in accelerating the onset of regeneration in non-steatotic livers undergoing PH+I/R. Our results revealed an improvement in the regenerative process of PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid livers when compared with the PH+I/R group. At each time point studied, PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid

livers showed increased mitotic index and BrdU-positive hepatocytes in non-steatotic livers compared with the PH+I/R (Fig. 2A). This was associated with increased percentage of Ki67-positive-hepatocytes, increased HGF levels and reduced active TGF- β levels at 24 h after liver surgery (Fig. 2B). Total hepatic TGF- β levels were similar in all groups (data not shown). Similarly to the parameters of hepatic damage, liver regeneration parameters of the PH+I/R+Lipid group were similar to those of the PH+I/R+Glucose group. As shown in Figure 2B, treatment with glucose or lipids (PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid groups) reduced lethality in Ln animals.

The effect of glucose and lipids on liver damage and regeneration in the presence of steatosis was also investigated at 12, 24 and 48 h after liver surgery. Glucose treatment did not protect steatotic livers against damage. Indeed, PH+I/R+Glucose resulted in transaminases and damage score values similar to those of the PH+I/R group (Fig. 3A,B). However, at each time point, lipid pretreatment significantly reduced the hepatic damage parameters compared with the PH+I/R group (Fig. 3). Steatotic livers of the PH+I/R and PH+I/R+Glucose groups showed extensive and confluent areas of coagulative necrosis with neutrophil infiltration at 24 h after surgery. PH+I/R+Lipid reduced the extent and number of necrotic areas in steatotic livers when compared with the I/R group (Fig. 3C).

With respect to the parameters of liver regeneration in steatotic livers, both glucose and lipid treatment increased the mitotic index and the percentage of both BrdU-positive hepatocytes and Ki-67-positive hepatocytes when compared with the PH+I/R group (Fig. 3A, B). However, at each time point, the increase in the parameters of hepatic proliferation was stronger in the PH+I/R+Lipid group than that caused by glucose (PH+I/R+Glucose group). Representative photomicrographs of Ki-67-positive hepatocytes of each group are shown in Fig. 3C. Analysis of growth factors evidenced that PH+I/R+Lipid livers had higher HGF and lower TGF- β levels in comparison with the PH+I/R and PH+I/R+Glucose groups (Fig. 3B). Survival of Ob animals was higher when lipid emulsion was administered (Fig. 3B).

The influence of glucose and lipids on hepatic cyclins expression was examined in steatotic livers at 12, 24 and 48 h after liver surgery. As shown in Fig. 4A hepatic levels of cyclin E, which is induced during G1 and mediates transition into S phase (46), peaked after 12 h of surgery in the PH+I/R+Lipid group, and after 24 h in PH+I/R+Glucose. Hepatic cyclin A expression, necessary for S phase progression (47), was higher in PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid groups than in the PH+I/R group (Fig. 4B). However, the increase in cyclin A expression was superior in PH+I/R+Lipid group than in PH+I/R+Glucose group at each time point.

Our results indicated that the effects of lipids and glucose on damage and regeneration in both liver types

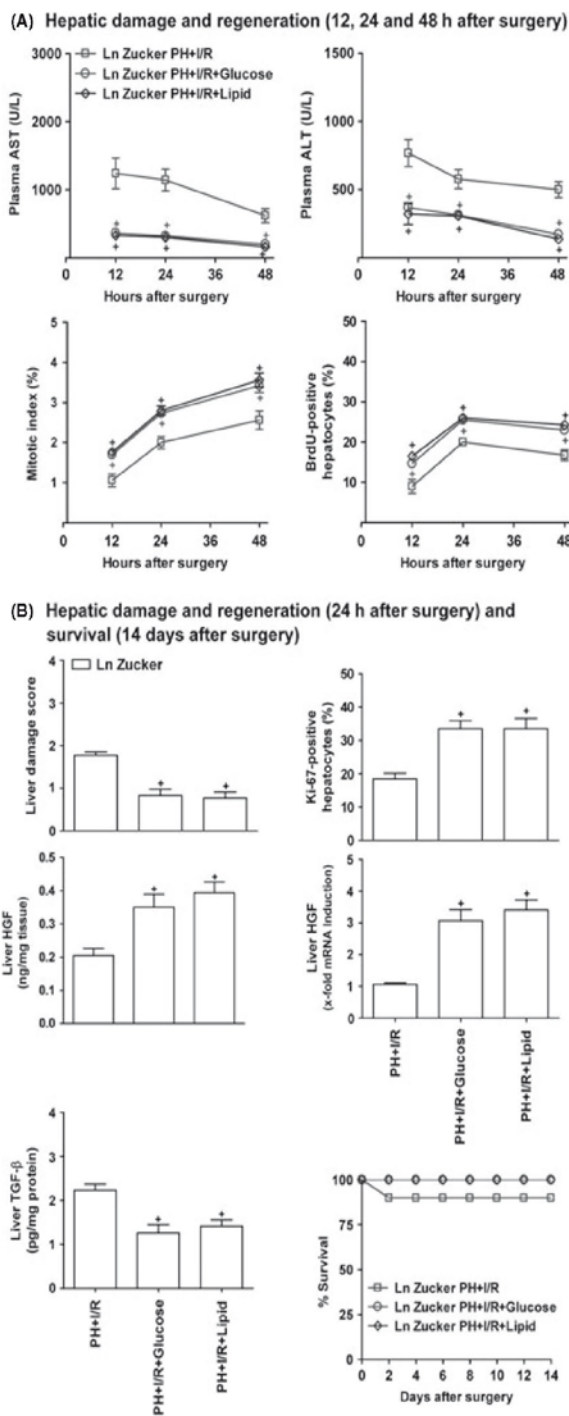


Fig. 2. Effects of glucose and lipids in non-steatotic livers in the genetic obesity experimental model. (A) Effects of glucose and lipids on hepatic injury (plasma AST and ALT levels) and regeneration (mitotic index and percentage of BrdU-positive hepatocytes) at 12, 24 and 48 h after liver surgery in Ln animals. (B) Effects of glucose and lipids on liver damage score and percentage of Ki-67 positive hepatocytes, HGF and TGF- β levels at 24 h after liver surgery in Ln animals. Six Ln animals from each group were included in each measurement. Survival of Ln animals at 14 days after surgery was shown in Figure 2B (10 Ln animals from each group). * $P < 0.05$ vs. PH+I/R. PH+I/R+Lipid vs. PH+I/R+Glucose, $P =$ not significant.

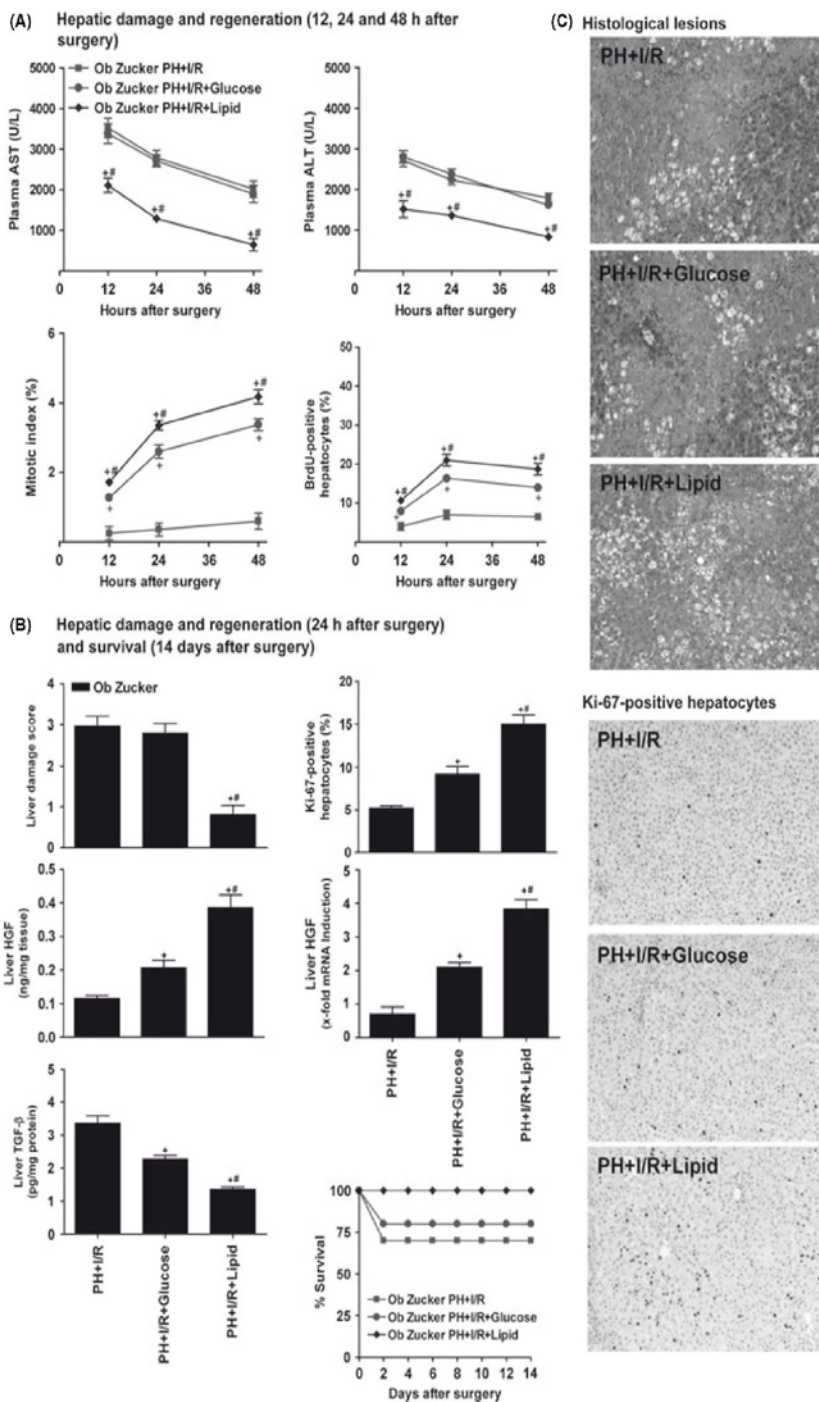


Fig. 3. Effects of glucose and lipids in steatotic livers in the genetic obesity experimental model. (A) Effects of glucose and lipids on AST and ALT levels, mitotic index and percentage of BrdU-positive hepatocytes at 12, 24 and 48 h after surgery in Ob animals. (B) Effects of glucose and lipids on liver damage score and percentage of Ki-67-positive hepatocytes, HGF and TGF-β levels at 24 h after surgery in Ob animals. Six Ob animals from each group were included in each measurement. Survival of Ob animals at 14 days after surgery is shown in Figure 2B (10 Ob animals from each group). **P* < 0.05 vs. PH+I/R. #*P* < 0.05 vs. PH+I/R+Glucose. (C) Histological lesions and ki-67-positive hepatocytes staining in steatotic livers 24 h after surgery (10x).

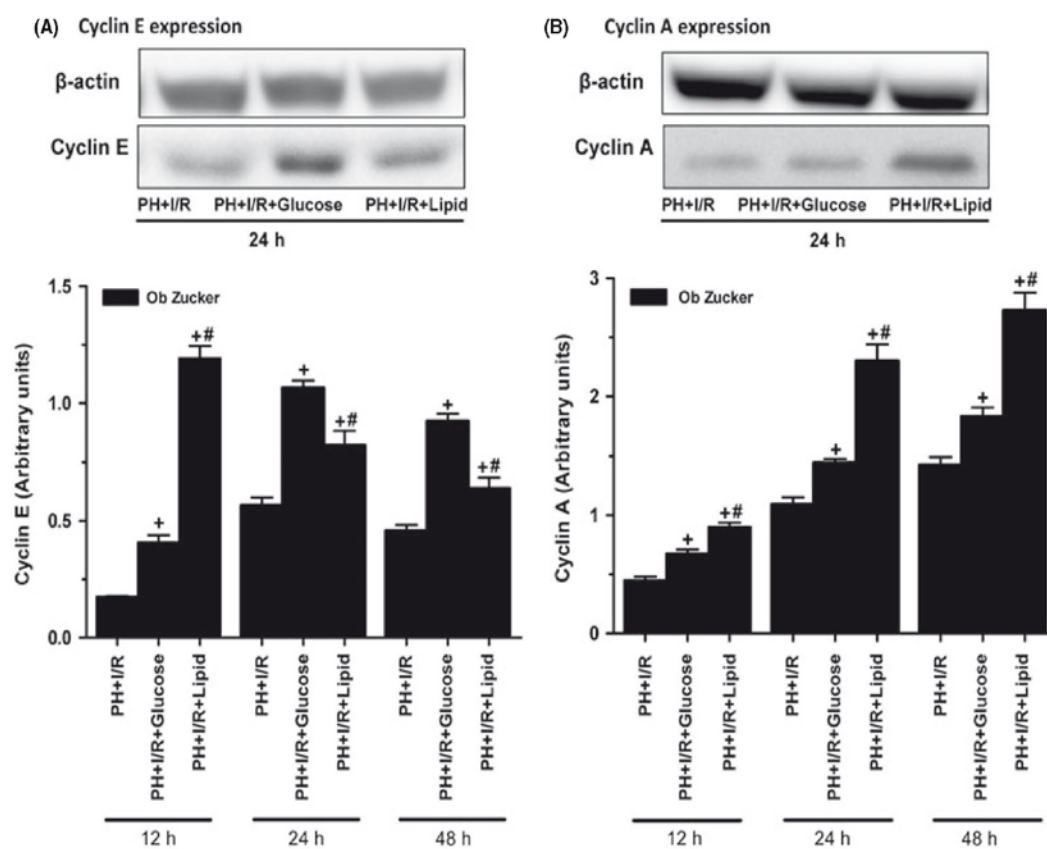


Fig. 4. Effects of glucose and lipids on cyclin E and cyclin A expression in steatotic livers. Protein levels of cyclin E (A) and cyclin A (B) at 12, 24 and 48 h after surgery in Ob animals. Representative western blots at the top and densitometric analysis at the bottom. Six animals in each group and each time were included for each measurement. * $P < 0.05$ vs. PH+I/R. # $P < 0.05$ vs. PH+I/R+Glucose.

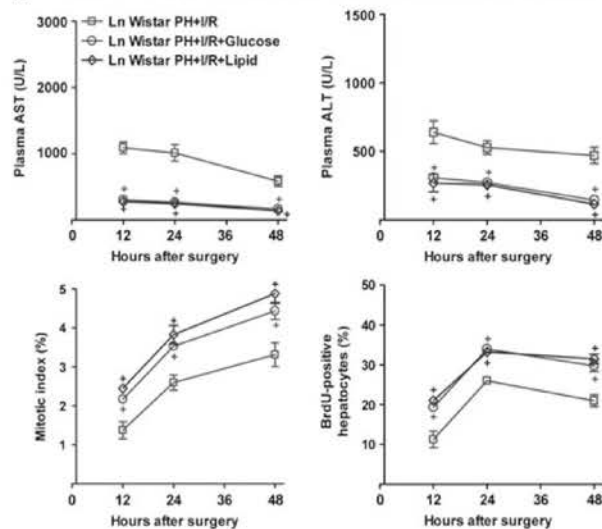
in a nutritional obesity model followed a similar pattern to those described in genetic obesity experimental model (Zucker rats). Thus, in nutritional obesity model, our results revealed an improvement in damage and regenerative process of PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid in non-steatotic livers when compared with the PH+I/R group and not differences were observed when comparing both treatments (Fig. 5). In steatotic livers, glucose (PH+I/R+Glucose group) did not protect against damage whereas lipid treatment (PH+I/R+Lipid group) conferred protection (Fig. 6). The benefits of these treatments on regenerative failure in steatotic livers were more evident when lipid infusion was administered (Fig. 6).

Underlying mechanisms of glucose and lipids in steatotic and non-steatotic livers

ATP levels in non-steatotic livers of the PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid groups were higher than in the PH+I/R group (Fig. 7A). However, no differences in hepatic ATP levels were observed comparing the PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid groups. The increase in

ATP levels in steatotic livers was more robust in the PH+I/R+Lipid group than that obtained by glucose treatment (Fig. 7A). Next, we evaluated if in addition to ATP, other mechanisms including TLR4 pathway and/or S1P/CER levels could explain the superior benefits conferred by lipids. As shown in Fig. 7B, protein levels of TLR4 and its downstream mediators TRIF and MyD88 in steatotic and non-steatotic livers of the PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid groups were similar to PH+I/R group. When glucose or lipids were administered (PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid groups) TNF- α , IL-1 β , MCP1 and NF- κ B levels in both liver types were similar to those of the PH+I/R group (Fig. 7B). In non-steatotic livers, PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid exhibited increased IL-6 levels compared with the PH+I/R group. As occurs for HGF mRNA (Fig. 3B), the increase in IL-6 levels in steatotic livers was more robust in the PH+I/R+Lipid group than that obtained by glucose treatment (PH+I/R+Glucose group) (Fig. 7B). TNF- α , IL-1 β , MCP1 and IL-6 levels in plasma followed a similar pattern to that described in liver (data not shown). Reduced CER and increased

(A) Hepatic damage and regeneration (12, 24 and 48 h after surgery)



(B) Hepatic damage and regeneration (24 h after surgery) and survival (14 days after surgery)

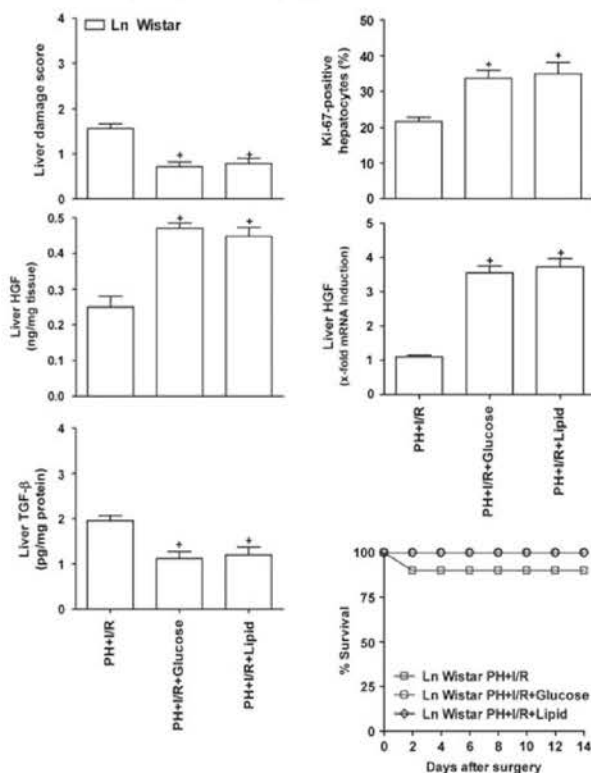


Fig. 5. Effects of glucose and lipids in non-steatotic livers in the nutritional obesity experimental model. Hepatic damage and regeneration, and survival in non-steatotic (as described in Fig. 2).

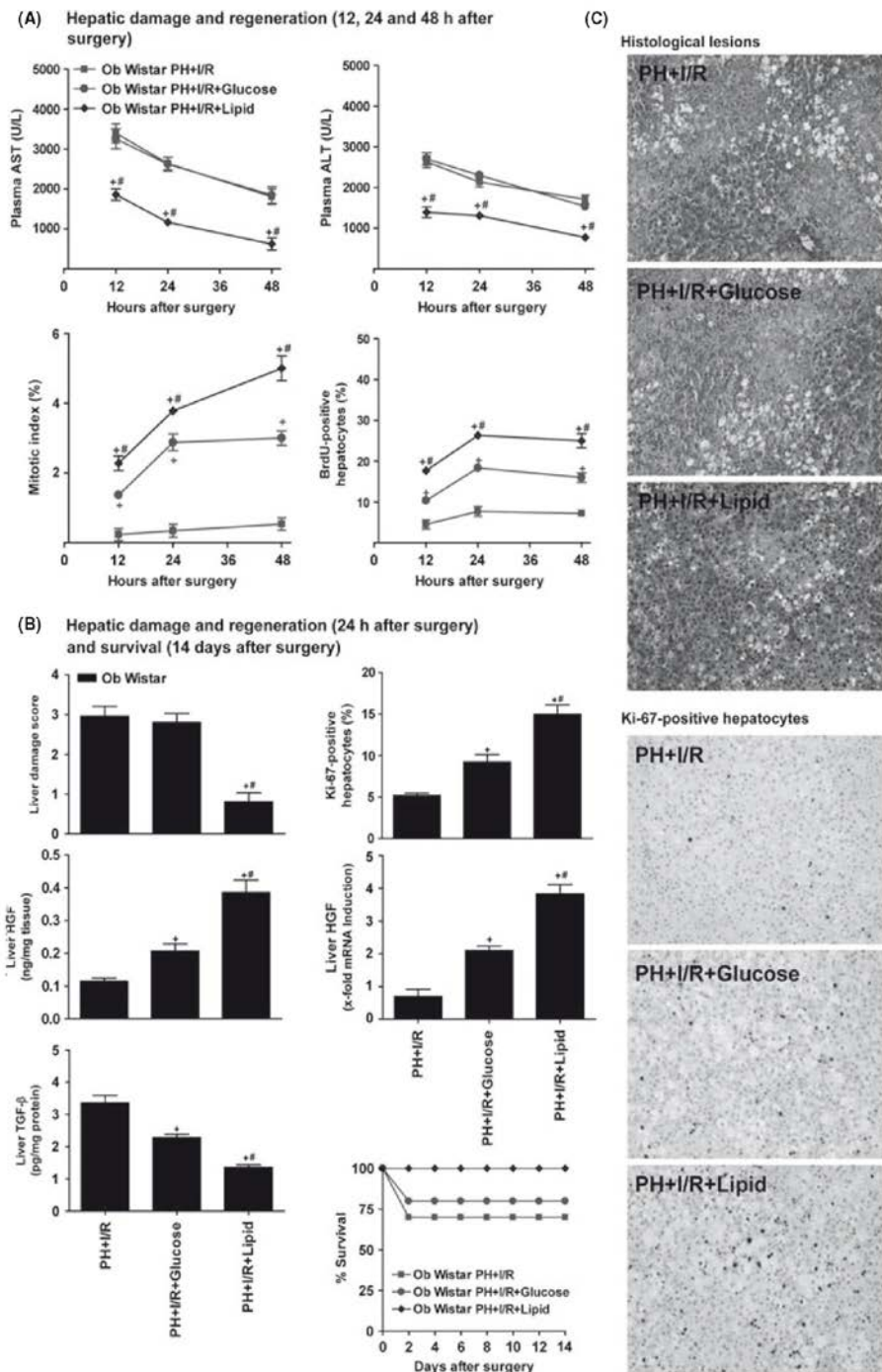


Fig. 6. Effects of glucose and lipids in steatotic livers in the nutritional obesity experimental model. Hepatic damage and regeneration, and survival in steatotic (as described in Fig. 3).

S1P/CER ratio were observed in steatotic livers treated with lipids when compared with the results found after glucose treatment (Fig. 8A). Individual CER (C16, C18, C20, C22, C24, C24:1 and C24:2) followed a similar pattern to that described for total CER (Fig. 8A). In Ln and Ob animals, HDL, LDL, VLDL, FFA, triglycerides and total cholesterol levels were similar in all groups. PH+I/R+Lipid resulted in increased phospholipid levels in steatotic and non-steatotic livers when compared with the PH+I/R group (Fig. 8B).

Role of adipose tissue in steatotic and non-steatotic livers

Given the relevance of adipose tissue on liver damage and regeneration in non-steatotic livers undergoing PH without I/R (11–13), we evaluated that this situation could also be true in conditions of PH under I/R. For

this, Ln and Ob animals subjected to PH+I/R were submitted to interventions based in the elimination of peripheral adipose store, and the effects of glucose or lipids on hepatic damage and regeneration were evaluated. Our results indicated that if peripheral adipose tissue is removed in Ln animals (PH+I/R+LPT), the parameters of liver damage and regeneration are similar to the PH+I/R group (Fig. 9A, B). In addition, if peripheral adipose tissue is removed in Ln animals treated with glucose (PH+I/R+LPT+Glucose) or lipids (PH+I/R+LPT+Lipid group), the parameters of liver damage and regeneration do not differ from those of the PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid groups respectively (Fig. 9A,B). However, elimination of peripheral adipose tissue (PH+I/R+LPT group) in Ob animals did negatively affect hepatic damage and liver regeneration exhibiting higher parameters of hepatic injury than the

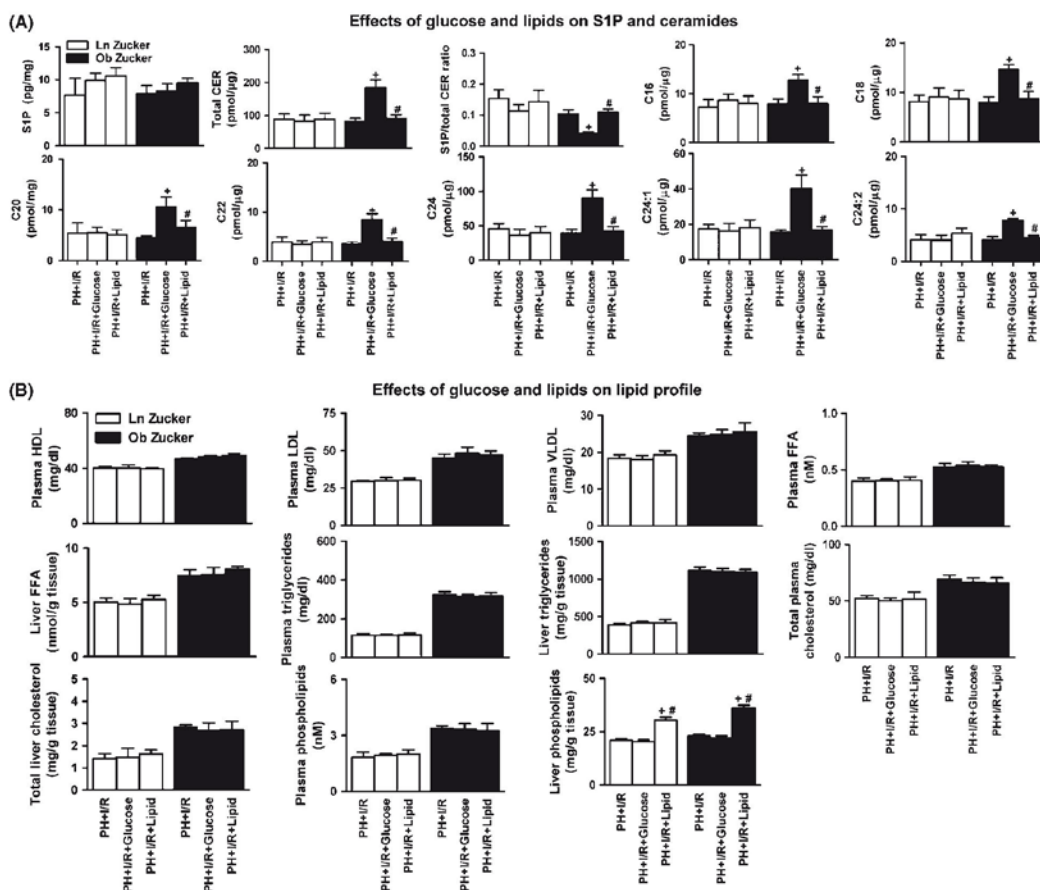


Fig. 8. Effects of glucose and lipids on lipid profile in steatotic and non-steatotic livers. (A) S1P, total and individual CER, and (B) HDL, LDL, VLDL, FFA, triglycerides, total cholesterol and phospholipids at 24 h after surgery in Ln and Ob animals. Six Ln animals and six Ob animals in each group were included for each measurement. **P* < 0.05 vs. PH+I/R. #*P* < 0.05 vs. PH+I/R+Glucose.

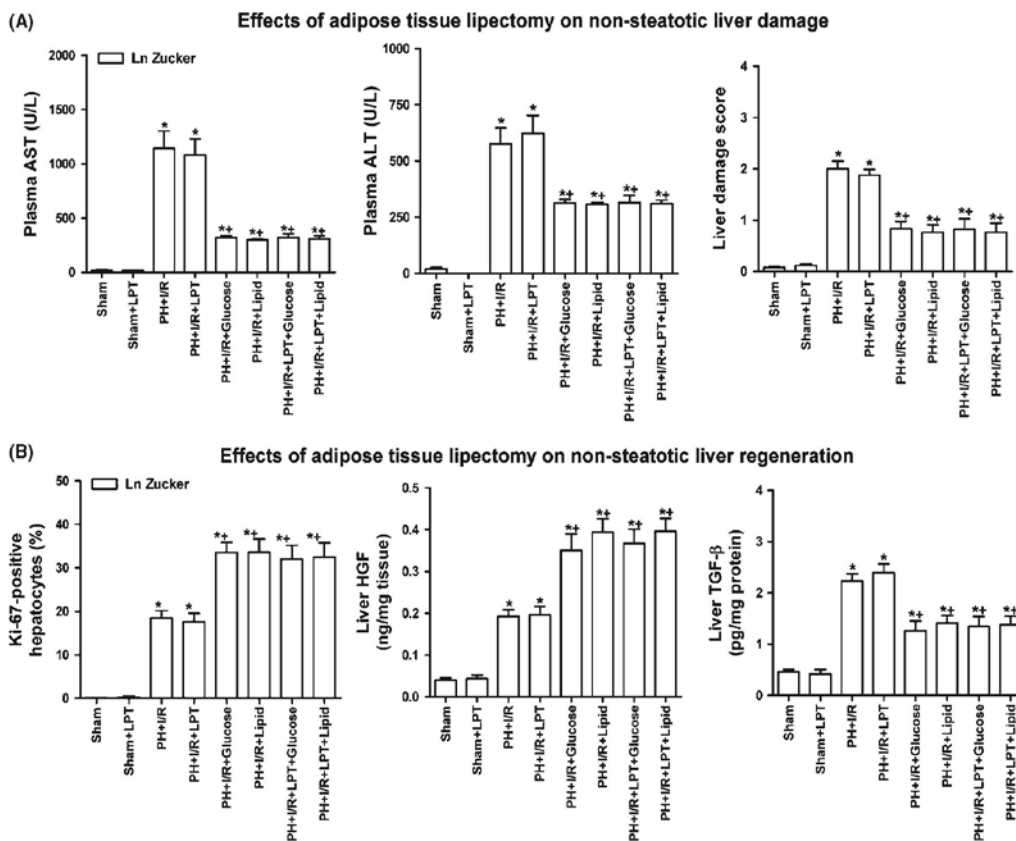


Fig. 9. Effects of lipectomy of white adipose tissue on hepatic injury and regeneration in non-steatotic livers. (A) Hepatic injury (AST, ALT and damage score) and (B) hepatic regeneration (percentages of ki-67-positive hepatocytes, and levels of HGF and TGF-β) at 24 h after surgery in Ln animals. Six Ln animals in each group were included for each measurement. **P* < 0.05 vs. Sham. ^*P* < 0.05 vs. PH+I/R.

PH+I/R group (Fig. 10A,B), associated with reduced Ki-67-positive hepatocytes and HGF levels, and high TGF-β levels. In addition, if peripheral adipose tissue is removed in Ob animals treated with glucose (PH+I/R+LPT+Glucose group) or lipids (PH+I/R+LPT+Lipid group), the beneficial effects of nutritional support on liver damage and regeneration were abolished (Fig. 10A, B). Altogether demonstrating that adipose tissue plays a key role in steatotic livers but not in non-steatotic ones. Given the key role of adipose tissue as an energy source (11–13), and the transient hepatic lipid accumulation from adipose tissue during regeneration (26, 48, 49), we next evaluated if changes in hepatic damage and liver regeneration observed in lipectomized Ob animals undergoing PH+I/R (PH+I/R+LPT group) could be reflected in differences in hepatic ATP levels. Adipose tissue-dependent hepatic lipid accumulation during regeneration was confirmed in Ob animals in the current study (data not shown) but hepatic lipid accumulation was not used for synthesis of ATP. Indeed, hepatic

ATP levels in Ob animals without peripheral adipose tissue (PH+I/R+LPT group) were similar to those of the PH+I/R group (Fig. 10C). In addition, hepatic ATP levels in PH+I/R+LPT+Glucose and PH+I/R+LPT+Lipid groups were similar to those of the PH+I/R+Glucose and PH+I/R+Lipid groups respectively. Our results indicated that adipose tissue could be a source of different hormones such as adiponectin. This hormone reduces damage and increase regeneration in steatotic livers undergoing both I/R and hepatectomy, such as small-for-size liver grafts (5, 50). In fact, in Ln Zucker animals, adiponectin levels in adipose tissue, plasma and liver of the PH+I/R group were similar to those found in the Sham group (Fig. 11). In Ob Zucker animals, reduced adiponectin levels were observed in adipose tissue of the PH+I/R group compared with sham. This was associated with increased protein levels of adiponectin in plasma and liver, without changes in adiponectin mRNA levels. Removal of adipose tissue in Ob animals by surgical interventions (PH+I/R+LPT

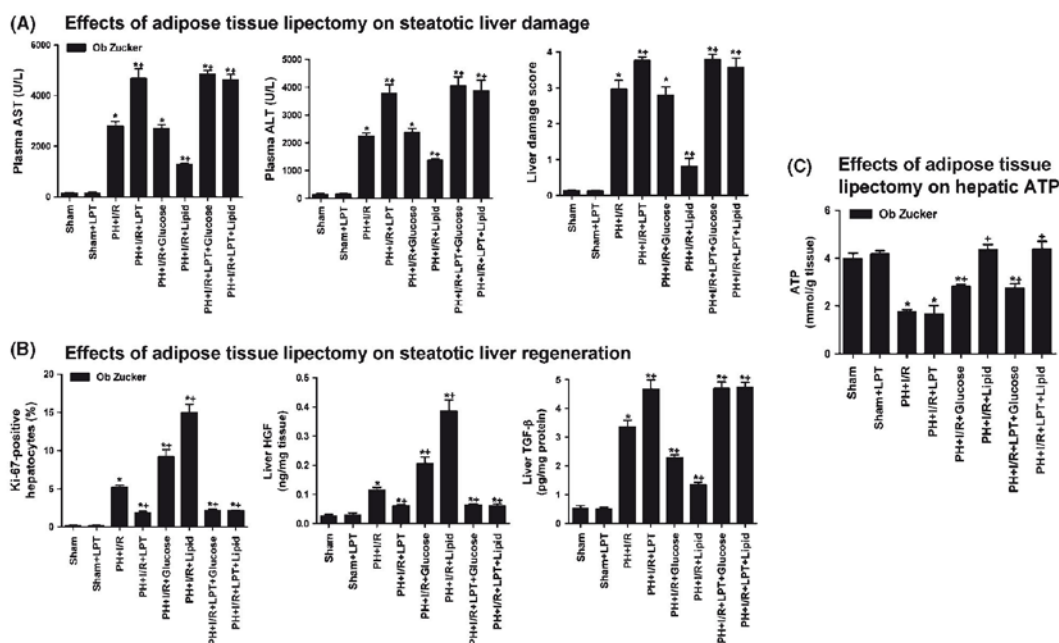


Fig. 10. Effects of lipectomy of white adipose tissue on hepatic injury and regeneration in steatotic livers. (A) Hepatic injury (AST, ALT and damage score), (B) hepatic regeneration (percentages of ki-67-positive hepatocytes, and levels of HGF and TGF- β) and (C) ATP levels at 24 h after surgery in Ob animals. Six Ob animals in each group were included for each measurement. * $P < 0.05$ vs. Sham. † $P < 0.05$ vs. PH+I/R.

group) resulted in diminished adiponectin protein levels in plasma and liver compared with the PH+I/R group, whereas hepatic mRNA adiponectin levels were unmodified (Fig. 11). In the nutritionally induced obesity model, the underlying protective mechanisms of glucose and lipids as well as the role of adipose tissue were similar to those described in the genetic obesity model (data not shown).

Discussion

The present study shows that glucose or lipid treatments after non-steatotic liver resection under I/R confer equivalent protection against hepatic damage and regenerative failure. These results contrast with previous data from non-steatotic livers undergoing PH without I/R (8–10), however, and as occurs for other treatments (33, 51–54), it should be considered that the effectiveness of strategies based in the administration of glucose and lipids on damage and regeneration could be different depending of the surgical conditions evaluated. The beneficial effects of both nutritional supports in non-steatotic livers may probably derive among other factors, from their efficient maintenance of hepatic ATP levels during regeneration. In accordance, it has been demonstrated that increased parameters of liver regeneration are proportional to the increased ATP in the

remnant liver (50). Interestingly, and contrary to what has been described in experimental models of PH without I/R (11–13), we herein show that remnant non-steatotic liver regeneration occurs independently from peripheral adipose tissue-derived energy support, thus indicating that non-steatotic livers are capable to sustain major homeostatic functions after PH under I/R.

A different scenario is observed in steatotic livers undergoing PH + I/R that could be especially relevant for the clinical practice. Glucose treatment did not protect steatotic livers against damage but improved their regeneration, however lipid treatment protected steatotic livers against damage and induced stronger liver regeneration than glucose. The influence of glucose and lipids on growth factors expression was investigated. This analysis showed that the expression of HGF was higher and TGF- β lower in steatotic livers treated with lipids, in comparison with those receiving glucose. HGF plays a central role in liver regeneration and it is currently being tested in clinical trials in patients with acute liver failure (55, 56). Interestingly, HGF mRNA is upregulated by these nutrients in the regenerating liver and HGF mRNA expression followed a similar pattern to that described for IL-6. Thus, and as previously reported (57–59), HGF up-regulation might be induced by IL-6, a critical component of the regenerative response (60, 61). To further characterize the effect of

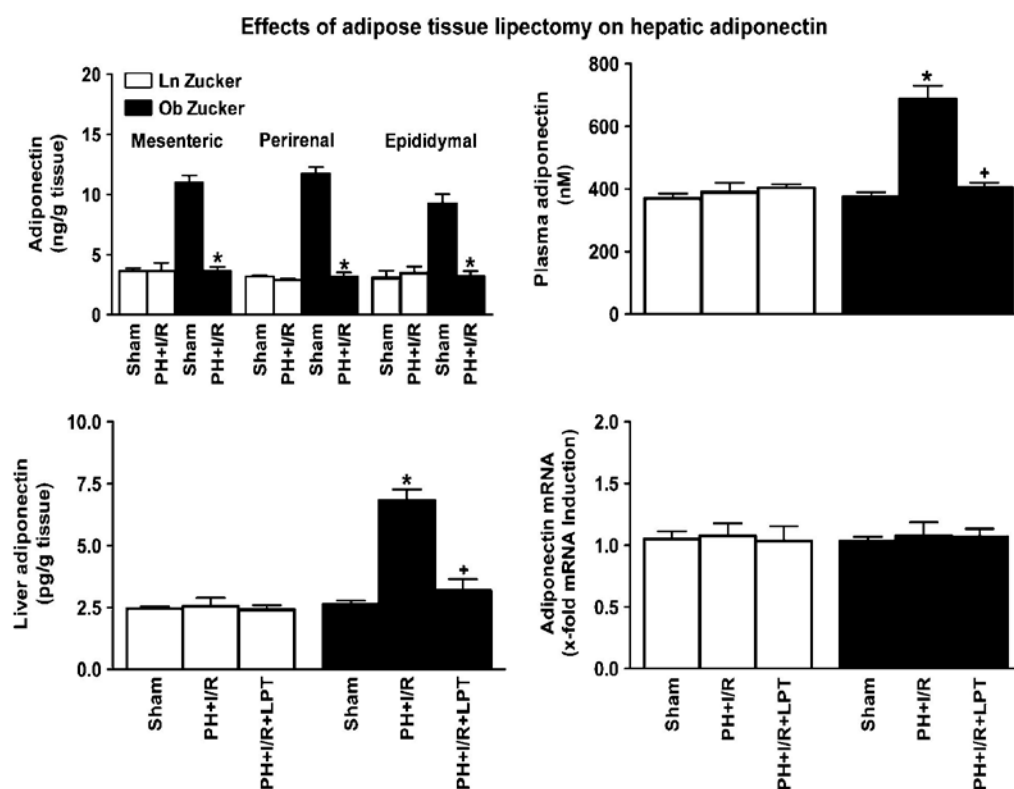


Fig. 11. Effects of lipectomy of white adipose tissue on adiponectin in steatotic livers. Adiponectin levels at 24 h after liver surgery in Ob animals. Six Ln and six Ob animals in each group were included for each measurement. * $P < 0.05$ vs. Sham. + $P < 0.05$ vs. PH+I/R.

glucose and lipids on regeneration, cyclin expression was examined in steatotic livers. It is well-known that the signalling events that characterize the hepatic regenerative response culminate in cyclin-dependent hepatocyte re-entry into, and progression through, the cell cycle (62). As part of this process, hepatocellular cyclin E expression is induced during G1 and mediate transition into S phase (46), whereas cyclin A is necessary for S phase progression (47). Analysis of cyclins indicated that the higher benefits of lipids on regeneration were associated with a differential pattern in the expression of cyclins. Indeed, the peak in the expression of cyclin E in steatotic livers treated with lipids occurred at early reperfusion times (12 h after liver surgery) compared with glucose treatment (24 h after liver surgery). Also, cyclin A expression was higher in steatotic livers treated with lipids at all reperfusion times. Given these observations into account, lipid treatment seems to be more efficient in accelerating regeneration of steatotic livers, specifically during G1 and S phase of the cell cycle, thus before and during hepatocellular DNA synthesis.

In the presence of hepatic steatosis, lipid treatment conferred stronger protection against damage and regenerative failure and increased more ATP than

glucose. Thus, treatment with lipids rather than with glucose may be the preferred protective strategy for steatotic livers in conditions of PH under I/R. Herein, we show that the role of adipose tissue in hepatic damage and regeneration depends on the type of the liver. Our results indicate that in contrast with non-steatotic livers, lack of adipose tissue was detrimental for Ob animals since the remnant steatotic liver require adipose tissue for its regeneration in conditions of PH under I/R. However, adipose tissue does not seem to be used as an energy source by the steatotic liver. Indeed, lipectomy of white adipose tissue in untreated Ob animals undergoing PH under I/R exacerbated liver damage and impaired regeneration following surgery but did not induce changes in ATP levels. In addition, when adipose tissue was removed, the beneficial effects of either glucose or lipids on damage and regeneration in steatotic livers disappeared but ATP levels were not modified. Given our results, the requirement of systemic adipose stores during regeneration of steatotic livers might be based on the role of adipose tissue as source of different hormones such as adiponectin, which are essential signals for liver regeneration. Indeed, adiponectin accumulation in the steatotic liver after PH+I/R was not

observed when adipose tissue was removed. Nevertheless, the role of adipose tissue as a lipid precursor for new membrane synthesis should not be discarded.

To understand why lipids rather than glucose are better source of energy for the regenerating steatotic liver in conditions of PH under I/R, the following data should be considered. It has been repeatedly demonstrated that the regenerating liver primarily obtains ATP by the oxidation of fatty acids (63). Lipid droplets present in steatotic livers might be used to supply the energy needed by remaining hepatocytes to rebuild the liver (48, 49). Thus, administering a lipid emulsion could also fuel ATP synthesis. Moreover, β -oxidation of fatty acids from lipid droplets present in the steatotic livers could negatively affect the effective use of exogenous glucose for ATP synthesis. Indeed, enhancement of fatty acids β -oxidation within the liver results in the production of reducing equivalents (NADH) and acetyl-coenzyme A, which will reduce the mitochondrial redox potential, prevent the entrance of pyruvate into the Krebs cycle and ultimately inhibit glucose oxidation (64).

To explain the stronger protection induced by lipids in steatotic livers in comparison with that afforded by glucose treatment, it should be considered not only the higher hepatic ATP levels recorded in steatotic livers treated with lipids, but also the fact that glucose treatment increased hepatic CER levels and reduced SIP/ceramide ratio when compared with lipid treatment. The important role of CER in the pathogenesis of insulin resistance and other obesity-associated metabolic disorders has been reported (65–69). Importantly, the presence of CER and reduced SIP/CER ratio favours hepatic damage and might negatively affect the regeneration process (16, 70, 71). Indeed, in cultured cells it has been reported that CER affect cyclin A expression, induce arrest in the G₀/G₁ phase of the cell cycle (72, 73), and reduce c-Myc expression, a nuclear phosphoprotein that has an important role in the progression of cells through the different phases of the cell cycle (74). Moreover, it should be considered that in contrast to glucose treatment, lipids increased phospholipids in steatotic livers, which are a major component of cell membranes, thus maintaining structural integrity between the cell and its environment. Some types of phospholipids can be split to produce products that function as second messengers in signal transduction and also intervene in prostaglandin signal pathways (75, 76). Although glucose is routinely used to treat postoperative hypoglycaemia in patients following hepatic resection (8), its contribution to liver damage and regeneration remains unclear. Herein, we reported that both lipid and glucose infusion might increase the regenerating capacity of non-steatotic livers. In the presence of steatosis, lipids rather than carbohydrate are more efficient in regenerating the remnant liver after surgery. Importantly, and although some patients suffering from liver disease display severe maldigestion and

malabsorption of lipids, which contraindicate their administration by an enteral route (64), the intravenous administration of lipid emulsions may resolve this issue. However, before its parenteral clinical use in liver surgery, some considerations should be taken into account. The lipid cocktail might increase free fatty acids, which are known to have hepatotoxic effects (77–79). Thus, deaths in infants following parenteral lipid infusion have been reported, especially in premature infants, because of the low concentrations of lipoprotein lipase in these infants, which result in lower clearance of intravenous lipid emulsion and increased free fatty acid plasma concentrations (78, 79). These events are primarily associated with the dose used and the long-term administration of intravenous lipid emulsion. Therefore, lipid concentrations should be closely monitored in patients receiving intravenous lipid emulsion who are at high risk for hypertriglyceridaemia. By taking these precautions, clinicians can substantially reduce the risk of adverse effects in patients receiving intravenous lipid emulsion (78, 79). Finally, our results suggest that strategies based in the reduction or abolition of peripheral adipose tissue might be detrimental in surgical conditions requiring liver regeneration in the presence of steatosis, including partial resection and transplantation of small-for-size liver grafts.

Acknowledgements

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

Conflict of interest: The authors do not have any disclosures to report.

References

1. Man K, Fan ST, Ng IO, *et al.* Prospective evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study. *Ann Surg* 1997; **226**: 704–11.
2. Dixon E, Vollmer CM Jr, Bathe OF, Sutherland F. Vascular occlusion to decrease blood loss during hepatic resection. *Am J Surg* 2005; **190**: 75–86.
3. Veteläinen R, van Vliet A, Gouma DJ, van Gulik TM. Steatosis as a risk factor in liver surgery. *Ann Surg* 2007; **245**: 20–30.
4. McCormack L, Petrowsky H, Jochum W, Furrer K, Clavien PA. Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann Surg* 2007; **245**: 923–30.
5. Elias-Miro M, Massip-Salcedo M, Jimenez-Castro M, Peralta C. Does adiponectin benefit steatotic liver transplantation? *Liver Transpl* 2011; **17**: 993–1004.
6. Wree A, Kahraman A, Gerken G, Canbay A. Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion* 2011; **83**: 124–33.

7. Nocito A, El-Badry AM, Clavien PA. When is steatosis too much for transplantation? *J Hepatol* 2006; **45**: 494–9.
8. Caruana JA, Whalen DA Jr, Anthony WP, Sunby CR, Ciechoski MP. Paradoxical effects of glucose feeding on liver regeneration and survival after partial hepatectomy. *Endocr Res* 1986; **12**: 147–56.
9. Nakatani T, Yasuda K, Ozawa K, Kawashima S, Tobe T. Effects of (+)-octanoylcarnitine on deoxyribonucleic acid synthesis in regenerating rabbit liver. *Clin Sci (Lond)* 1982; **62**: 295–7.
10. Nakatani T, Ozawa K, Asano M, et al. Differences in predominant energy substrate in relation to the resected hepatic mass in the phase immediately after hepatectomy. *J Lab Clin Med* 1981; **97**: 887–98.
11. Tjiburg LB, Nyathi CB, Meijer GW, Geelen MJ. Biosynthesis and secretion of triacylglycerol in rat liver after partial hepatectomy. *Biochem J* 1991; **277**: 723–8.
12. Brasaemle DL. Cell biology. A metabolic push to proliferate. *Science* 2006; **313**: 1581–2.
13. Gazit V, Weymann A, Hartman E, et al. Liver regeneration is impaired in lipodystrophic fatty liver dystrophy mice. *Hepatology* 2010; **52**: 2109–17.
14. Baker N, Garfinkel AS, Schotz MC. Hepatic triglyceride secretion in relation to lipogenesis and free fatty acid mobilization in fasted and glucose-refed rats. *J Lipid Res* 1968; **9**: 1–7.
15. Zabielski P, Baranowski M, Blachnio-Zabielska A, Zendzian-Piotrowska M, Górski J. The effect of high-fat diet on the sphingolipid pathway of signal transduction in regenerating rat liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2010; **93**: 75–83.
16. Zabielski P, Baranowski M, Zendzian-Piotrowska M, Blachnio-Zabielska A, Górski J. Bezafibrate decreases growth stimulatory action of the sphingomyelin signaling pathway in regenerating rat liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2008; **85**: 17–25.
17. Véret J, Coant N, Berdyshev EV, et al. Ceramide synthase 4 and de novo production of ceramides with specific N-acyl chain lengths are involved in glucolipotoxicity-induced apoptosis of INS-1 β -cells. *Biochem J* 2011; **438**: 177–89.
18. Blachnio-Zabielska A, Baranowski M, Zabielski P, Gorski J. Effect of high fat diet enriched with unsaturated and diet rich in saturated fatty acids on sphingolipid metabolism in rat skeletal muscle. *J Cell Physiol* 2010; **225**: 786–91.
19. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; **116**: 3015–25.
20. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, et al. Role of the Toll-like receptor 4/NF- κ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 84–91.
21. Sachithanandan N, Graham KL, Galic S, et al. Macrophage deletion of SCOS1 increases sensitivity to LPS and palmitic acid and results in systemic inflammation and hepatic insulin resistance. *Diabetes* 2011; **60**: 2023–31.
22. Campbell JS, Riehle KJ, Brooling JT, et al. Proinflammatory cytokine production in liver regeneration is Myd88-dependent, but independent of Cd14, Tlr2, and Tlr4. *J Immunol* 2006; **176**: 2522–8.
23. Jiménez-Castro MB, Elias-Miró M, Mendes-Braz M, et al. Tauroursodeoxycholic acid affects PPAR γ and TLR4 in Steatotic liver transplantation. *Am J Transplant* 2012; **12**: 3257–71.
24. Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, et al. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 2001; **33**: 808–15.
25. Selzner M, Camargo CA, Clavien PA. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6. *Hepatology* 1999; **30**: 469–75.
26. Elias-Miró M, Massip-Salcedo M, Raila J, et al. Retinol binding protein 4 and retinol in steatotic and nonsteatotic rat livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia/reperfusion. *Liver Transpl* 2012; **18**: 1198–208.
27. Holecek M, Simek J. Different effects of glucose and intralipid on the onset of liver regeneration in the early period after partial hepatectomy in the rat. *Exp Pathol* 1988; **33**: 257–60.
28. Goetze O, Steingoetter A, Menne D, et al. The effect of macronutrients on gastric volume responses and gastric emptying in humans: a magnetic resonance imaging study. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; **292**: G11–7.
29. Eldor J, Kotlovker V. Intralipid treatment: Is it only the tip of an iceberg? A new suggestion: Bone cement implantation syndrome (BCIS). *J Anesthesiol Clin Sci* 2012; **1**: 1–7.
30. 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**: 512–20.
31. Shi H, Strader AD, Woods SC, Seeley RJ. Sexually dimorphic responses to fatloss after caloric restriction or surgical lipectomy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; **293**: E316–26.
32. Simek J, Mělka J, Pospíšil M, Neradilková M. Effect of protracted glucose infusion on the development of early biochemical changes and initiation of regeneration in rat liver after partial hepatectomy. *Physiol Bohemoslov* 1965; **14**: 366–70.
33. Ramalho FS, Alfany-Fernandez I, Casillas-Ramirez A, et al. 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**: 130–40.
34. Tacchini I, Cairo G, De Ponti C, et al. Up regulation of IL-6 by ischemic preconditioning in normal and fatty rat livers: Associated with reduction of oxidative stress. *Free Radic Res* 2006; **40**: 1206–17.
35. Serafin A, Roselló-Catafau J, Prats N, et al. Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion. *Hepatology* 2004; **39**: 688–98.
36. Massip-Salcedo M, Zaouali MA, Padriša-Altés S, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α inhibits the injurious effects of adiponectin in rat steatotic liver undergoing ischemia-reperfusion. *Hepatology* 2008; **47**: 461–72.
37. Miguel-Carrasco JL, Zambrano S, Blanca AJ, Mate A, Vázquez CM. Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF- κ B. *J Inflamm* 2010; **7**: 21–30.

38. Fausto N, Laird AD, Webber EM. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. Liver regeneration. *FASEB J* 1995; **9**: 1527–36.
39. Kamisoyama H, Honda K, Tominaga Y, Yokota S, Hasegawa S. Investigation of the anti-obesity action of licorice flavonoid oil in diet-induced obese rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; **72**: 3225–31.
40. Reddy RR, Srinivasan K. Dietary fenugreek and onion attenuate cholesterol gallstone formation in lithogenic diet-fed mice. *Int J Exp Pathol* 2011; **92**: 308–19.
41. Newberry EP, Xie Y, Kennedy S, et al. Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid-binding protein gene. *J Biol Chem* 2003; **278**: 51664–72.
42. Japtok L, Schaper K, Bäumer W, et al. Sphingosine 1-phosphate modulates antigen capture by murine Langerhans cells via the S1P2 receptor subtype. *PLoS ONE* 2012; **7**: e49427.
43. Bhabak KP, Kleuser B, Huwiler A, Arenz C. Effective inhibition of acid and neutral ceramidases by novel B-13 and LCL-464 analogues. *Bioorg Med Chem* 2013; **21**: 874–82.
44. Sekine S, Gutiérrez PJ, Lan BY, Feng S, Hebrok M. Liver-specific loss of beta-catenin results in delayed hepatocyte proliferation after partial hepatectomy. *Hepatology* 2007; **45**: 361–8.
45. Duval H, Mbatchi SF, Grandadam S, et al. Reperfusion stress induced during intermittent selective clamping accelerates rat liver regeneration through JNK pathway. *J Hepatol* 2010; **52**: 560–9.
46. 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 USA* 2009; **106**: 11960–5.
47. Desdouets C, Thoresen GH, Senamaud-Beaufort C, et al. cAMP-dependent positive control of cyclin A2 expression during G1/S transition in primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **261**: 118–22.
48. Ezaki H, Yoshida Y, Saji Y, et al. Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adiponectin knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **378**: 68–72.
49. Fernández MA, Albor C, Ingelmo-Torres M, et al. Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science* 2006; **313**: 1628–32.
50. Man K, Zhao Y, Xu A, et al. Fat-derived hormone adiponectin combined with FTY720 significantly improves small-for-size fatty liver graft survival. *Am J Transplant* 2006; **6**: 467–76.
51. 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.
52. Rai RM, Yang SQ, McClain C, et al. Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Am J Physiol* 1996; **270**: G909–18.
53. Suzuki S, Nakamura S, Sakaguchi T, et al. Alteration of reticuloendothelial phagocytic function and tumor necrosis factor- α production after total hepatic ischemia. *Transplantation* 1997; **64**: 821–7.
54. 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.
55. Ido A, Moriuchi A, Marusawa H, et al. Translational research on HGF: A phase I/II study of recombinant human HGF for the treatment of fulminant hepatic failure. *Hepatol Res* 2008; **38**: S88–92.
56. Ido A, Moriuchi A, Numata M, et al. Safety and pharmacokinetics of recombinant human hepatocyte growth factor (Rh-HGF) in patients with fulminant hepatitis: a phase I/II clinical trial, following preclinical studies to ensure safety. *J Transl Med* 2011; **9**: 55.
57. Kang LI, Mars WM, Michalopoulos GK. Signals and cells involved in regulating liver regeneration. *Cells* 2012; **1**: 1261–92.
58. Kariv R, Enden A, Zvibel I, et al. Triiodothyronine and interleukin-6 (IL-6) induce expression of HGF in an immortalized rat hepatic stellate cell line. *Liver Int* 2003; **23**: 187–93.
59. Sun R, Jaruga B, Kulkarni S, Sun H, Gao B. IL-6 modulates hepatocyte proliferation via induction of HGF/p21^{clp1}. Regulation by SOCS3. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **338**: 1943–9.
60. Hortelano S, Zeini M, Casado M, Martín-Sanz P, Boscá L. Animal models for the study of liver regeneration: role of nitric oxide and prostaglandins. *Front Biosci* 2007; **12**: 13–21.
61. Zimmers TA, McKillop IH, Pierce RH, Yoo JY, Koniaris LG. Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. *Hepatology* 2003; **38**: 326–34.
62. Weymann A, Hartman E, Gazit V, et al. p21 is required for dextrose-mediated inhibition of mouse liver regeneration. *Hepatology* 2009; **50**: 207–15.
63. Anderson SP, Yoon L, Richard EB, et al. Delayed liver regeneration in peroxisome proliferator-activated receptor- α -null mice. *Hepatology* 2002; **36**: 544–54.
64. Holecek M. Nutritional modulation of liver regeneration by carbohydrates, lipids, and amino acids: a review. *Nutrition* 1999; **15**: 784–8.
65. Jornayvaz FR, Birkenfeld AL, Jurczak MJ, et al. Hepatic insulin resistance in mice hepatic overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2. *PNAS* 2011; **108**: 5748–52.
66. Ussher JR, Koves TR, Cadete VJ, et al. Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes* 2010; **59**: 2453–64.
67. Stienstra R, Saudale F, Duval C, et al. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1- β -dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor α activity. *Hepatology* 2010; **51**: 511–22.
68. Longato L, Tong M, Wands JR, de la Monte SM. High fat diet induced hepatic steatosis and insulin resistance: role of dysregulated ceramide metabolism. *Hepatol Res* 2012; **42**: 412–27.
69. Promrat K, Longato L, Wands JR, de la Monte SM. Weight loss amelioration of non-alcoholic steatohepatitis linked to shifts in hepatic ceramide expression and serum ceramide levels. *Hepatol Res* 2011; **41**: 754–62.
70. Zabielski P, Blachnio-Zabielska A, Baranowski M, Zendzian-Piotrowska M, Gorski J. Activation of PPAR α by bezafibrate negatively affects *de novo* synthesis of

- sphingolipids in regenerating rat liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2010; **93**: 120–5.
71. Alkhoury N, Dixon LJ, Feldstein AE. Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; **3**: 445–51.
 72. Jayadev S, Liu B, Bielawska AE, *et al.* Role for ceramide in cell cycle arrest. *J Biol Chem* 1995; **270**: 2047–52.
 73. Dbaibo GS, Pushkareva MY, Jayadev S, *et al.* Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 1347–51.
 74. Alesse E, Zazzeroni F, Angelucci A, *et al.* The growth arrest and downregulation of c-myc transcription induced by ceramide are related events dependent on p21 induction, Rb underphosphorylation and E2F sequestering. *Cell Death Differ* 1998; **5**: 381–9.
 75. Cohn JS, Wat E, Kamili A, Tandy S. Dietary phospholipids, hepatic lipid metabolism and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2008; **19**: 257–62.
 76. Küllenberg D, Taylor LA, Schneider M, Massing U. Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis* 2012; **55**: 3.
 77. Haus JM, Kashyap SR, Kasumov T, *et al.* Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes* 2009; **58**: 337–43.
 78. Mirtallo JM, Dasta JF, Kleinschmidt KC, Varon J. State of the art review: Intravenous fat emulsions: current applications, safety profile, and clinical implications. *Ann Pharmacother* 2012; **44**: 688–700.
 79. Postuma R, Trevenen CL. Liver disease in infants receiving total parenteral nutrition. *Pediatrics* 1979; **63**: 110–5.

2. Estudio 2

Resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers in
the setting of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion

Maria Elias-Miró*, Mariana Mendes-Braz*, Ruben Cereijo, Francesc Villarroya, Monica B. Jimenez-Castro, Jordi Gracia-Sancho, Sergi Guixe-Muntet, Marta Massip-Salcedo, Joan Carles Domingo, Raquel Bermudo, Juan Rodes, Carmen Peralta.

*Ambos autores contribuyeron de la misma forma al presente trabajo

Journal of Hepatology. 2014; 60(1):87-95

Objetivos: Este estudio analizó si la modulación farmacológica de la acción de la resistina y visfatina podrían reducir el daño y mejorar la regeneración en hígados esteatósicos y no esteatósicos sometidos a la PH bajo I/R. **Métodos:** Los hígados esteatósicos y no esteatósicos fueron sometidos a PH bajo I/R y tratados farmacológicamente con inhibidores o activadores de la acción de la resistina y visfatina. **Resultados:** Ni la resistina ni la visfatina están implicadas en la lesión y regeneración en hígados no esteatósicos sometidos a PH bajo oclusión vascular. Sin embargo, tras la cirugía hepática de los animales obesos, se observó un aumento de los niveles de resistina en el hígado esteatósico y en el plasma, sin cambios de esta adipocitoquina en el tejido adiposo. En tales condiciones se observó una reducción en la expresión de visfatina en el hígado esteatósico y niveles elevados de visfatina en el plasma y en el tejido adiposo. Nuestros resultados indicaron que la resistina endógena mantiene bajos los niveles de visfatina en el hígado porque inhibe la recaptación de visfatina desde la circulación sistémica al hígado, regulando así los efectos perjudiciales de esta adipocitoquina en la lesión y regeneración. De hecho, la administración de anticuerpos anti-resistina aumentó la acumulación hepática de visfatina derivada de los adipocitos, lo que agravó el daño hepático y el fallo regenerativo en hígados esteatósicos. El tratamiento con anticuerpos anti-visfatina protegió el hígado esteatósico y similares resultados se obtuvieron cuando se inhibieron simultáneamente la resistina y la visfatina. Por consiguiente, al inhibir la visfatina, los efectos perjudiciales de los anticuerpos anti-resistina desaparecieron. En el presente estudio se ha evidenciado que la regulación positiva de la visfatina aumenta los niveles de NAD en el hígados esteatósico remanente tras la cirugía, mientras que la inhibición de la visfatina redujo tales niveles. La visfatina puede favorecer la síntesis de NAD en lugar de DNA e

inducir alteraciones en el metabolismo de aminoácidos-ciclo de la urea y la producción de NO, lo cual influencia negativamente la viabilidad del hígado esteatósico. **Conclusiones:** Nuestros resultados indican el potencial clínico de terapias basadas en el bloqueo de la visfatina en hígados esteatósicos sometidos a la PH bajo I/R.



Resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion

Maria Elias-Miró^{1,†}, Mariana Mendes-Braz^{1,2,†}, Ruben Cereijo³, Francesc Villarroya³, Mónica B. Jiménez-Castro¹, Jordi Gracia-Sancho⁴, Sergi Guixé-Muntet⁴, Marta Massip-Salcedo¹, Joan Carles Domingo⁵, Raquel Bermudo⁶, Juan Rodés^{1,7}, Carmen 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; ²Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil; ³Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, i Institut de Biomedicina, Universitat de Barcelona, CIBER Fisopatologia de la Obesidad y Nutrición, Spain; ⁴Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain; ⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Spain; ⁶Tumour Bank, IDIBAPS, Barcelona, Spain; ⁷Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Background & Aims: This study examined whether the regulation of resistin and visfatin could reduce damage and improve regeneration in both steatotic and non-steatotic livers undergoing partial hepatectomy under ischemia-reperfusion, a procedure commonly applied in clinical practice to reduce bleeding.

Methods: Resistin and visfatin were pharmacologically modulated in lean and obese animals undergoing partial hepatectomy under ischemia-reperfusion.

Results: No evident role for these adipocytokines was observed in non-steatotic livers. However, obese animals undergoing liver surgery showed increased resistin in liver and plasma, without changes in adipose tissue, together with visfatin downregulation in liver and increment in plasma and adipose tissue. Endogenous resistin maintains low levels of visfatin in the liver by blocking its hepatic uptake from the circulation, thus regulating the visfatin detrimental effects on hepatic damage and regenerative failure. Indeed, the administration of anti-resistin antibodies increased hepatic accumulation of adipocyte-derived visfatin, exacerbating damage and regenerative failure. Interestingly, treatment with

anti-visfatin antibodies protected steatotic livers, and similar results were obtained with the concomitant inhibition of resistin and visfatin. Thus, when visfatin was inhibited, the injurious effects of anti-resistin antibodies disappeared. Herein we show that upregulation of visfatin increased NAD levels in the remnant steatotic liver, whereas visfatin inhibition decreased them. These later observations suggest that visfatin may favour synthesis of NAD instead of DNA and induces alterations in amino acid metabolism-urea cycle and NO production, overall negatively affecting liver viability.

Conclusions: Our results indicate the clinical potential of visfatin blocking-based therapies in steatotic livers undergoing partial hepatectomy with ischemia-reperfusion.

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

Keywords: Liver surgery; Hepatic steatosis; Regeneration; Resection; Adipocytokines; Ischemia-reperfusion.

Received 27 March 2013; received in revised form 28 June 2013; accepted 18 July 2013; available online 19 August 2013

* Corresponding author. Address: Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Esther Koplowitz Center, Roselló 149-153, 3rd floor, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275400x4177; fax: +34 933129406.

E-mail address: cperalta@clinic.ub.es (C. Peralta).

† These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: PH, partial hepatectomy; I/R, ischemia-reperfusion; Nampt, nicotinamide phosphoribosyltransferase; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; Ob, obese; Ln, lean; BrdU, bromodeoxyuridine; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; HGF, hepatocyte growth factor; TGF, transforming growth factor; MPO, myeloperoxidase; MDA, malondialdehyde; LDL, Low-density lipoprotein; VLDL, very-low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; GDH, glutamate dehydrogenase; CPT2, carnitine palmytoyl transferase-2; MCAD, medium chain acyl-CoA dehydrogenase; FGF21, fibroblast growth factor-21; SOD2, superoxide dismutase-2; GPX1, glutathione peroxidase-1; SCD1, stearoyl-CoA desaturase-1; FAS, fatty acid synthase; COXI, cytochrome c oxidase subunit I; COXIV, cytochrome c oxidase subunit IV.

Introduction

In clinical situations, partial hepatectomy (PH) under ischemia-reperfusion (I/R) is usually performed to control bleeding during parenchymal dissection [1]. More than 20% of patients coming to liver resection have some degree of steatosis, usually related to obesity [2,3]. Hepatic steatosis is a major risk factor for liver surgery since it is associated with an increased complication index and postoperative mortality after major liver resection [4].

Under pathological conditions, adipose tissue has appeared as a highly active endocrine gland, secreting adipocytokines such as resistin and visfatin [5]. However, resistin and visfatin are also expressed in liver under obesity conditions and during fibrosis [6,7].

Increased levels of resistin have been reported in patients with cirrhosis, correlating with the severity of the disease [5,8]. Opposite effects of resistin on myocardial injury have been reported [9].

Visfatin, also known as nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt), is critical for the synthesis of nicotinamide adenine



Research Article

dinucleotide (NAD) [10]. Interestingly, a potential role for visfatin in the pathogenesis and progression of non-alcoholic fatty liver disease has been reported [11]. Circulating visfatin levels are increased in inflammatory disorders [12] and its inhibition decreases several pro-inflammatory cytokines in cultured cells and during endotoxemia [13]. However, there are conflicting results regarding the role of visfatin since other reports indicate that elevated levels of visfatin in obesity have hepatoprotective effects [14], or even are not associated with inflammation [15]. Moreover, it is unclear if visfatin exerts its actions through the modulation of pro-inflammatory cytokine and/or its NAD biosynthetic activity [16,17].

Considering the current knowledge, we herein examined the generation of resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers undergoing PH under I/R. We also characterized adipose tissue as predominant source of both adipocytokines in PH under I/R. Finally, we investigated whether modulating resistin and/or visfatin could protect steatotic and non-steatotic livers against damage and regenerative failure following PH under I/R.

Materials and methods

Experimental animals

Male homozygous obese (*Ob*) (400–450 g) and heterozygous lean (*Ln*) Zucker rats (350–400 g) and male Wistar rats (200–220 g), fed with a choline-deficient or standard chow diet for 10 days [18], were used. *Ob* Zucker and *Ob* Wistar rats showed severe macrovesicular and microvesicular fatty infiltration in hepatocytes (60–70% steatosis). All procedures were performed under isoflurane anesthesia. This study complied with European Union regulations on animal experiments.

Surgical procedure

The experiments in this study employed experimental models of partial (70%) hepatectomy with or without 60 min of ischemia, as well as 60 min of ischemia without hepatectomy [4,19]. Samples were collected 24 h after completion of the surgical procedure. The experimental groups based on the pharmacological modulation of visfatin and/or resistin, and the different biochemical and molecular analyses are described in [Supplementary Materials and methods](#).

Results

Resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers from Zucker rats undergoing PH + I/R

In *Ln* Zucker animals, resistin and visfatin levels in liver, plasma and adipose tissue of the PH + I/R group were similar to those found in the Sham group (Fig. 1A). This is consistent with the finding that pharmacological modulation of either resistin or visfatin (administering these adipocytokines separately or using antibodies against each cytokine) in *Ln* animals undergoing PH + I/R did not induce changes in either hepatic damage or liver regeneration parameters (data not shown).

In *Ob* Zucker animals, plasmatic and hepatic resistin mRNA and protein levels of the PH + I/R group were higher than in the Sham group (Fig. 1A), whereas resistin levels in adipose tissue were unmodified. In addition, a reduction in visfatin mRNA and protein levels was observed in steatotic livers of the PH + I/R group compared with sham, whereas visfatin levels in plasma and adipose tissue were increased.

Relevance of resistin and visfatin on hepatic damage and regenerative failure in steatotic livers from Zucker rats undergoing PH + I/R

Administration of anti-resistin antibodies (PH + I/R + anti-resistin group) resulted in hepatic damage exacerbation, an increase in transaminase levels, damage score values and the extension of necrosis areas compared with the PH + I/R group (Fig. 1B and [Supplementary Fig. 1A](#)). The number of Ki-67-positive hepatocytes (Fig. 1B and [Supplementary Fig. 1B](#)), BrdU-positive hepatocytes (Fig. 1B) and mitotic index (data not shown) in the PH + I/R + anti-resistin group were significantly lower than in the PH + I/R group. This decrease in proliferative cells was associated with low HGF and high levels of active TGF- β (Fig. 1B).

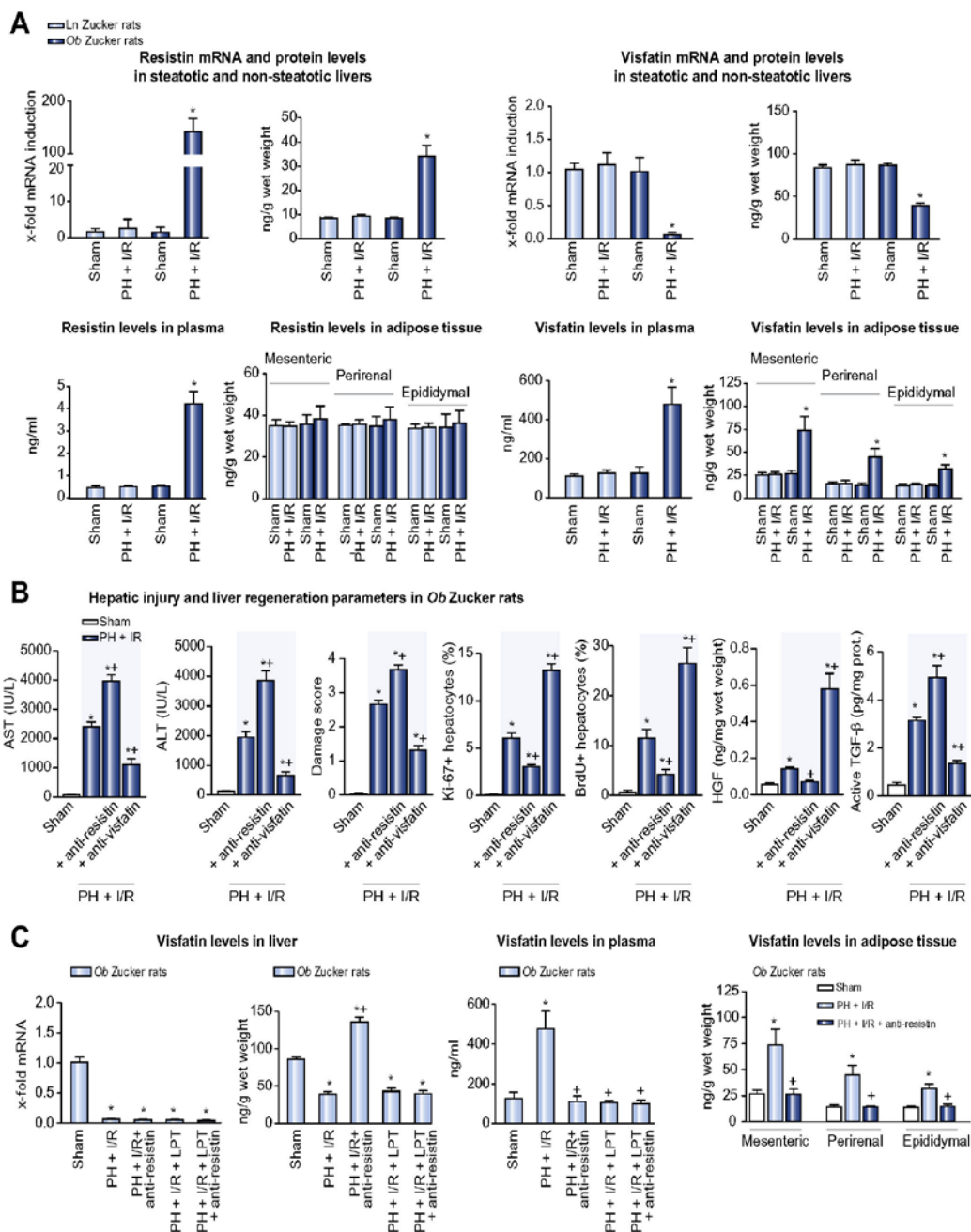
Administration of anti-visfatin antibodies (PH + I/R + anti-visfatin group) protected steatotic livers as indicated by the reduction in transaminases, number and extent of necrotic areas and damage score values compared with the PH + I/R group (Fig. 1B and [Supplementary Fig. 1A](#)). PH + I/R + anti-visfatin increased percentages of Ki-67-positive hepatocytes and BrdU-positive hepatocytes (Fig. 1B and [Supplementary Fig. 1B](#)) and mitotic index (data not shown) in steatotic livers compared with the PH + I/R group. This improvement was associated with high HGF and low TGF- β levels.

Relation between resistin and visfatin in steatotic livers from Zucker rats undergoing PH + I/R

Fig. 1C shows that endogenous resistin does not modify the hepatic generation of visfatin but prevents its accumulation in the liver from the circulation. Indeed, anti-resistin antibody administration (PH + I/R + anti-resistin group) did not induce changes in the hepatic mRNA levels of visfatin but increased protein levels of visfatin in steatotic livers. Visfatin accumulation was associated with a decrease in visfatin levels in both adipose tissue and plasma compared with the PH + I/R group (Fig. 1C). Removal of adipose tissue in *Ob* animals by surgical interventions (PH + I/R + LPT group) resulted in diminished visfatin levels in plasma compared with the PH + I/R group. In addition, visfatin accumulation in steatotic livers after resistin antibody administration (PH + I/R + anti-resistin group) was not observed when adipose tissue was removed (PH + I/R + LPT + anti-resistin group). Analysis of intrahepatic localization of visfatin demonstrated that it is mainly expressed in hepatocytes, whereas non-apparent immunoreactivity for visfatin was confined to sinusoids and hepatic vessels ([Supplementary Fig. 2](#)). Visfatin staining was less evident in steatotic livers of the PH + I/R group compared with the Sham group. However, a more robust visfatin expression in hepatocytes was observed in steatotic livers of PH + I/R + anti-resistin and PH + I/R + visfatin groups when compared with the Sham of PH + I/R groups. Moreover, visfatin was mainly accumulated in hepatocytes of sham-operated *Ob* livers after visfatin administration (data not shown).

Effects of visfatin accumulation on damage and regeneration in steatotic livers from Zucker rats undergoing PH + I/R

Exogenous visfatin was administered to achieve hepatic visfatin protein levels comparable to the PH + I/R + anti-resistin group. Visfatin administration (PH + I/R + visfatin group) significantly exacerbated hepatic injury compared with the PH + I/R group



Liver Failure and Growth

Fig. 1. Resistin and visfatin in Ln and Ob Zucker rats undergoing PH + I/R. (A) Resistin and visfatin levels in liver, plasma and mesenteric, perirenal and epididymal adipose tissue, (B) hepatic injury and regeneration and (C) visfatin levels after lipectomy of adipose tissue. Six Ln and six Ob animals from each group in each measurement. **p* < 0.05 vs. sham; ***p* < 0.05 vs. PH + I/R.

(Fig. 2A and Supplementary Fig. 1A). The number of Ki-67-positive hepatocytes, BrdU-positive hepatocytes (Fig. 2A and Supplementary Fig. 1B) and the mitotic index (data not shown) were

lower in the PH + I/R + visfatin group than in the PH + I/R group. This decrease in proliferative cells was associated with low HGF and high TGF-β (Fig. 2A). The pernicious role of visfatin on liver

Research Article

Liver Failure and Growth

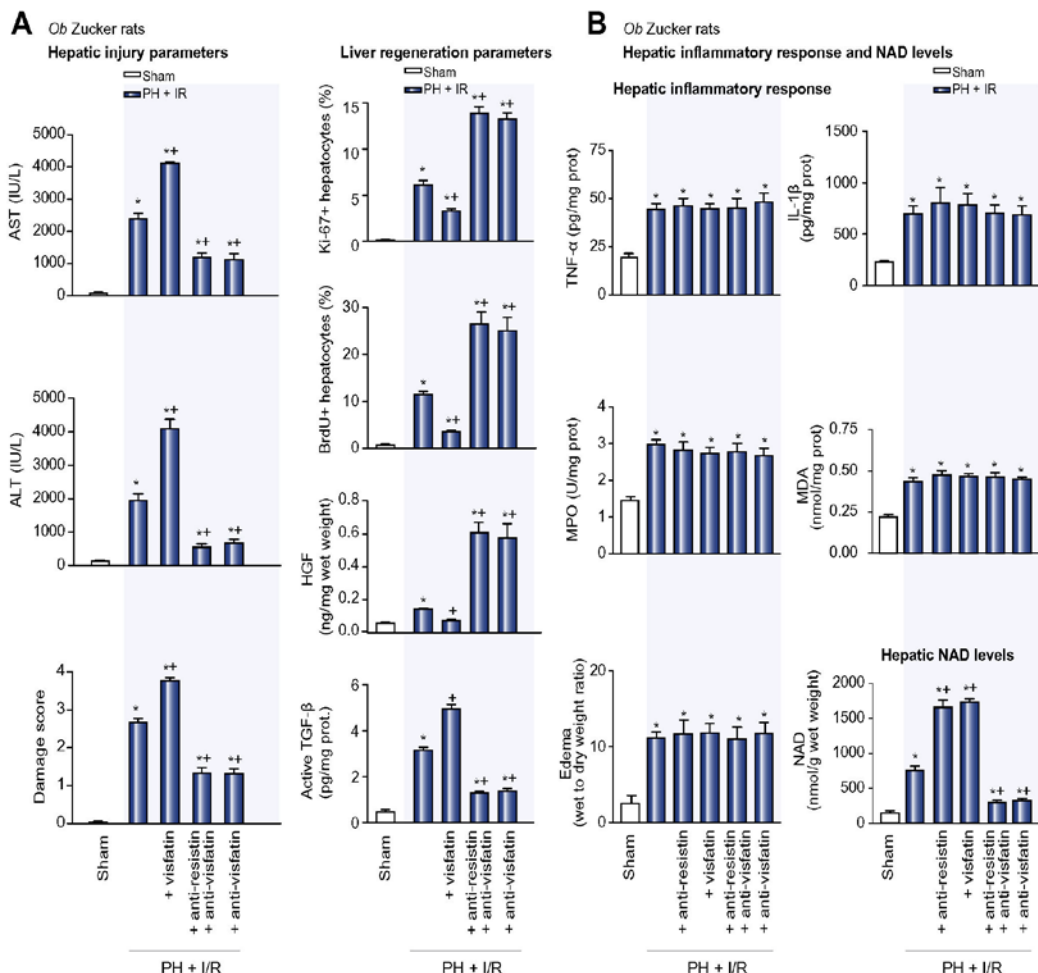


Fig. 2. Effects of visfatin inhibition induced by resistin on hepatic injury, regeneration, inflammatory response and NAD levels in *Ob Zucker* rats undergoing PH + I/R. (A) Hepatic injury and regeneration and (B) hepatic inflammatory response and NAD levels. Six *Ob* animals from each group were included for each measurement. **p* <0.05 vs. sham; ***p* <0.05 vs. PH + I/R.

viability after PH + I/R was further analysed studying liver injury and regeneration in a group of animals with elevated hepatic visfatin but inhibited visfatin-downstream pathway (PH + I/R + anti-Resistin + anti-visfatin group). Interestingly, livers from these animals showed a significant amelioration of liver injury and regeneration in comparison to livers with normally functioning visfatin pathway (PH + I/R group). Indeed, no differences in transaminases, damage score values (Fig. 2A and Supplementary Fig. 1A), percentage of Ki-67-positive hepatocytes, percentage of BrdU-positive hepatocytes, or growth factor levels (Fig. 2A and Supplementary Fig. 1B) were observed when comparing PH + I/R + anti-Resistin + anti-visfatin and PH + I/R + anti-visfatin groups. Exogenous administration of resistin, aimed at reducing intrahepatic visfatin accumulation, did not effectively modify hepatic visfatin mRNA or protein levels compared to the PH + I/R group (data not shown). Thus, in terms of good surgical

outcomes, the conditions required to protect steatotic livers against visfatin-derived damage and regenerative failure are determined by inhibition of the hepatic visfatin pathway using antibody therapy against this cytokine.

Underlying mechanisms of visfatin in steatotic livers from Zucker rats undergoing PH + I/R

We next attempted to identify, which activity of visfatin – pro-inflammatory cytokine synthesis-like activity and/or NAD biosynthetic activity – is responsible for the injurious effects of visfatin on damage and regenerative failure of steatotic livers undergoing PH + I/R. The involvement of TNF- α and IL-1 β in the inflammatory response induced by visfatin [13] and that associated with liver I/R [20] is well known. As expected, PH + I/R resulted in elevation of hepatic TNF-A and IL-1B neutrophil

accumulation, oxidative stress and edema formation in comparison to the Sham group (Fig. 2B). Interestingly, those animals with increased visfatin concentration within the liver (PH + I/R + visfatin and PH + I/R + anti-resistin groups) did not show further increments in TNF-A, IL-1B MPO and MDA levels nor in edema formation in comparison to the PH + I/R group. Similarly, when hepatic visfatin action was inhibited (PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + anti-Resistin + anti-visfatin groups) the inflammatory parameters were similar to those of the PH + I/R group (Fig. 2B). No modifications in inflammatory markers were found analyzing earlier times (6 and 12 h after completion of the surgical procedure) (Supplementary Fig. 3).

However, we herein show a correlation between visfatin and NAD levels in steatotic livers undergoing PH + I/R. In fact, the administration of either visfatin (PH + I/R + visfatin group) or antibodies against resistin (PH + I/R + anti-resistin group), which upregulated visfatin levels, increased hepatic NAD levels in comparison to the PH + I/R group (Fig. 2B). Moreover, when visfatin action was inhibited (PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + anti-Resistin + anti-visfatin groups), NAD levels in steatotic livers were also reduced. No upregulation of NAD levels was observed in Ln animals undergoing PH + I/R after visfatin administration (data not shown).

Effects of pharmacological modulation of visfatin on lipid metabolism, protein metabolism and mitochondria dysfunction in steatotic livers from Zucker rats undergoing PH + I/R

As previously described [21], hepatic accumulation of fatty droplets and triglyceride levels were observed in the PH + I/R group vs. the Sham group (Fig. 3A and C), which was not observed in animals without adipose tissue (PH + I/R + LPT group) (data not shown). The pharmacological modulation of visfatin in *Ob* animals undergoing liver surgery did not induce changes in the parameters of lipid metabolism. Indeed, PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + visfatin groups resulted in hepatocellular fatty infiltration and hepatic triglyceride levels similar to those of the PH + I/R group. Plasma LDL, VLDL, HDL, fatty acids and total cholesterol levels followed a similar pattern to that described for triglycerides (data not shown). In addition, compared with the PH + I/R group, the expression of critical regulators for lipid catabolism, mitochondrial fatty acid oxidation (CPT2, MCAD and Fgf21) and fatty acid synthesis (SCD1 and FAS) in steatotic livers of the PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + visfatin groups was unaltered (Fig. 3A). Moreover, the pharmacological modulation of either resistin or visfatin in sham-operated *Ob* Zucker rats did not induce changes in either hepatic damage, regeneration parameters or lipid metabolism (data not shown).

PH + I/R affected mitochondrial function in steatotic livers, as evidenced by the reduction in cytochrome c oxidase activity and ATP levels, and the increase in cytosolic cytochrome c and caspase 8 activity levels when compared with the Sham group (Fig. 3B). Liver surgery affected mainly *Cox4* mRNA expression whereas no changes in *Cox1* mRNA were detected (data not shown). All these changes in mitochondrial parameters were unmodified after pharmacological modulation of visfatin (PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + visfatin groups). Regarding mitochondrial redox status, PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + visfatin did not modify either *GPX1* mRNA expression or mitochondrial MDA levels in steatotic livers when compared with the PH + I/R group (Fig. 3B). Similar results were observed

analyzing *SOD2* mRNA levels (data not shown). On the other hand, alterations in amino acid metabolism in steatotic livers were observed after pharmacological modulation of visfatin. Indeed, high levels of both total free essential and non-essential amino acids were observed in plasma of PH + I/R, PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + visfatin when compared with the Sham group (Fig. 4A). Interestingly, lower and higher free arginine levels were observed in PH + I/R + anti-visfatin and PH + I/R + visfatin groups respectively, when compared with the PH + I/R group. Arginine is involved in urea cycle (detoxification of ammonia to produce urea) and NO production [22]. Further analysis revealed that PH + I/R + anti-visfatin reduced GDH activity (a NAD-dependent enzyme), α -ketoglutarate, NH_4^+ , urea levels and NO production in steatotic livers when compared with the PH + I/R (Fig. 4B and C). Conversely, PH + I/R + visfatin increased GDH activity, α -ketoglutarate and NH_4^+ levels in steatotic livers when compared with the PH + I/R, which was associated with increased urea levels and NO production (Fig. 4C).

Effects of pharmacological modulation of resistin and visfatin in steatotic livers from Zucker rats undergoing either PH or I/R

In PH and I/R groups, resistin and visfatin levels in liver, plasma and adipose tissue of *Ob* animals were similar to those found in the Sham group (Supplementary Fig. 4A). Moreover, in *Ob* animals no effects on hepatic damage or liver regeneration were observed after resistin or visfatin pharmacological modulation (Supplementary Fig. 4B).

Resistin and visfatin formation in steatotic and non-steatotic livers from Wistar rats undergoing PH + I/R

Next, we investigated whether resistin and visfatin formation upon PH + I/R is a general phenomenon of animals with steatotic livers and not a phenomenon restricted to Zucker rats. As shown in Supplementary Fig. 5, resistin and visfatin levels in liver, plasma and adipose tissue of Ln and *Ob* Wistar animals, showed a similar pattern to those described for Ln and *Ob* Zucker animals, respectively.

Discussion

To the best of our knowledge, there are not previous studies reporting changes in resistin levels when livers are submitted to PH under I/R, a procedure commonly applied in clinical surgery. Using a well-characterized model of experimental PH + I/R, we have observed that in contrast to non-steatotic livers (which show no modification in this cytokine), resistin was increased in livers with steatosis in response to PH + I/R. Two hypotheses might explain why resistin is detected in the liver. First, resistin may be taken up from the circulation by liver cells. Second, the liver may generate resistin by itself. Our study describes upregulation in both mRNA and protein levels of resistin in the steatotic liver, no modifications in adipose tissue content, together with a concomitant increase of the cytokine in the systemic circulation, altogether suggesting that reperfusion of ischemic lobes of steatotic liver results in production and release of tissue-associated resistin to the circulation. Contrarily, significantly increased ability of adipose tissue to produce visfatin is observed in *Ob* animals submitted to PH + I/R, and may

Research Article

Liver Failure and Growth

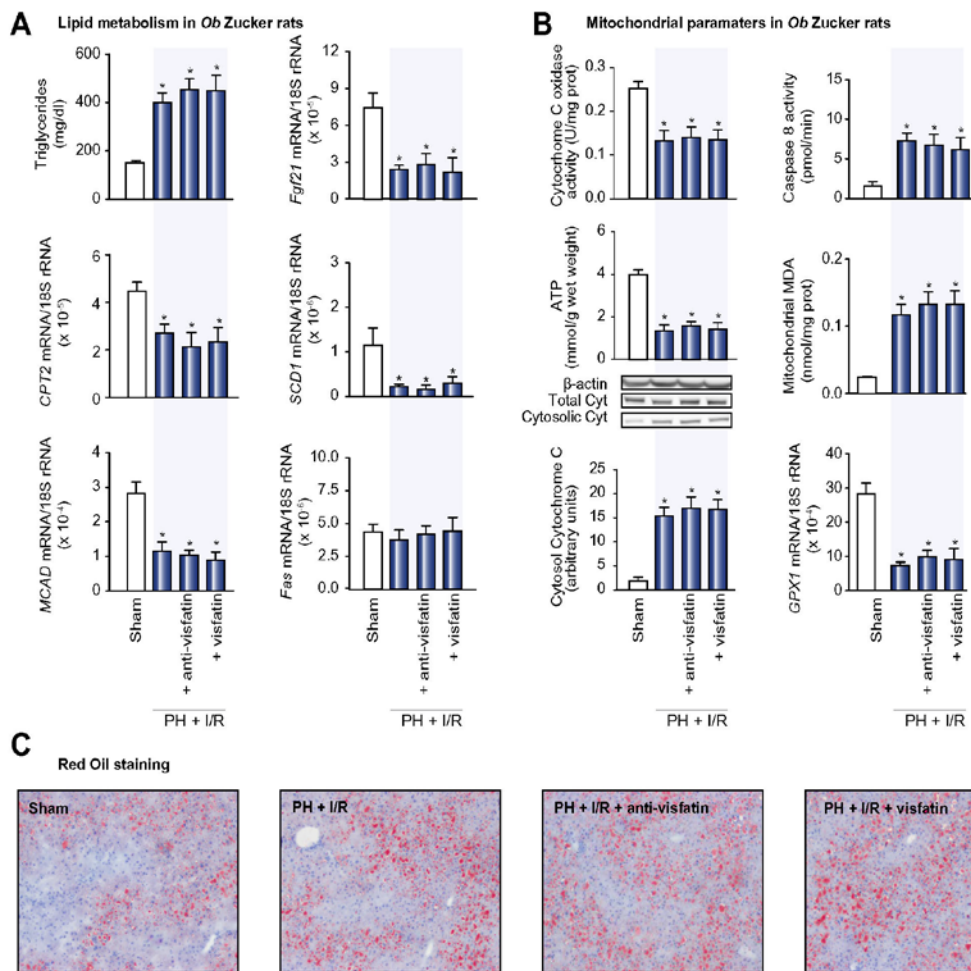


Fig. 3. Effects of visfatin on lipid metabolism and mitochondrial parameters in Ob Zucker rats undergoing PH + I/R. (A) Hepatic lipid metabolism parameters, (B) hepatic mitochondrial parameters and (C) representative photographs of red oil staining (10x). Six Ob animals from each group in each measurement. *p < 0.05 vs. sham. (This figure appears in colour on the web.)

explain the elevated visfatin circulating levels observed in these animals. The contribution of steatotic livers to circulating visfatin levels appears to be minor since it clearly had lower visfatin mRNA and protein levels after PH + I/R, presumably attributable to impaired hepatic production. This finding is in line with previous data showing that visfatin is downregulated under stress conditions in the heart, at both protein and mRNA levels [23]. In line with this, it has been also suggested that the expression of visfatin is regulated in a stimulus-dependent manner [23].

The effects of strategies based on modulating either resistin or visfatin on damage and regenerative failure in livers suffering PH under I/R have not been determined previously. Herein we have shown that neither resistin nor visfatin play a crucial role in non-steatotic livers. However, a very different scenario is observed in animals with hepatic steatosis, since we report evidence of the injurious effects of visfatin in steatotic livers, suggesting the clinical potential of visfatin-blocking-based drugs in

steatotic livers undergoing PH + I/R. Our results show for the first time that the spontaneous upregulation of resistin in steatotic livers in conditions of PH + I/R may be a compensatory mechanism to maintain low hepatic visfatin levels. In fact, here we show the importance of preventing increments in hepatic visfatin in steatotic livers to protect them against damage and regenerative failure.

A possible mechanism to explain why endogenous resistin maintains the low levels of visfatin in the steatotic livers follows. It appears unlikely that visfatin accumulation observed in steatotic livers after regenerative failure can be attributed to an increase in visfatin generation by the liver. In fact, administration of antibodies against resistin did not modify the levels of visfatin mRNA in the steatotic liver. However, resistin blockade induced the release of visfatin from adipose tissue to the circulation, which ultimately could be taken up by hepatic cells. Indeed, a significant accumulation of visfatin within the liver, but not in

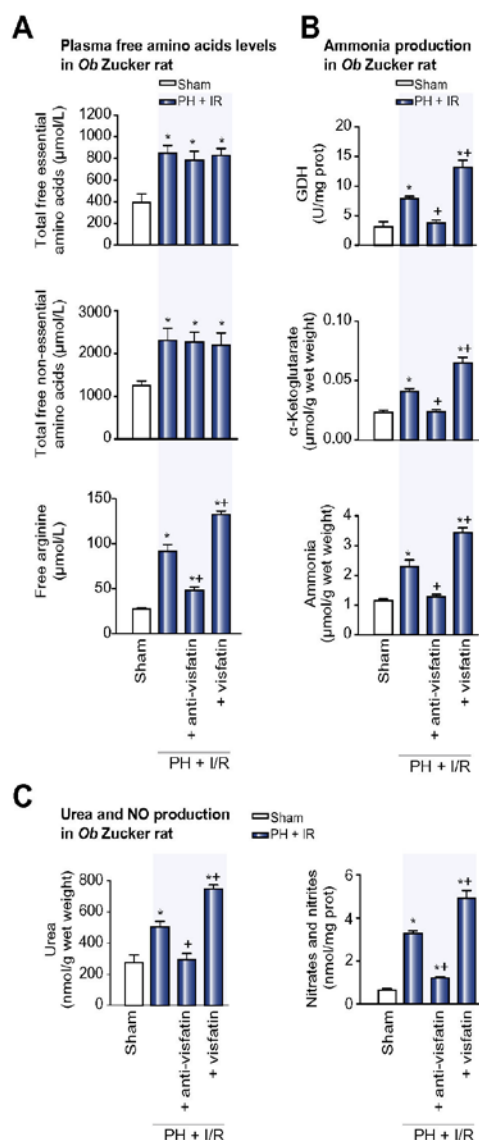


Fig. 4. Effects of visfatin on free amino acids levels, ammonia, urea and NO production in Ob Zucker rats undergoing PH + I/R. (A) Plasma free amino acids levels, (B) GDH, α -ketoglutarate and ammonia levels and (C) urea and NO production. Six Ob animals from each group in each measurement. * $p < 0.05$ vs. sham; ** $p < 0.05$ vs. PH + I/R.

plasma, was observed in the PH + I/R + anti-resistin group of animals. Moreover, adipose tissue visfatin origin was confirmed since hepatic visfatin accumulation was no longer observed when adipose tissue was removed. Very importantly, the injurious effects derived from visfatin accumulation can be abolished using visfatin-neutralizing antibodies.

Further studies (which are beyond the scope of the present study) will be required to elucidate how visfatin is taken up into hepatocytes. Although the specific receptors or transporters for visfatin in hepatic cells remain to be identified [24], the possibility that visfatin might be taken up (with intact enzymatic activity) into hepatocytes by a transport mechanism, not identified to date, should not be discarded. Indeed, recent data indicate that visfatin acts as an intracellular NAD biosynthetic enzyme and it is not enzymatically active in the bloodstream [25]. In addition, it has been suggested that circulating visfatin can likewise enter the brain compartment, probably via an unknown active transport mechanism [26].

Next, we investigated why the inhibition of the visfatin pathway is crucial to protect steatotic livers in conditions of PH under I/R. To our knowledge, our results are the first indicating that visfatin functions as an NAD biosynthetic enzyme in steatotic livers undergoing PH + I/R. This could partially explain the injurious effects of visfatin in liver surgery. Indeed, high visfatin levels in steatotic livers were associated with high hepatic NAD, increased hepatic damage and regenerative failure. Consequently, visfatin inhibition was associated with low NAD levels and protection against damage and regenerative failure of steatotic livers. To understand these results, the following observations should be considered. First, GDH is a mitochondrial matrix enzyme that plays an important role in the modulation of amino acid catabolism in the liver. GDH catalyzes the dehydrogenation of glutamate to α -ketoglutarate and ammonia with NAD^+ as a cofactor and their activation in the liver leads to hyperammonemia. In the liver, NH_4^+ enters the urea cycle and then, arginine induces urea formation and NO production [22]. In our hands, visfatin increased GDH activity and this was associated with high NH_4^+ levels, high arginine and increased NO production. Importantly, injurious effects of NO in PH + I/R-derived hepatic damage have been previously described [4]. In addition, urea itself is responsible for extracellular acidification [27], and NH_4^+ is highly damaging due to changes in cellular pH, lysosomal system of hepatocytes and swelling of susceptible cells by altering the osmotic balance [28]. Second, it should be considered that in the current study we evaluated hepatic regeneration 24 h after PH, and it should be noted that the period 16–28 h after PH is a very rapid DNA synthesis one [29]. It appears that during this regeneration phase, DNA synthesis occurs at the expense of NAD synthesis. Indeed, an inverse correlation between NAD content and DNA content was reported [29]. In our opinion, strategies aimed at blocking visfatin action in steatotic livers are required to protect this type of liver against damage and regenerative failure probably because visfatin in the remnant steatotic liver could favour the synthesis of NAD instead of DNA. This could be the result of competition for common precursors and cofactors namely ATP, ribose 1-phosphate 5-pyrophosphate and adenine between the two synthetic pathways.

On the other hand, it should be noted that PH + I/R did not induce changes in either resistin or visfatin in non-steatotic livers and this suggests that strategies aimed at regulating these adipocytokines would be irrelevant in non-steatotic livers under these surgical conditions. In line with this, the administration of visfatin to Ln animals undergoing PH + I/R did not affect NAD levels, damage or regeneration. The mechanisms involved in damage and regeneration in liver surgery are very different in steatotic and non-steatotic livers [4,21,30,31]. Thus, the same drug might

Research Article

have no effects, or even opposite effects on damage and regeneration depending on the type of liver.

In conclusion, steatotic livers are more vulnerable to overexpress resistin and downregulate visfatin following PH under I/R. Endogenous resistin does not modify the generation of visfatin by steatotic livers but rather blocks its hepatic re-uptake from adipose tissue, and a similar result is obtained supplementing steatotic livers with exogenous resistin. An inhibition of the visfatin-downstream pathway using antibody therapy against this cytokine is required to protect steatotic livers against damage and regenerative failure (Supplementary Fig. 6). NAD biosynthetic activity rather than inflammatory response-like activity is responsible for the injurious effects of visfatin on damage and regenerative failure in steatotic livers submitted to surgery. From the point of view of clinical application, drugs aimed at blocking visfatin action in steatotic livers may provide a novel therapeutic approach to clinical conditions in which I/R and liver regeneration occur including hepatic resections and small steatotic liver transplants. Nevertheless, intensive investigations will be necessary to evaluate if the benefits of these strategies observed in experimental models of PH under I/R could be extrapolated to the clinical practice.

Financial support

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

Conflict of interest

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

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.07.041>.

References

- [1] McCormack L, Petrowsky H, Jochum W, Furrer K, Clavien PA. Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann Surg* 2007;245:923-930.
- [2] Mitchell C, Gilgenkrantz H. Had Prometheus known, would he have preferred to be obese? *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:2053-2054.
- [3] Nocito A, El-Badry AM, Clavien PA. When is steatosis too much for transplantation? *J Hepatol* 2006;45:494-499.
- [4] Ramalho FS, Alfany-Fernandez I, Casillas-Ramirez A, Massip-Salcedo M, Serafin A, Rimola 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;329:130-140.
- [5] Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology* 2009;50:957-969.
- [6] Gaddipati R, Sasikala M, Padaki N, Mulcherjee RM, Sekaran A, Jayaraj-Mansard M, et al. Visceral adipose tissue visfatin in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2010;9:266-270.
- [7] Yang YP, Guan XQ, Qi MM, Zhu LR. Effects of resistin on hepatic fibrosis: possible mechanisms in non-alcoholic fatty liver disease in in-vitro and in-vivo. *Dongwuxue Yanjiu* 2012;33:367-372.
- [8] Bahr MJ, Ockenga J, Böker KH, Manns MP, Tietge UJ. Elevated resistin levels in cirrhosis are associated with the proinflammatory state and altered hepatic glucose metabolism but not with insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:e199-e206.
- [9] Smith CC, Yellon DM. Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection. *Pharmacol Ther* 2011;129:206-219.
- [10] Jacques C, Holzenberger M, Mladenovic Z, Salvat C, Pecchi E, Berenbaum F, et al. Proinflammatory actions of visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) involve regulation of insulin signaling and Nampt enzymatic activity. *J Biol Chem* 2012;287:15100-15108.
- [11] Kulić M, Ciupińska-Kajor M, Kajor M, Wyleźniak M, Zwirska-Korczala K, Hartleb M, et al. Liver visfatin expression in morbidity obese patients with nonalcoholic fatty liver disease undergoing bariatric surgery. *Pol J Pathol* 2010;61:147-153.
- [12] Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, et al. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol* 2007;178:1748-1758.
- [13] Busso N, Karababa M, Nobile M, Rolaz A, Van Gool F, Galli M, et al. Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin enzymatic activity identifies a new inflammatory pathway linked to NAD. *PLoS One* 2008;3:e2267.
- [14] Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:412-421.
- [15] Gonzalez-Gay MA, Vazquez-Rodriguez TR, Garcia-Unzueta MT, Berja A, Miranda-Fillo J, de Matias JM, et al. Visfatin is not associated with inflammation or metabolic syndrome in patients with severe rheumatoid arthritis undergoing anti-TNF-alpha therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2010;28:56-62.
- [16] Bi J, Li H, Ye SQ, Ding S. Pre-B-cell colony-enhancing factor exerts a neuronal protection through its enzymatic activity and the reduction of mitochondrial dysfunction in vitro ischemic models. *J Neurochem* 2012;120:334-346.
- [17] Li Y, Zhang Y, Dorweiler B, Cui D, Wang T, Woo CW, et al. Extracellular nampt promotes macrophage survival via a non-enzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *J Biol Chem* 2008;283:34833-34843.
- [18] Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M, et al. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 2001;33:808-815.
- [19] 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.
- [20] Serafin A, Roselló-Catafau J, Prats N, Gelpi E, Rodés J, Peralta C. Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion. *Hepatology* 2004;39:688-698.
- [21] Elias-Miró M, Massip-Salcedo M, Rilla J, Schweigert F, Mendes-Braz M, Ramalho F, et al. Retinol binding protein 4 and retinol in steatotic and non-steatotic rat livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia/reperfusion. *Liver Transpl* 2012;18:1198-1208.
- [22] Cohen BD. Methyl group deficiency and guanidino production in uremia. *Mol Cell Biochem* 2003;244:31-36.
- [23] Hsu CP, Oka S, Shao D, Hariharan N, Sadoshima J. Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through NAD+ synthesis in cardiac myocytes. *Circ Res* 2009;105:481-491.
- [24] Skolkowa J, Lan D, Thakur BK, Wang F, Gupta K, Cario G, et al. NAMPT is essential for the G-CSF-induced myeloid differentiation via NAD+-sirtuin-1-dependent pathway. *Nat Med* 2009;15:151-158.
- [25] Hara N, Yamada K, Shibata T, Osago H, Tsuchiya M. Nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin does not catalyze nicotinamide mononucleotide formation in blood plasma. *PLoS One* 2011;6:e22781.

JOURNAL OF HEPATOLOGY

- [26] Hallschmid M, Radeva H, Tan B, Kern W, Lehnert H. Relationship between cerebrospinal fluid visfatin (PBEF/Nampt) levels and adiposity in humans. *Diabetes* 2009;58:637–640.
- [27] Bessems M, Hart NA, Tolba R, Doorschodt BM, Leuvenink HG, Ploeg RJ, et al. The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim* 2006;40:236–246.
- [28] Shawcross DL, Wright GA, Stadlbauer V, Hodges S, Davies N, Wheeler-Jones C, et al. Amonia impairs Neutrophil phagocytic function in liver disease. *Hepatology* 2008;48:1202–1212.
- [29] Ferris GM, Clark JB. Nicotinamide nucleotide synthesis in regenerating rat liver. *Biochem J* 1971;121:655–662.
- [30] Selzner M, Rüdiger H, Sindram D, Madden J, Clavien P. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology* 2000;32:1280–1288.
- [31] Peralta C, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.06.017>.

Supplementary Data:

Resistin and visfatin in steatotic and nonsteatotic livers in the setting of partial hepatectomy under Ischemia-reperfusion

Maria Elias-Miró^{1*}, Mariana Mendes-Braz^{1,2*}, Ruben Cereijo³, Francesc Villarroya³ Mónica B. Jiménez-Castro¹, Jordi Gracia-Sancho⁴, Sergi Guixé-Muntet⁴, Marta Massip-Salcedo¹, Joan Carles Domingo⁵, Raquel Bermudo⁶, Juan Rodés^{1,7}, Carmen Peralta¹

Supplementary material and methods

Experimental groups

Resistin and Visfatin in steatotic and non-steatotic livers from Zucker rats undergoing PH+I/R

- 1). Sham. Hepatic hilar vessels of animals were dissected.
- 2). PH+I/R. Animals underwent partial hepatectomy (70%) under 60 minutes of ischemia.
- 3). PH+I/R+anti-Resistin. As in group 2, but treated with a neutralizing antibody against resistin.
- 4). PH+I/R+anti-Visfatin. As in group 2, but treated with a neutralizing antibody against visfatin.
- 5). PH+I/R+anti-Resistin+anti-Visfatin. As in group 2, but treated with a neutralizing antibody against resistin and a neutralizing antibody against visfatin.
- 6). PH+I/R+Resistin. As in group 2, but treated with resistin.

- 7). PH+I/R+Visfatin. As in group 2, but treated with visfatin.
- 8). PH+I/R+lipectomy of white adipose tissue (PH+I/R+LPT). As in group 2, but mesenteric, perirenal, retroperitoneal and epididymal adipose tissue were resected and extracted before starting PH+I/R [1].
- 9). PH+I/R+LPT+anti-Resistin. As in group 8, but treated with a neutralizing antibody against resistin.
- 10). Sham+anti-Resistin. As in group 1, but treated with a neutralizing antibody against resistin.
- 11). Sham+anti-Visfatin. As in group 1, but treated with a neutralizing antibody against visfatin.

Effects of pharmacological modulation of resistin and visfatin in steatotic livers from Zucker rats undergoing either PH or I/R.

- 12). PH. Animals underwent partial hepatectomy (70%).
- 13). I/R group. Animals underwent 60 minutes of ischemia.
- 14). PH+anti-Resistin. As in group 12, but treated with a neutralizing antibody against resistin.
- 15). I/R+anti-Resistin. As in group 13, but treated with a neutralizing antibody against resistin.
- 16). PH+anti-Visfatin. As in group 12, but treated with a neutralizing antibody against visfatin.
- 17). I/R+anti-Visfatin. As in group 13, but treated with a neutralizing antibody against visfatin.

Resistin and visfatin formation in steatotic and non-steatotic livers from Wistar rats undergoing PH+I/R

- 18). Sham group. Hepatic hilar vessels of animals were dissected.

19). PH+I/R group. Animals underwent partial hepatectomy (70%) under 60 minutes of ischemia.

The doses and the pre-treatment times for the different drugs used in the current study were selected on the basis of previously published studies [2-5] and preliminary studies from our group. These are the following: antibody against resistin (1 mg/kg i.v.; Merck Millipore, USA) and antibody against visfatin (500 µg/kg i.v.; Adipogen Inc., Korea) 30 minutes before the surgical procedure [2,3]; resistin (100 µg/kg i.v., PeproTech Inc, USA) and visfatin (50 µg/kg i.v.; Enzo Life Sciences, Switzerland) 10 minutes before the surgical procedure [4,5]. Control experiments were performed with the drug vehicles.

Plasma, liver and white adipose tissue samples were collected 24 hours after completion of the surgical procedure. To measure DNA synthesis, bromodeoxyuridine (BrdU) was administered (50 mg/kg. i.p.) 1 hour before sacrifice and processed to determine BrdU incorporation [6,7]. To evaluate the inflammatory response, animals were subjected to interventions similar to that used for groups 2-7, but liver samples were obtained at 6 and 12 hours after completion of the surgical procedure.

Biochemical Determinations

Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in plasma and hepatocyte growth factor (HGF), active transforming growth factor β (TGF- β) and caspase 8 in liver were measured as described elsewhere [8]. Visfatin and resistin levels in plasma, liver and adipose tissue and NAD levels in liver were measured by enzyme-linked immunosorbent technique following

manufacturer's instructions. Commercial kits from Adipogen Inc., Korea; Leti Diagnostics, Spain and BioVision, Inc., USA, were used for visfatin, resistin and NAD measurements, respectively. Myeloperoxidase (MPO, as an index of neutrophil accumulation), edema formation, TNF- α , IL-1 β and ATP levels in liver were measured as described elsewhere [9]. MDA (as an index of oxidative stress) was measured in liver and mitochondrial fractions [9,10]. Cytochrome c oxidase was measured in mitochondrial fractions [11] using commercial kits from Sigma, Spain. Low-density lipoprotein (LDL), very-low-density lipoprotein (VLDL), high-density lipoprotein (HDL), fatty acids and total cholesterol were measured following standard procedures. Concentrations of total free essential and non-essential amino acids were measured in plasma following mass trak amino acid derivatization technique, using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and ultra high permance liquid cromatography. Urea, NH $_4^+$, α -Ketoglutarate and glutamate dehydrogenase (GDH) in liver were evaluated as previously described [12,13] using commercial kits from BioVision, USA.

Western blotting

Liver tissues were processed to obtain cytosolic fractions [11]. Western blotting for total and cytosolic fractions of cytochrome c, was performed as described [14], using the following antibodies: cytochrome c (Cell Signalling Technology, USA) and β -Actin (Sigma, Spain).

RNA Isolation and Reverse Transcription and Quantitative Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis were performed with Assays-on-Demand TaqMan probes (Rn 00595224_m, resistin; Rn00822043_m1, visfatin; Rn00563995_m1, carnitine palmytoil transferase-2 (CPT2); Rn00566390_m1, medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD); Rn00590706, fibroblast growth factor-21 (FGF21); Rn00566942_g1, superoxide dismutase-2 (SOD2); Rn00577994_g1, glutathion peroxidase-1 (GPX1); Rn00594894_g1, stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1); Rn00685720_m1, fatty acid synthase (FAS); Rn03296721_s1, cytochrome c oxidase subunit I (COXI); Rn00567950_m1, cytochrome c oxidase subunit IV (COXIV); Rn00667869_m1, β -actin; Hs99999901_s1, 18SrRNA) (Applied Biosystems, CA) according to the manufacturer's protocol.

Histology, Red Oil staining, and Immunohistochemistry

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 consisting of cytoplasmic vacuolation and focal nuclear pyknosis; (2) moderate to severe injury with extensive nuclear pyknosis, cytoplasmic hypereosinophilia, and a loss of intercellular borders; (3) severe necrosis with disintegration of hepatic cords, haemorrhaging, and neutrophil infiltration; and (4) very severe necrosis with disintegration of hepatic cords, haemorrhaging, and neutrophil infiltration (5). Liver steatosis was evaluated via red oil staining on frozen specimens, and the percentage of

steatosis was calculated by image analysis according to the standard procedure [8]. The proportion of proliferating cells was estimated by Ki-67 immunostaining using a monoclonal antibody against Ki-67 (clone SP6, Abcam, UK), and quantification of hepatocytes which incorporated BrdU [7]. The mitotic index was determined in hematoxylin and eosin–stained liver sections [8]. At least 30 high-power fields per slide were counted. For visfatin immunochemistry, a polyclonal antibody against visfatin from Abcam, UK, was used.

Statistics

Data are expressed as means and standard deviations, and they were compared statistically via a 1-way analysis of variance and then a post hoc Student-Newman-Keuls test; a p value <0.05 was considered significant.

Supplementary references

[1] 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.

[2] Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307-312.

[3] Hong SB, Huang Y, Moreno-Vinasco L, Sammani S, Moitra J, Barnard JW, et al. Essential role of pre-B-cell colony enhancing factor in ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:605-617.

- [4] Li Y, Wang Y, Li Q, Chen Y, Sun SZ, Zhang WD, Jia Q. Effect of resistin on vascular endothelium secretion dysfunction in rats. *Endothelium* 2007;14:207-214.
- [5] Park BS, Jin SH, Park JJ, Park JW, Namgoong IS, Kim YI, et al. Visfatin induces sickness responses in the brain. *PLoS One* 2011;6:e15981.
- [6] Saile B, DiRocco P, Dudas J, El-Armouche H, Sebb H, Eisenbach C, et al. IGF-I induces DNA synthesis and apoptosis in rat liver hepatic stellate cells (HSC) but DNA synthesis and proliferation in rat liver myofibroblasts (rMF). *Lab Invest* 2004;84:1037-1049.
- [7] Elias-Miró M, Massip-Salcedo M, Raila J, Schweigert F, Mendes-Braz M, Ramalho F, et al. Retinol binding protein 4 and retinol in steatotic and nonsteatotic rat livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia/reperfusion. *Liver Transpl* 2012;18:1198-1208.
- [8] Ramalho FS, Alfany-Fernandez I, Casillas-Ramirez A, Massip-Salcedo M, Serafín A, Rimola A, et al. 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.
- [9] Franco-Gou R, Roselló-Catafau J, Peralta C. Protection against lung damage in reduced-size liver transplantation. *Crit Care Med* 2006;34:1506-1513.
- [10] Lee YM, Choi JS, Kim MH, Jung MH, Lee YS, Song J. Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets. *Nutrition* 2006;22:956-964.

- [11] Shaki F, Hosseini MJ, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:1940-1950
- [12] Kim WH, Park H, Yun C, Cho H, Cho H, Kim S, et al. Mixture of N-carbamoyl-L-glutamate plus L-arginine can protect rats with liver cirrhosis from acute ammonia intoxication. *J Hepatol* 2001;35:719-725
- [13] Saling SC, Comar JF, Mito MS, Peralta RM, Bracht A. Actions of juglone on energy metabolism in the rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;257:319-327
- [14] Rector RS, Thyfault JP, Uptergrove GM, Morris EM, Naples SP, Borengasser SJ, et al. Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in a rodent model. *J Hepatol* 2010;52:727-736.

Supplementary figure legends

Fig. 1. Histological lesions and immunohistochemical staining of Ki-67-positive hepatocytes in Ob Zucker rats undergoing PH+I/R. Representative photographs of (A) H&E staining and (B) immunohistochemical staining of Ki-67-positive hepatocytes (10x).

Fig. 2. Visfatin immunohistochemistry in Ob Zucker rats undergoing PH+I/R. Representative photographs of immunohistochemical staining of visfatin-positive hepatocytes (10x).

Fig. 3. Effects of visfatin inhibition induced by resistin on hepatic inflammatory response in Ob Zucker rats undergoing PH+I/R at different times. Hepatic inflammatory response at 6, 12 and 24 hours after completion of the surgical procedure. Six Ob animals from each group in each measurement. * $p < 0.05$ vs. Sham.

Fig. 4. Resistin and visfatin in Ln and Ob Zucker rats undergoing either PH or I/R. (A) Resistin and visfatin levels in liver, plasma and mesenteric, perirenal and epididymal adipose tissue and (B) Hepatic injury and regeneration. Six Ln and six Ob animals from each group in each measurement. * $p < 0.05$ vs. Sham.

Fig. 5. Resistin and visfatin levels in Ln and Ob Wistar rats undergoing PH+I/R. Resistin and visfatin levels in liver, plasma and mesenteric, perirenal and epididymal adipose tissue. Six Ln and six Ob animals from each group in each measurement. * $p < 0.05$ vs. Sham.

Fig. 6. Schematic representation showing the potential resistin-visfatin regulation in the different experimental conditions. PH+I/R: Endogenous resistin does not modify hepatic visfatin synthesis but rather blocks the reuptake of adipocyte-released visfatin by hepatic cells. PH+I/R+anti-Resistin: Resistin blockade induces the release of visfatin from adipose tissue to the circulation, which could be up-taken by hepatic cells. Consequently, increased hepatic visfatin accumulation exacerbates damage and regenerative failure. PH+I/R+Resistin: A similar scenario to that described in PH+I/R is observed

when exogenous resistin is administered. PH+I/R+anti-Visfatin: Visfatin-downstream pathway inhibition using antibody therapy protects steatotic livers against damage and regenerative failure.

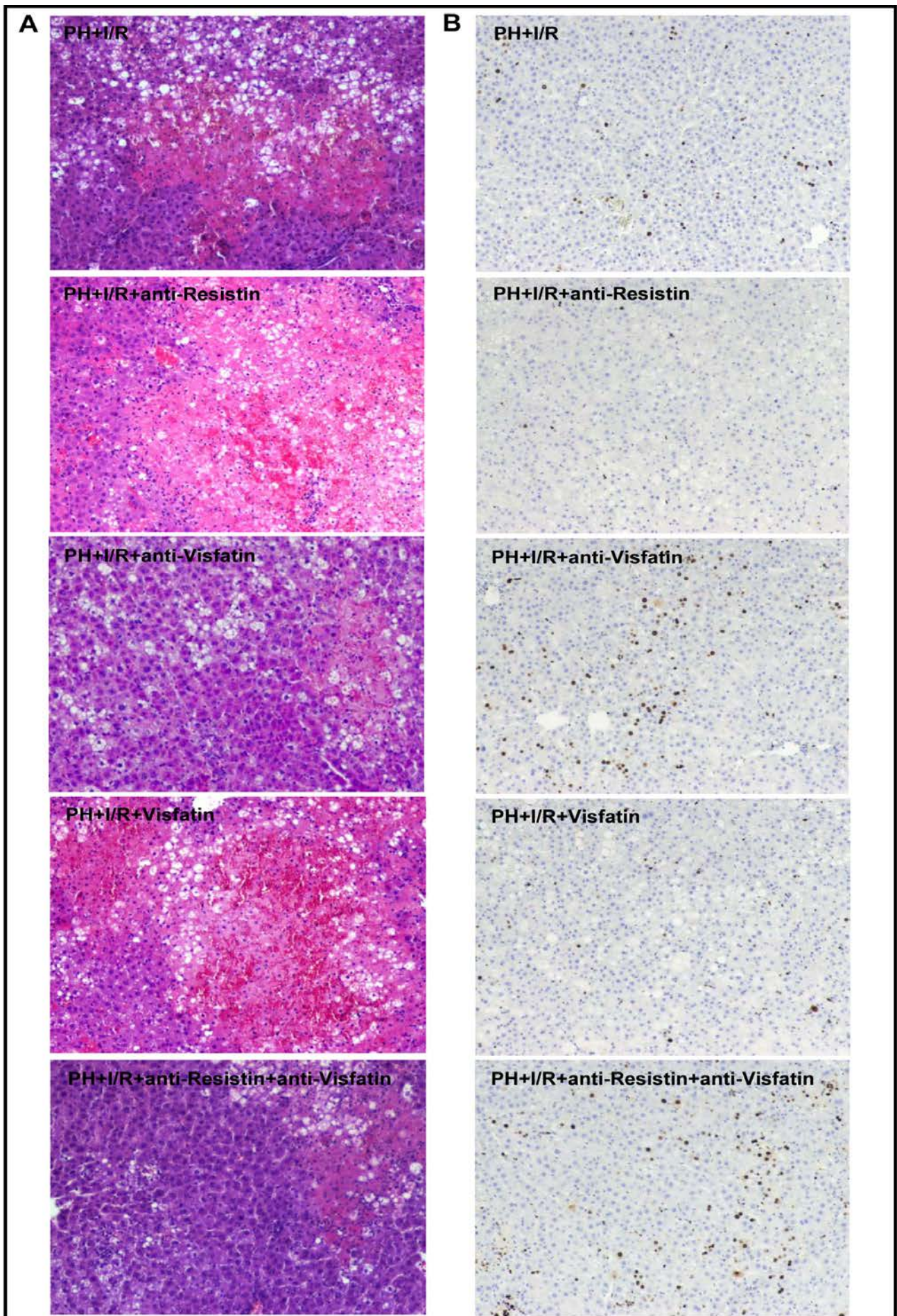


Fig.S1

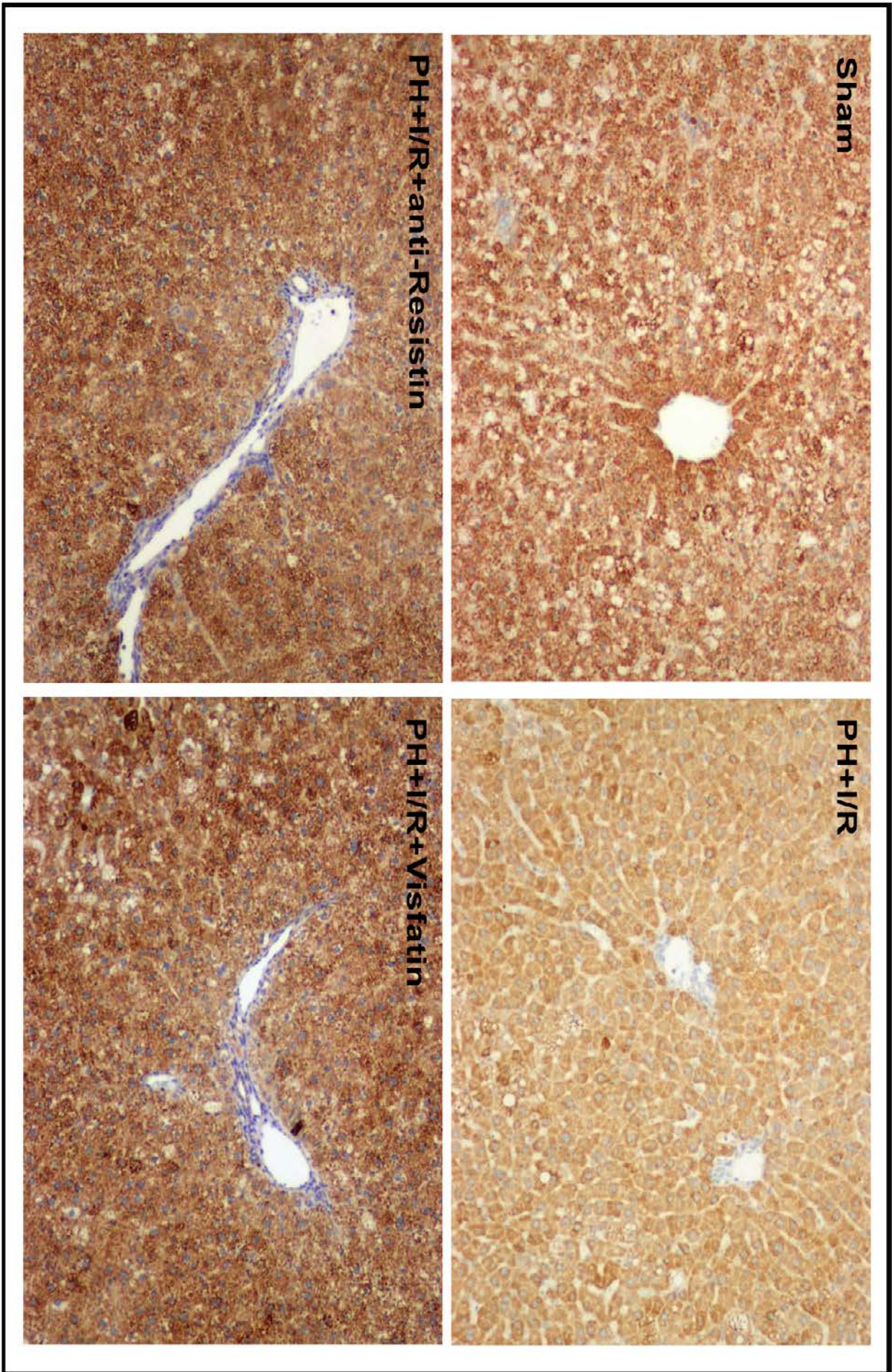


Fig.S2

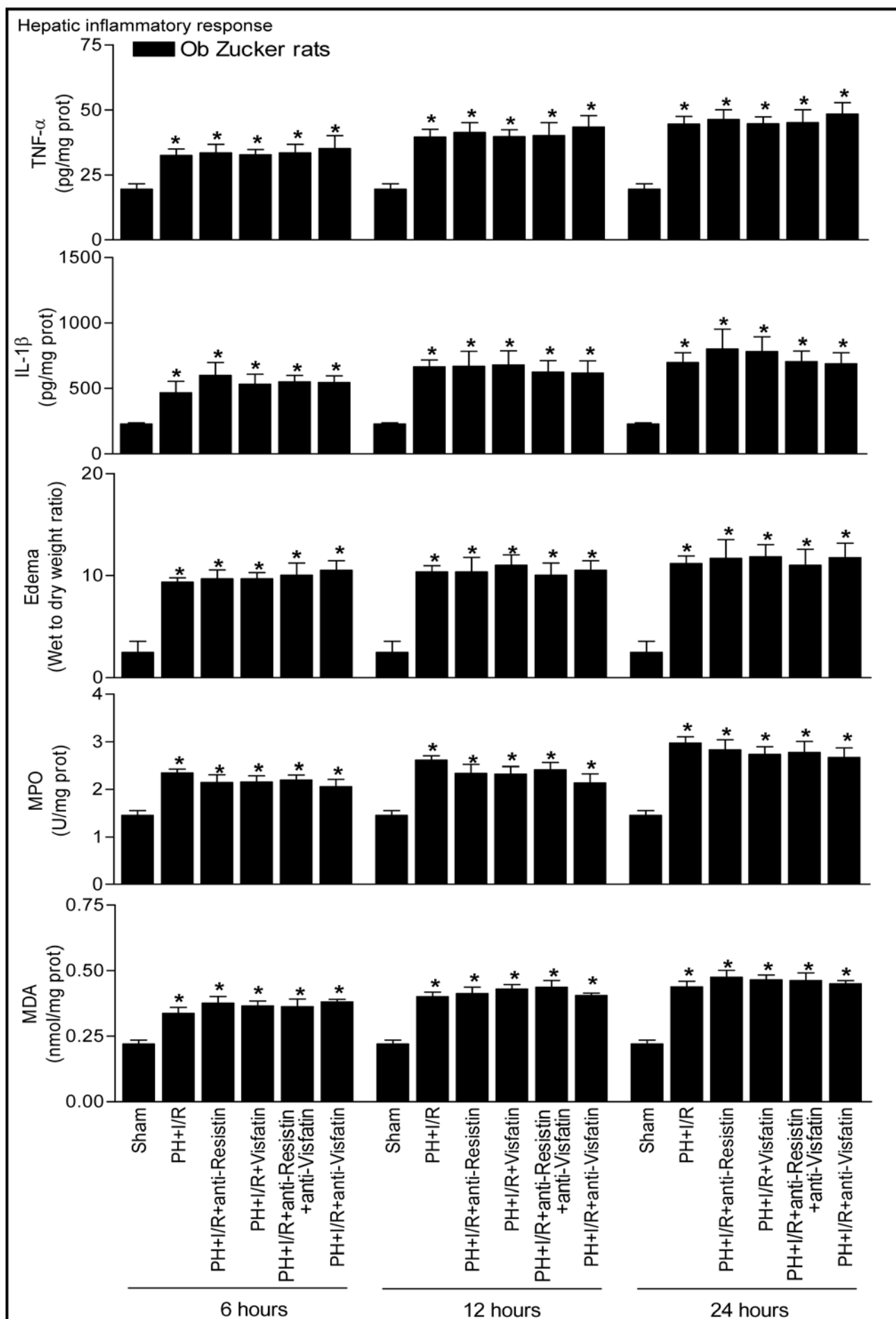


Fig.S3

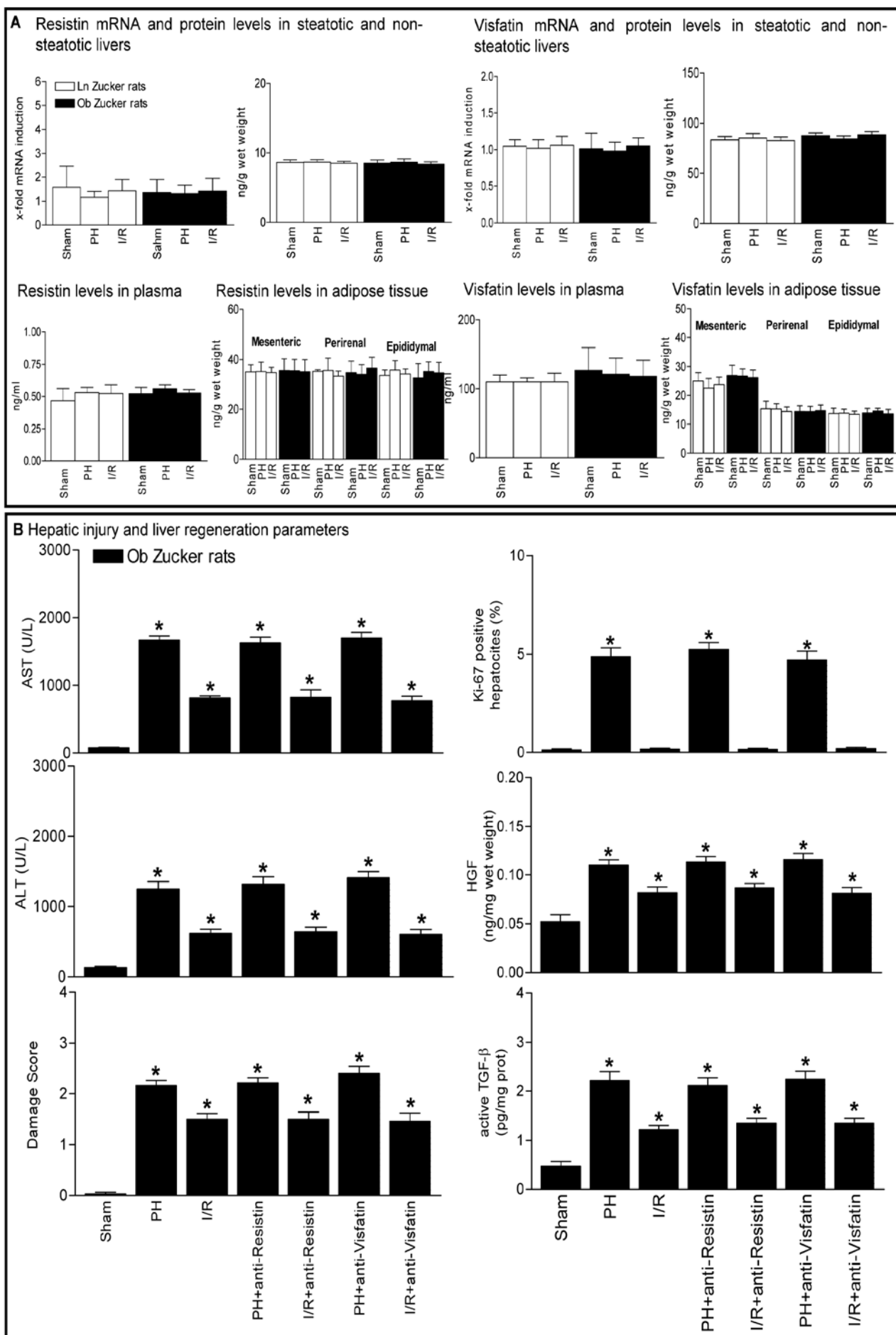


Fig.S4

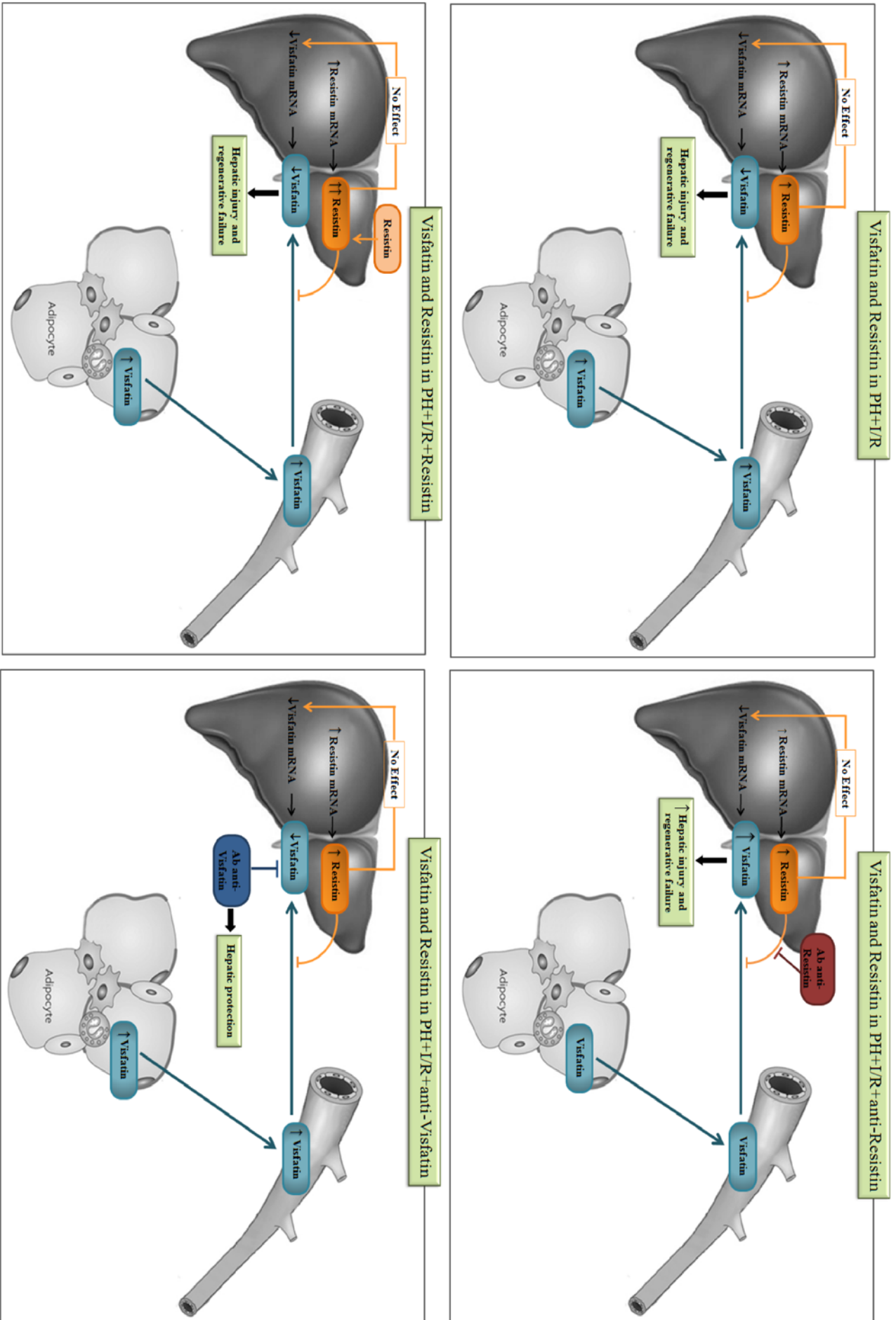


Fig.S6

DISCUSIÓN

El presente estudio evidencia que el tratamiento con glucosa o lípidos en condiciones de PH bajo I/R, confieren la misma protección en hígados no esteatósicos frente a la lesión y fallo en la regeneración hepática. Estos resultados contrastan con los datos publicados en la literatura en hígados no esteatósicos sometidos a la PH sin I/R (Caruana J.A. et al., 1986, Nakatani T. et al., 1982, 1981). Al igual que ocurre con otros tratamientos (Ramalho F.S. et al., 2009, Casillas-Ramirez A. et al., 2008, Rai R.M. et al., 1996, Suzuki S. et al., 1997, Watanabe M. et al., 2000), se ha de considerar que la efectividad de las estrategias basadas en el tratamiento nutricional de glucosa o lípidos en el daño y en la regeneración en hígados no esteatósicos podría ser diferente dependiendo de las condiciones quirúrgicas evaluadas. Los efectos beneficiosos de ambos suplementos nutricionales en hígados no esteatósicos sometidos a PH bajo I/R se explica, entre otros factores, por su capacidad de mantener de manera eficiente los niveles de ATP durante el proceso de regeneración hepática. Es bien conocido que la proliferación hepatocitaria es proporcional al aumento de ATP en el hígado remanente tras la cirugía (Man K. et al., 2006). Nuestros resultados indican además que, contrario a lo descrito en modelos experimentales de PH sin I/R (Tijburg L.B. et al., 1991, Brasaemle D.L. et al., 2006, Gazit V. et al., 2010), la regeneración del hígado no esteatósico remanente se produce independientemente de la influencia del tejido adiposo, lo cual indica que los hígados no esteatósicos son capaces de mantener sus funciones homeostáticas tras un proceso de PH bajo I/R sin la necesidad de recaptar ácidos grasos del tejido adiposo para mantener sus niveles de ATP, lo cual es imprescindible para la regeneración hepática.

Al contrario de lo que ocurre con los hígados no esteatósicos, nuestros resultados evidencian un efecto diferencial de la glucosa y de los lípidos sobre la lesión y regeneración en hígados esteatósicos sometidos a PH+I/R, lo cual podría ser de relevancia clínica. El tratamiento con glucosa no protegió a los hígados esteatósicos frente al daño pero aumentó la regeneración. Sin embargo, el tratamiento con lípidos protegió a los hígados esteatósicos frente a la lesión y fallo en la regeneración hepática. Además, la respuesta regenerativa obtenida tras el tratamiento con lípidos en hígados esteatósicos fué más evidente que la obtenida con el tratamiento glucídico. Se investigaron los efectos de ambos tratamientos sobre los factores de crecimiento claves en la regeneración como son el HGF y el TGF β , activador e inhibidor de la regeneración hepática, respectivamente. Nuestros resultados indicaron que en hígados esteatósicos la expresión de HGF fue más elevada y la de TGF β más reducida tras el tratamiento lipídico, en comparación con los resultados obtenidos con glucosa. A título de ejemplo, el HGF desempeña un papel primordial en

la regeneración hepática y en la actualidad se está evaluando en ensayos clínicos en pacientes con insuficiencia hepática aguda (Ido A. et al., 2008, 2011). Atendiendo a nuestros resultados, la expresión de HGF hepática inducida por el soporte nutricional siguió un patrón similar al descrito por IL-6, una citoquina anti-inflamatoria con propiedades proliferativas. Al igual que ocurre en diferentes desórdenes que cursan con regeneración (Kang L.I. et al., 2012, Kariv R. et al., 2003, Sun R. et al., 2005), la sobre-expresión de HGF inducida por los tratamientos nutricionales podría ser debida a la acción de la IL-6, un componente crítico de la respuesta regenerativa (Hortelano S. et al., 2007, Zimmers T.A. et al., 2003).

Posteriormente se evaluó si diferencias en la expresión de ciclinas en los hígados esteatósicos podría explicar el efecto diferencial de ambos tratamientos nutricionales sobre la regeneración hepática. Es bien sabido que los eventos de señalización que caracterizan la respuesta regenerativa hepática culminan en la entrada de los hepatocitos en el ciclo celular, que es un proceso dependiente de la ciclinas, y en la progresión a través del ciclo celular (Weymann A. et al., 2009). Como parte de este proceso, la expresión hepatocelular de la ciclina E se induce durante la fase G1 y media la transición a la fase S (Mitra K. et al., 2009), mientras que la ciclina A es necesaria para la progresión de la fase S (Desdouets C. et al., 1999). El análisis de las ciclinas indicó que los mayores beneficios de los lípidos sobre la regeneración, en comparación con la glucosa, se asociaron con un patrón diferencial en la expresión de las ciclinas. De hecho, el pico en la expresión de la ciclina E en hígados esteatósicos tratados con lípidos se produjo a tiempos de reperfusión más tempranos (12 horas después de la cirugía hepática) en comparación con el tratamiento con glucosa (24 horas después de la cirugía hepática). Además, la expresión de la ciclina A fue mayor en los hígados esteatósicos tratados con los lípidos a lo largo de la reperfusión (12, 24 y 48 horas después de la cirugía hepática). Teniendo en cuenta estas observaciones, el tratamiento lipídico es más eficaz en acelerar la regeneración de los hígados esteatósicos, específicamente durante la fase G1 y la fase S del ciclo celular, por lo tanto antes y durante la síntesis de DNA hepatocelular.

En presencia de esteatosis hepática, el tratamiento lipídico ofrece una mayor protección frente a la lesión, fallo en la regeneración y mantenimiento de los niveles de ATP, si lo comparamos con el tratamiento glucídico. Por lo tanto, teniendo en cuenta nuestros resultados, el tratamiento lipídico en vez del glucídico puede ser el más recomendado en hígados esteatósicos sometidos a PH bajo oclusión vascular.

El papel del tejido adiposo en el daño y en la regeneración hepática depende del tipo de hígado. Al contrario de lo que ocurre con los hígados no esteatósicos, la eliminación del tejido adiposo exacerbó el fallo en la regeneración que presentan los hígados esteatósicos al someterlos a PH bajo oclusión vascular. En consecuencia, estrategias basadas en la reducción o eliminación del tejido adiposo periférico podrían ser perjudiciales en las condiciones quirúrgicas que requieren la regeneración del hígado en presencia de esteatosis, tales como PH y trasplante hepático con injerto de tamaño reducido.

El tejido adiposo no fue útil para mantener los niveles energéticos en el hígado esteatósico que se estaba regenerando. De hecho, la lipectomía de TAB en los animales Ob no tratados sometidos a PH + I/R exacerbó el daño hepático y el fallo en la regeneración de los hígados esteatósicos tras la cirugía, pero sin modificar los niveles de ATP hepático. Además, cuando se realizó la lipectomía del TAB, los efectos beneficiosos de la glucosa o de los lípidos frente al daño y fallo en la regeneración de los hígados esteatósicos desaparecieron, pero sin cambios en los niveles de ATP. Teniendo en cuenta nuestros resultados, los hígados esteatósicos pueden requerir el TAB durante la regeneración más como fuente de diferentes hormonas tales como la adiponectina, que son señales esenciales para la regeneración hepática que como fuente de energía. Esta hipótesis se valida por nuestros resultados que indican que la acumulación de adiponectina en el hígado esteatósico tras la PH+I/R no se evidencia cuando se elimina el TAB. De todos modos, no se puede descartar la posible implicación del TAB en la regeneración hepática como un precursor lipídico para la síntesis de nuevas membranas celulares importante para la recuperación del tamaño estándar del hígado tras la PH.

Para entender el por qué los hígados esteatósicos prefieren los lípidos en lugar de la glucosa para obtener energía en condiciones de PH bajo I/R se ha de considerar las observaciones siguientes. Se ha demostrado en repetidas ocasiones que el hígado que se está regenerando prefiere obtener energía mediante la oxidación de los ácidos grasos (Anderson S.P. et al., 2002). Así pues, el hígado esteatósico puede utilizar su grasa acumulada para obtener la energía necesaria durante su regeneración (Ezaki H. et al., 2009, Fernández M.A. et al., 2006). Tras la administración de una emulsión lipídica, el hígado esteatósico utiliza los ácidos grasos para la síntesis de ATP, favoreciendo de esta forma el mantenimiento de los niveles energéticos. Por otro lado, hay que considerar que la β -oxidación de los ácidos grasos en el hígado esteatósico podría afectar negativamente el uso eficaz de la glucosa exógena para la síntesis de ATP. Se sabe que el aumento en la β -oxidación de ácidos grasos en el hígado resulta en la producción de NADH y

acetil-coenzima A, lo cual reducirá el potencial redox mitocondrial, evita la entrada de piruvato en el ciclo de Krebs y finalmente inhibe la oxidación de la glucosa (Holecek M., 1999).

Para explicar la mayor protección inducida por el tratamiento lipídico en los hígados esteatósicos en comparación con la proporcionada por el tratamiento glucídico, se debe considerar no sólo el mejor mantenimiento de las reservas energéticas sino también el hecho de que el tratamiento glucídico aumentó los niveles hepáticos de CER y redujo la proporción de S1P/CER, al compararlo con el tratamiento lipídico. Se conoce el papel clave de las CERs en la patogénesis de la resistencia a la insulina y otros trastornos metabólicos asociados a la obesidad (Jornayvaz F.R. et al., 2011, Ussher J.R. et al., 2010, Stienstra R. et al., 2010, Longato L. et al., 2012, Promrat K. et al., 2011). Es importante destacar que, la presencia de las CERs y la reducción en S1P/CER favorece el daño hepático y afecta negativamente la regeneración (Zabielski P. et al., 2001, Zabielski P. et al., 2010, Alkhoury N. et al., 2009). Siguiendo con estas observaciones, en cultivo celulares se ha demostrado que las CERs afectan la expresión de ciclina A, en la fase G0/G1 del ciclo celular (Jayadev S. et al., 1995, Dbaiibo G.S. et al., 1995) y reduce la expresión de c-Myc, una fosfoproteína nuclear que tiene un papel importante en la progresión a través de las diferentes fases del ciclo celular (Alesse E. et al., 1998). Se debe considerar además que, al contrario de lo que ocurre con el tratamiento glucídico, los lípidos aumentaron los niveles de fosfolípidos en los hígados esteatósicos, que son un componente importante de las membranas celulares, manteniendo así la integridad estructural entre la célula y su entorno. Algunos tipos de fosfolípidos pueden derivar en productos que funcionan como segundos mensajeros en vías de transducción de señales e intervienen además en la vía de señalización de las prostaglandinas (Cohn J.S. et al., 2008, Küllenberg D. et al., 2012). Aunque la glucosa se utiliza de forma rutinaria para tratar la hipoglucemia postoperatoria en los pacientes después de la resección hepática (Caruana J.A. et al., 1986), se desconoce su contribución al daño y regeneración tras la cirugía. Los resultados de la presente tesis indican que tanto la administración de lípidos como de glucosa, puede aumentar la capacidad regenerativa del hígado no esteatósico. En presencia de esteatosis, los lípidos son más eficientes que los carbohidratos para la regeneración del hígado remanente tras la cirugía. Es importante destacar que, en algunos pacientes que sufren de enfermedad hepática severa y mala digestión se evidencia una mala absorción de lípidos, y por tanto está contraindicada la administración lipídica por vía enteral (Holecek M., 1999). La administración intravenosa de emulsiones lipídicas puede resolver este problema. Por otra parte, antes del uso clínico del tratamiento lipídico vía parenteral en la cirugía hepática, se deben tener en cuenta

algunas consideraciones. El tratamiento lipídico podría aumentar los ácidos grasos libres que pueden tener efectos hepatotóxicos (Haus J.M. et al., 2009, Mirtallo J.M. et al., 2010, Postuma R. et al., 1979). Se han observado muertes en lactantes prematuros tras la infusión parenteral de lípidos debido a las bajas concentraciones de la lipoproteína lipasa en estos niños, que se traduce en una deficiente depuración de la emulsión lipídica intravenosa y un aumento en consecuencia en las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres (Mirtallo J.M. et al., 2010, Postuma R. et al., 1979). Estos efectos nocivos se asocian principalmente a la dosis utilizada y la administración intravenosa de la emulsión lipídica durante periodos prolongados de tiempo, hecho que no ocurre con el tipo de tratamiento lipídico utilizado en la presente tesis. De todos modos, las concentraciones de lípidos deben ser monitorizadas tras la administración por vía intravenosa de emulsiones lipídicas en los pacientes que presentan un elevado riesgo de hipertrigliceridemia. Si se toman estas precauciones, los clínicos pueden reducir en los pacientes el riesgo de los posibles efectos adversos inducidos con la emulsión lipídica intravenosa (Mirtallo J.M. et al., 2010, Postuma R. et al., 1979).

Siguiendo con los objetivos de la presente tesis, evaluamos la relevancia de las adipocitoquinas tales como la resistina y la visfatina en condiciones de PH bajo I/R. Hasta el momento de la presente tesis no existían estudios en los que se hubiera evaluado los niveles de estas adipocitoquinas en hígados esteatósicos y no esteatósicos sometidos a PH bajo I/R. Nuestros resultados indicaron que no se observaron cambios en ninguna de estas adipocitoquinas cuando los hígados no esteatósicos se sometieron a cirugía hepática. Por otro lado, se observó un aumento en la expresión de resistina cuando los hígados esteatósicos fueron sometidos a PH bajo oclusión vascular. Se pueden plantear dos hipótesis para explicar el por qué se detectó la resistina en el hígado tras un proceso de PH bajo I/R. De acuerdo con la primera hipótesis, la resistina procedente de la circulación puede ser recaptada por las células hepáticas. En función de la segunda hipótesis, el hígado puede generar la resistina por sí mismo sin necesidad de la circulación sistémica. Nuestro estudio evidencia un aumento en la expresión tanto de mRNA como en los niveles proteicos de la resistina en los hígados esteatósicos, niveles altos de esta adipocitoquina a nivel sistémico y no modificaciones en los niveles de tales adipocitoquinas en el TAB. Estos resultados sugieren que el hígado por sí mismo genera resistina tras la cirugía hepática y la libera a la circulación sistémica. Al contrario de los que ocurre con la resistina, en los animales Ob sometidos a PH+I/R, aumentó la capacidad del TAB para producir visfatina, lo cual puede explicar el elevado nivel de la visfatina circulante observado en estos animales tras la cirugía.

Atendiendo a nuestros resultados, los hígados esteatósicos no pueden ser los responsables de los niveles elevados de visfatina circulantes. De hecho, se observaron niveles reducidos de visfatina (tanto a nivel de mRNA como de proteína) en hígados esteatósicos tras la PH +I/R al compararlo con los animales del grupo Sham, lo cual puede ser fácilmente atribuible a alteraciones en la generación hepática de tal adipocitoquina como consecuencia de la cirugía hepática. Nuestros resultados están en consonancia con datos anteriormente descritos en la literatura en corazón que indican que la proteína y los niveles de mRNA de la visfatina se reducen bajo condiciones de estrés (Hsu C.P. et al., 2009).

Hasta el momento de la presente tesis, se desconocían los efectos de las estrategias basadas en la modulación de la acción de la resistina o de la visfatina en la lesión y el fallo regenerativo en los hígados sometidos a la PH bajo I/R. Nuestros resultados indican que ni la resistina ni la visfatina desempeñan un papel crucial en los hígados no esteatósicos. En consonancia con tales resultados, estrategias farmacológicas encaminadas a regular tales adipocitoquinas fueron irrelevantes en hígados no esteatósicos. Sin embargo, esto no ocurre en presencia de esteatosis. Nuestros resultados sugieren la relevancia clínica de fármacos que bloquean las acciones de la visfatina en hígados esteatósicos sometidos PH+I/R. Muestran además por primera vez que el aumento en los niveles de resistina observado en los hígados esteatósicos sometidos a PH+I/R puede ser un mecanismo compensatorio para mantener bajos los niveles hepáticos de visfatina. De hecho, evidenciamos la importancia de mantener bajos los niveles de visfatina en hígados esteatósicos para protegerlos frente al daño y el fallo en la regeneración. Además, el bloqueo farmacológico de las acciones de la visfatina en hígados derivó en una protección frente a la lesión y fallo en la regeneración hepática.

En la presente tesis proponemos un posible mecanismo para explicar por qué la resistina endógena mantiene bajos los niveles de visfatina en los hígados esteatósicos. Es poco probable que la acumulación de visfatina observada en los hígados esteatósicos tras la inhibición de la resistina pueda ser atribuida a un aumento en la generación de visfatina por el hígado esteatósico. La administración de anticuerpos frente a la resistina no modificó los niveles de mRNA de la visfatina en el hígado esteatósico. Sin embargo, el bloqueo de la resistina favoreció la liberación de visfatina desde el TAB a la circulación, la cual fue captada por el hígado esteatósico. En tales condiciones, se observó una acumulación de visfatina en el hígado, pero no en plasma ni en el TAB en el grupo tratado con anticuerpos anti-resistina indicando que la visfatina acumulada en el

hígado esteatósico derivó del TAB. Este supuesto fue confirmado ya que no se observó acumulación de visfatina en el hígado cuando se realizó la lipectomía del TAB.

Se requieren estudios para discernir cómo la visfatina puede ser captada por los hígados esteatósicos. A pesar de que se desconocen los receptores específicos o transportadores de la visfatina en células hepáticas (Skokowa J. et al., 2009), es posible que la visfatina (con una actividad enzimática intacta) pueda ser captada por el hígado esteatósico por un mecanismo de transporte. Se sabe que la visfatina actúa como un enzima encargado de la biosíntesis del NAD a nivel intracelular pero no es enzimáticamente activo en la circulación sistémica (Hara N. et al., 2011). Además, se ha sugerido que la visfatina circulante puede igualmente entrar en el cerebro probablemente a través de un mecanismo de transporte activo desconocido (Hallschmid M. et al., 2009).

A continuación, se investigó el por qué la inhibición de la acción de la visfatina es crucial para proteger los hígados esteatósicos en condiciones de PH bajo I/R. Los efectos nocivos de la visfatina no se deben a sus actividades pro-inflamatorias ya que la modulación farmacológica de la acción de la visfatina no indujo cambios en ningún parámetro bioquímico inflamatorio (TNF, IL1, MDA, acumulación de neutrófilos, edema, etc). Nuestros resultados son los primeros que indican que la visfatina puede funcionar como una enzima encargado de la biosíntesis del NAD en hígados esteatósicos sometidos a PH+I/R. Esto podría explicar, al menos parcialmente, los efectos perjudiciales de la visfatina tras la cirugía hepática. De hecho, los altos niveles de visfatina observados en los hígados esteatósicos se asociaron con elevados niveles de NAD, aumento en el daño hepático y mayores problemas regenerativos. En consecuencia, la inhibición de la visfatina se asoció con niveles bajos de NAD y protección frente a la lesión y fallo en la regeneración del hígado esteatósico. Los cambios en los niveles de visfatina no estuvieron asociados a cambios en el metabolismo lipídico. Los valores de TGs, LDL, HDL y de reguladores claves del metabolismo lipídico (CPT2, MCAD, FGF21, SCD1 y FAS) fueron similares en hígados esteatósicos tratados o no con moduladores farmacológicos de la visfatina. Además, atendiendo a los resultados de citocromo C oxidasa, caspasa 8, expresión de Cox1 y Cox4, GPX1 y SOD2, la visfatina no indujo alteraciones en la función mitocondrial. Para entender los efectos perjudiciales de la visfatina, se han de tener en cuenta las siguientes observaciones. En primer lugar, la GDH es un enzima de la matriz mitocondrial que desempeña un papel importante en la modulación del catabolismo de aminoácidos en el hígado. El GDH cataliza la deshidrogenación de glutamato en α -cetoglutarato y en NH_4^+ , con el NAD^+ como cofactor, y su activación en el hígado conduce a hiperamonemia. En el

hígado, NH_4^+ entra en el ciclo de la urea y entonces arginina induce la formación de la urea y la producción de NO (Cohen B.D. et al., 2003). Nuestros resultados indican que la visfatina (gracias a la síntesis del NAD) aumenta la actividad de GDH y esto se asoció con niveles elevados de NH_4^+ , de arginina y aumento de la producción de NO. Es importante destacar el efecto perjudicial del NO en el daño hepático asociado a la PH+I/R debido a la formación de ONOO^- , resultado de la combinación del NO con los radicales O_2^- (Ramalho F.S. et al., 2009). Además, la propia urea es responsable de la acidificación extracelular (Bessems M. et al., 2006), y el NH_4^+ es muy perjudicial debido a los cambios en el pH celular, en el sistema lisosomal de los hepatocitos y en las alteraciones en el equilibrio osmótico (Shawcross D.L. et al., 2008). Hay que considerar también que evaluamos la regeneración hepática tras 24 horas después de la cirugía hepática, y se sabe que el período comprendido entre 16-28 h después de PH es un período de rápida síntesis de DNA (Ferris G.M., Clark J.B., 1971). Por consiguiente, proponemos que durante esta fase de regeneración, la visfatina podría estar favoreciendo la síntesis de NAD en lugar de la síntesis de DNA. De hecho, existe una correlación inversa entre el contenido de NAD y el contenido de DNA (Ferris G.M., Clark J.B., 1971). Así pues, atendiendo a nuestros resultados, se requieren estrategias que inhiban la acción de la visfatina para proteger a los hígados esteatósicos sometidos a PH+I/R ya que la visfatina podría favorecer la síntesis de NAD en lugar de DNA. Este hecho se debe a la competencia de precursores y cofactores comunes a las dos vías sintéticas tales como el ATP y la adenina.

En conclusión, y tal y como se muestra en la figura 15 y 16, la presente tesis establece nuevas vías de señalización en hígados esteatósicos y no esteatósicos sometidos a PH bajo oclusión vascular y evidencia nuevos fármacos y vías de acción terapéutica para reducir la lesión y el fallo en la regeneración que presentan los hígados, especialmente los esteatósicos al someterlos a cirugía hepática.

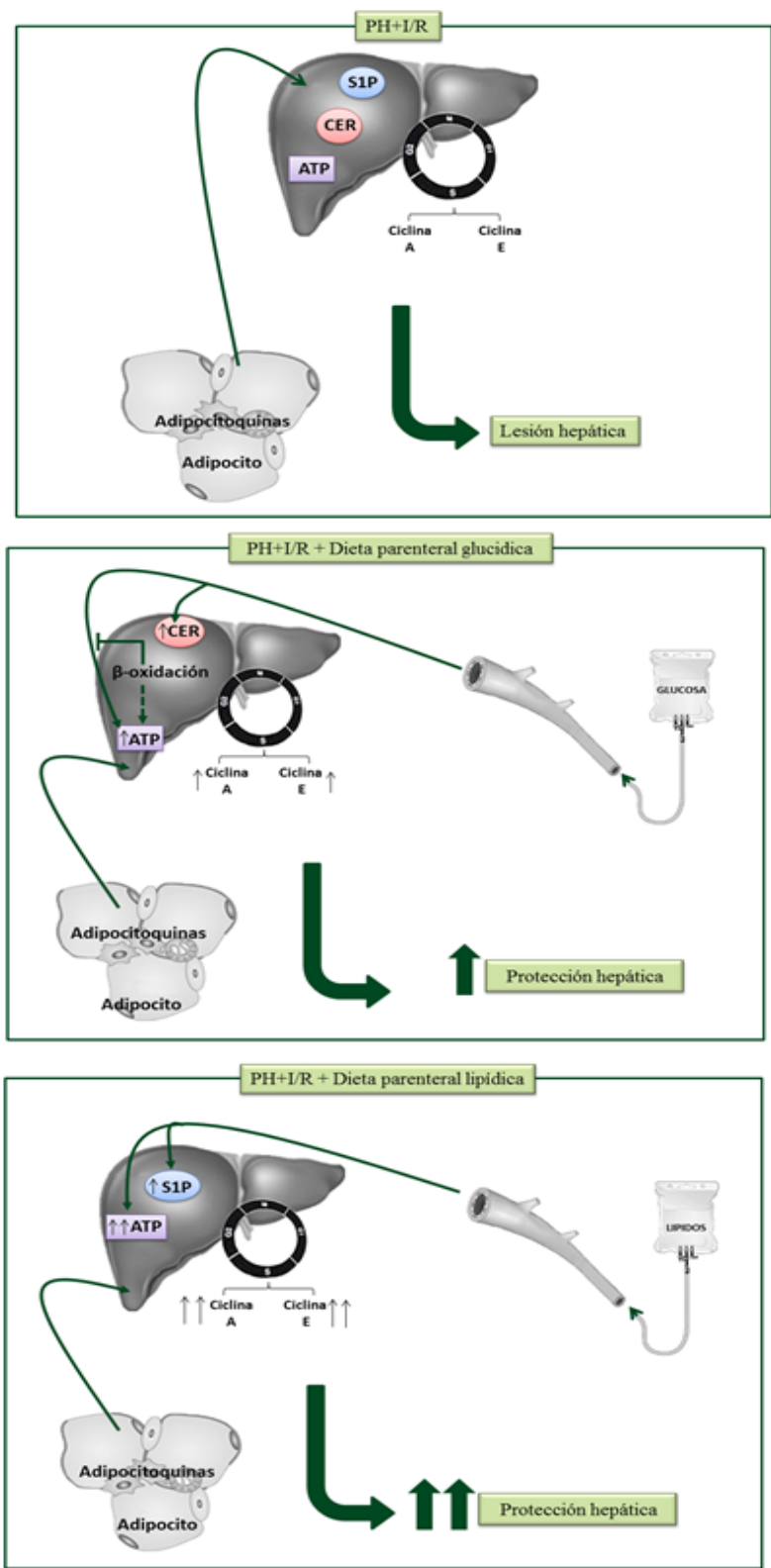


Figura 15. Representación esquemática que muestra el potencial de los lípidos y de la glucosa como tratamientos terapéuticos en hígados esteatósicos sometidos a resección hepática con oclusión vascular (Estudio 1). S1P: esfingosina-1-fosfato, CER: ceramida, ATP: trifosfato de adenosina, PH+I/R: hepatectomía parcial bajo oclusión vascular.

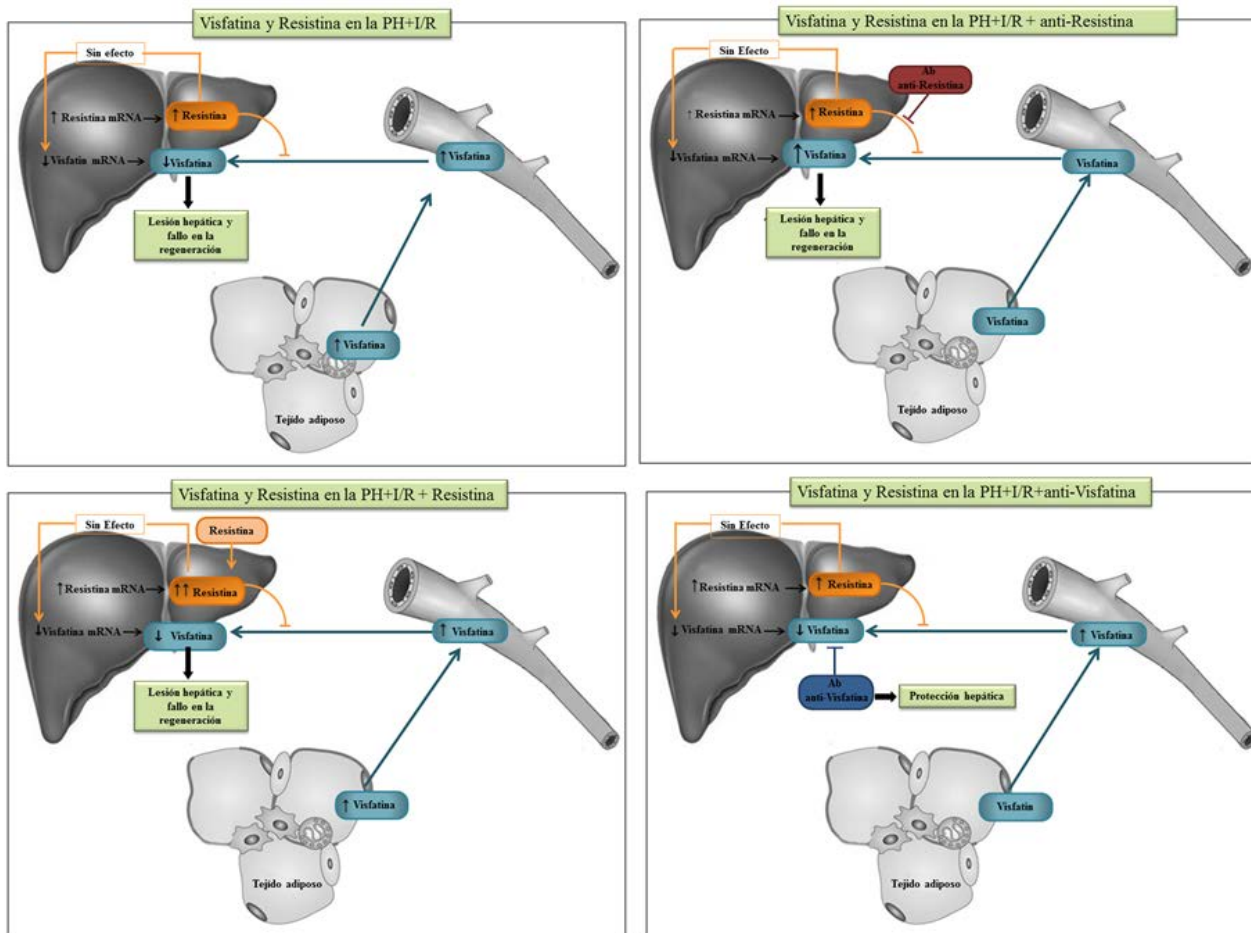


Figura 16. Representación esquemática que muestra el potencial de regulación resistina-visfatina en las diferentes condiciones experimentales en hígados esteatósicos sometidos a resección hepática con oclusión vascular (Estudio 2). PH+I/R: hepatectomía parcial bajo oclusión vascular, Ab: anticuerpo

CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente tesis son las siguientes:

Los hígados no esteatósicos son capaces de regenerarse tras un proceso de PH bajo oclusión vascular sin la necesidad del tejido adiposo. Sin embargo, los hígados esteatósicos requieren el tejido adiposo durante la regeneración más como fuente de diferentes hormonas esenciales para la regeneración que como fuente de energía.

El tratamiento con glucosa o lípidos protegen con la misma eficacia a los hígados no esteatósicos sometidos a cirugía. Por el contrario, se observa un efecto diferencial de ambos tratamientos nutricionales sobre la lesión y regeneración en presencia de esteatosis.

El tratamiento con glucosa aumentó la regeneración pero no protegió a los hígados esteatósicos frente a la lesión, debido en parte a su efecto sobre las CERs. Sin embargo, el tratamiento con lípidos protegió a los hígados esteatósicos frente a la lesión y fallo en la regeneración y la respuesta regenerativa fue más evidente que la ofrecida con el tratamiento glucídico.

La mayor eficacia del tratamiento lipídico en los hígados esteatósicos se atribuye a mejoras en el mantenimiento del metabolismo energético y en la regulación de la síntesis de factores de crecimiento, aumento en la síntesis de fosfolípidos y a una aceleración de la regeneración durante las fases G1-S del ciclo celular.

Los hígados no esteatósicos no generan adipocitoquinas como la resistina y la visfatina al someterlos a PH bajo oclusión vascular. Por otra parte, los hígados esteatósicos generan resistina tras la cirugía hepática y acumulan visfatina procedente del tejido adiposo.

Las estrategias farmacológicas encaminadas a regular la resistina o visfatina son irrelevantes en hígados no esteatósicos. Sin embargo, el bloqueo farmacológico de la visfatina protege al hígado esteatósico frente a la lesión y fallo en la regeneración tras la cirugía.

Los hígados esteatósicos mantienen elevados los niveles de resistina endógenos como un mecanismo compensatorio para mantener bajos los niveles hepáticos de visfatina y evitar sus efectos nocivos sobre la lesión y regeneración.

La inhibición de la acción de la visfatina es crucial para proteger los hígados esteatósicos en condiciones de PH bajo I/R porque la visfatina puede funcionar como un enzima encargado de la biosíntesis de NAD.

La visfatina tras la cirugía hepática aumenta la actividad de glutión dehidrogenasa y esto se asoció con niveles elevados de NH_4^+ , de arginina y aumento en la producción de óxido nítrico, con efectos nocivos derivados de la formación de peroxinitrito. La visfatina favorece además la síntesis de NAD en lugar de DNA debido a la competencia de precursores y cofactores comunes a las dos vías sintéticas.

BIBLIOGRAFIA

- Ahima R.S., Flier J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000; 11(8):327-32.
- Akira S., Sato S. Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis* 2003; 35:555-562.
- Alkhoury N., Dixon L.J., Feldstein A.E. Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009; 3(4):445-51.
- Alesse E., Zazzeroni F., Angelucci A., Giannini G., Di Marcotullio L., Gulino A. The growth arrest and downregulation of c-myc transcription induced by ceramide are related events dependent on p21 induction, Rb underphosphorylation and E2F sequestering. *Cell Death Differ.* 1998; 5(5):381-9.
- Aller R., de Luis D.A., Izaola O., Sagrado M.G., Conde R., Velasco M.C., Alvarez T., Pacheco D., González J.M.. Influence of visfatin on histopathological changes of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci.* 2009; 54(8):1772-7.
- Amersi F., Farmer D.G., Shaw G.D., Kato H., Coito A.J., Kaldas F., Zhao D., Lassman C.R., Melinek J., Ma J., Volk H.D., Kupiec-Weglinski J.W., Busuttill R.W. P-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig)-mediated blockade of CD62 selectin molecules protects rat steatotic liver grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant.* 2002; 2(7):600-8.
- Amersi F., Shen X.D., Moore C., Melinek J., Busuttill R.W., Kupiec-Weglinski J.W., Coito A.J. Fibronectin-alpha 4 beta 1 integrin-mediated blockade protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2003; 162(4):1229-39.
- Anderson S.P., Yoon L., Richard E.B., Dunn C.S., Cattley R.C., Corton J.C. Delayed liver regeneration in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null mice. *Hepatology.* 2002; 36(3):544-54.
- Atkinson L.L., Kelly S.E., Russell J.C., Bar-Tana J., Lopaschuk G.D. MEDICA 16 inhibits hepatic acetyl-CoA carboxylase and reduces plasma triacylglycerol levels in insulin-resistant JCR: LA-cp rats. *Diabetes.* 2002; 51(5):1548-55.
- Bae S.K., Kim S.R., Kim J.G., Kim J.Y., Koo T.H., Jang H.O., Yun I., Yoo M.A., Bae M.K.. Hypoxic induction of human visfatin gene is directly mediated by hypoxia-inducible factor-1. *FEBS Lett.* 2006; 580(17):4105-13.
- Bahr M.J., Ockenga J., Böker K.H., Manns M.P., Tietge U.J. Elevated resistin levels in cirrhosis are associated with the proinflammatory state and altered hepatic glucose metabolism but not with insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291:E199-E206.
- Baykal A., Kaynaroğlu V., Demirpençe E., Kiliç K., Sayek I., Sanaç Y. Experimental study of the effect of adrenaline tolerance on intestinal ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 1998; 85(7):947-950.
- Behrns K.E., Tsiotos G.G., DeSouza N.F., Krishna M.K., Ludwig J., Nagorney D.M. Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg.* 1998; 2(3):292-8.
- Beier J.I., Guo L., von Montfort C., Kaiser J.P., Joshi-Barve S., Arteel G.E. New role of resistin in lipopolysaccharide-induced liver damage in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 325(3):801-8.
- 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(1):38-46.
- Bessems M., 't Hart N.A., Tolba R., Doorschodt B.M., Leuvenink H.G., Ploeg R.J., Minor T., van Gulik T.M. The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim* 2006; 40(3):236-46.
- Bhabak K.P., Kleuser B., Huwiler A., Arenz C. Effective inhibition of acid and neutral ceramidases by novel B-13 and LCL-464 analogues. *Bioorg Med Chem.* 2013; 21(4):874-82.

- Bhattacharya N., Dufour J.M., Vo M.N., Okita J., Okita R., Kim K.H. Differential effects of phthalates on the testis and the liver. *Biol Reprod* 2005; 72(3):745-754.
- Biasi F., Bosco M., Chiappino I., Chiarpotto E., Lanfranco G., Ottobrelli A., Massano G., Donadio P.P., Vaj M., Andorno E., et al. Oxidative damage in human liver transplantation. *Free Radic Biol Med*. 1995; 19(3):311-7.
- Blachnio-Zabielska A., Baranowski M., Zabielski P., Gorski J. Effect of high fat diet enriched with unsaturated and diet rich in saturated fatty acids on sphingolipid metabolism in rat skeletal muscle. *J Cell Physiol*. 2010; 225(3):786-91.
- Blancas-Flores G., Almanza-Pérez J. C., López-Roa R. I., Alarcón-Aguilar F. J.r, García-Macedo R., Cruz M. I. La obesidad como un proceso inflamatorio. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* [revista en la Internet]. 2010; 67(2): 88-97.
- Bokarewa M., Nagaev I., Dahlberg L., Smith U., Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol*. 2005; 174(9):5789-95.
- Bowlby S.C., Thomas M.J., D'Agostino R.B. Jr, Kridel S.J. Nicotinamide phosphoribosyl transferase (Nampt) is required for de novo lipogenesis in tumor cells. *PLoS One*. 2012; 7(6):e40195.
- Brasaemle D.L. Cell biology. A metabolic push to proliferate. *Science*. 2006 Sep 15;313(5793):1581-2.
- Bray G.A. The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc* 1977;36(2):148-153.
- Burnett M.S., Lee C.W., Kinnaird T.D., Stabile E., Durrani S., Dullum M.K., Devaney J.M., Fishman C., Stamou S., Canos D., Zbinden S., Clavijo L.C., Jang G.J., Andrews J.A., Zhu J., Epstein S.E. The potential role of resistin in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2005; 182(2):241-8.
- Burr A.W., Toole K., Chapman C., Hines J.E., Burt A.D. Anti-hepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration. *J Pathol*. 1998; 185(3):298-302.
- Busso N., Karababa M., Nobile M., Rolaz A., Van Gool F., Galli M., Leo O., So A., De Smedt T. Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin enzymatic activity identifies a new inflammatory pathway linked to NAD. *PLoS One*. 2008; 3(5):e2267.
- Calabro P., Samudio I., Willerson J.T., Yeh E.T. Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation*. 2004; 110(21):3335-40.
- Campbell J.S., Riehle K.J., Brooling J.T., Bauer R.L., Mitchell C., Fausto N. Proinflammatory cytokine production in liver regeneration is Myd88-dependent, but independent of Cd14, Tlr2, and Tlr4. *J Immunol*. 2006; 176(4):2522-8
- Caraceni P., Nardo B., Domenicali M., Turi P., Vici M., Simoncini M., De Maria N., Trevisani F., Van Thiel D.H., Derenzini M., Cavallari A., Bernardi M. Ischemia-reperfusion injury in rat fatty liver: role of nutritional status. *Hepatology*. 1999; 29(4):1139-46.
- Caraceni P., Bianchi C., Domenicali M., Maria Pertosa A., Maiolini E., Parenti Castelli G., Nardo B., Trevisani F., Lenaz G., Bernardi M. Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat fatty liver exposed to preservation-reperfusion injury. *J Hepatol* 2004; 41(1):82-88.
- Caraceni P., Domenicali M., Vendemiale G., Grattagliano I., Pertosa A., Nardo B., Morselli-Labate A.M., Trevisani F., Palasciano G., Altomare E., Bernardi M. The reduced tolerance of rat fatty liver to ischemia reperfusion is associated with mitochondrial oxidative injury. *J Surg Res*. 2005; 124(2):160-8.

- Caruana J.A., Whalen D.A. Jr, Anthony W.P., Sunby C.R., Ciechoski M.P. Paradoxical effects of glucose feeding on liver regeneration and survival after partial hepatectomy. *Endocr Res.* 1986; 12(2):147-56.
- Casillas-Ramírez A., Mosbah I.B., Franco-Gou R., Rimola A., Roselló-Catafau J., Peralta C. Ischemia-reperfusion syndrome associated with liver transplantation: an update. *Gastroenterol Hepatol.* 2006; 29(5):306-13. **(2006a)**
- Casillas-Ramírez A., Mosbah I.B., Ramalho F., Roselló-Catafau J., Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci.* 2006; 79(20):1881-94 **(2006b)**.
- Casillas-Ramírez A., Alfany-Fernández I., Massip-Salcedo M., Juan M.E., Planas J.M., Serafín A., Pallàs M., Rimola A., Rodés J., Peralta C. Retinol-binding protein 4 and peroxisome proliferator-activated receptor- α in steatotic liver transplantation. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 338(1):143–153.
- Casillas-Ramírez A., Amine-Zaouali M., Massip-Salcedo M., Padriša-Altés S., Bintanel-Morcillo M., Ramalho F., Serafín A., Rimola A., Arroyo V., Rodés J., Roselló-Catafau J., Peralta C. Inhibition of angiotensin II action protects rat steatotic livers against ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med.* 2008; 36(4):1256-66.
- Catalán V., Gómez-Ambrosi J., Rodríguez A., Ramírez B., Silva C., Rotellar F., Cienfuegos J.A., Salvador J., Frühbeck G. Association of increased visfatin/PBEF/NAMPT circulating concentrations and gene expression levels in peripheral blood cells with lipid metabolism and fatty liver in human morbid obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011; 21(4):245-53.
- Chanda S., Mehendale H.M. Nutritional impact on the final outcome of liver injury inflicted by model hepatotoxicants: effect of glucose loading. *FASEB J.* 1995; 9(2):240-5.
- Chang Y.C., Chang T.J., Lee W.J., Chuang L.M. The relationship of visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor/nicotinamide phosphoribosyltransferase in adipose tissue with inflammation, insulin resistance, and plasma lipids. *Metabolism.* 2010; 59(1):93-9.
- Chapman M.J., Assmann G., Fruchart J.C., Shepherd J., Sirtori C; European Consensus Panel on HDL-C. Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid—a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. *Curr Med Res Opin.* 2004; 20(8):1253-68.
- Chavin K.D., Yang S., Lin H.Z., Chatham J., Chacko V.P., Hoek J.B., Walajtys-Rode E., Rashid A., Chen C.H., Huang C.C., Wu T.C., Lane M.D., Diehl A.M. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J BiolChem* 1999; 274(9):5692-5700.
- Chen M.P., Chung F.M., Chang D.M., Tsai J.C., Huang H.F., Shin S.J., Lee Y.J. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(1):295-9.
- Clavien P.A., Harvey P.R., Strasberg S.M. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation.* 1992; 53(5):957-78.
- Cohen B.D. Methyl group deficiency and guanidino production in uremia. *Mol Cell Biochem* 2003; 244(1-2):31-6.
- Cohn JS, Wat E, Kamili A, Tandy S. Dietary phospholipids, hepatic lipid metabolism and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2008 Jun;19(3):257-62.
- Colletti L.M., Burtch G.D., Remick D.G., Kunkel S.L., Strieter R.M., Guice K.S., Oldham K.T., Campbell D.A. The production of tumor necrosis factor α and the development of a pulmonary capillary injury following hepatic ischemia/reperfusion. *Transplantation* 1990; 49(2):268-272.

- Cortez-Pinto H., Zhi Lin H., Qi Yang S., Odwin Da Costa S., Diehl A.M. Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1999; 116(5):1184-1193.
- Cottart C.H., Do L., Blanc M.C., Vaubourdolle M., Descamps G., Durand D., Galen F.X., Clot J.P. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology*. 1999 Mar; 29(3):809-13.
- Crowley H., Lewis W.D., Gordon F., Jenkins R., Khettry U. Steatosis in donor and transplant liver biopsies. *Hum Pathol*. 2000; 31(10):1209-13.
- Curzio M., Esterbauer H., Dianzani M.U. Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. *Int J Tissue React*. 1985; 7(2):137-42.
- Cutrin J.C., Boveris A., Zingaro B., Corvetti G., Poli G. In situ determination by surface chemiluminescence of temporal relationships between evolving warm ischemia-reperfusion injury in rat liver and phagocyte activation and recruitment. *Hepatology* 2000;31(3):622-632.
- Czaja M.J. Liver injury in the setting of steatosis: crosstalk between adipokine and cytokine. *Hepatology* 2004; 40(1):19-22.
- Day C.P., James O.F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998 Apr;114(4):842-5.
- Dbaibo G.S., Pushkareva M.Y., Jayadev S., Schwarz J.K., Horowitz J.M., Obeid L.M., Hannun Y.A. Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(5):1347-51.
- Desdouets C., Thoresen G.H., Senamaud-Beaufort C., Christoffersen T., Brechot C., Sobczak-Thépot J. cAMP-dependent positive control of cyclin A2 expression during G1/S transition in primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 261(1):118-22.
- Diesen D.L., Kuo P.C. Nitric oxide and redox regulation in the liver: Part I. General considerations and redox biology in hepatitis. *J Surg Res*. 2010; 162(1):95-109.
- Dolbeare F., Gratzner H., Pallavicini M.G., Gray J.W. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80(18):5573-7.
- Eldor J., Kotlovker V. Intralipid treatment: Is it only the tip of an iceberg? A new suggestion: Bone cement implantation syndrome (BCIS). *J Anesthesiol Clin Sci* 2012; 1: 1–7.
- Elias-Miró M., Jiménez-Castro M.B., Rodés J., Peralta C. Current knowledge on oxidative stress in hepatic ischemia/reperfusion. *Free Radic Res*. 2013 Aug;47(8):555-68.
- Elias-Miró M, Jiménez Castro M, Peralta C.. Capítulo: Ischemia-Reperfusion Injury Associated with Liver Transplantation in 2011: Past and Future. Libro: Liver Transplantation – Basic Issues. InTech 1st edición. **(2012a)**.
- Elias-Miró M., Massip-Salcedo M., Raila J., Schweigert F., Mendes-Braz M., Ramalho F., Jiménez-Castro M.B., Casillas-Ramírez A., Bermudo R., Rimola A., Rodés J., Peralta C. Retinol binding protein 4 and retinol in steatotic and nonsteatotic rat livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia/reperfusion. *Liver Transpl* 2012; 18(10):1198–1208. **(2012 b)**
- Elias-Miró M., Massip-Salcedo M., Raila J., Schweigert F., Mendes-Braz M., Ramalho F., Jiménez-Castro M.B., Casillas-Ramírez A., Bermudo R., Rimola A., Rodés J., Peralta C. Retinol binding protein 4 and retinol in steatotic and nonsteatotic rat livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia/reperfusion. *Liver Transpl*. 2012; 18(10):1198-208.

- Ellett J.D., Atkinson C., Evans Z.P., Amani Z., Balish E., Schmidt M.G., Schnellmann R.G., Chavin K.D. Toll-like receptor 4 knockout mice are protected from endothelial overactivation in the absence of Kupffer cells after total hepatic ischemia/reperfusion. *Liver Transpl* 2011; 17(9):1089-1098.
- 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(3):250-8.
- Ezaki H., Yoshida Y., Saji Y., Takemura T., Fukushima J., Matsumoto H., Kamada Y., Wada A., Igura T., Kihara S., Funahashi T., Shimomura I., Tamura S., Kiso S., Hayashi N. Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adiponectin knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Jan 2;378(1):68-72
- Fausto, N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32:19-31.
- Fausto N., Campbell J.S., Riehle K.J. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S45-53.
- Ferguson D.M., Gores G.J., Ludwig J., Krom R.A. UW solution protects against reperfusion injury by inhibiting lipid peroxidation. *Transplant Proc*. 1991; 23(1 Pt 2):1552-3.
- Fernández M.A., Albor C., Ingelmo-Torres M., Nixon S.J., Ferguson C., Kurzchalia T., Tebar F., Enrich C., Parton R.G., Pol A. Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science*. 2006; 313(5793):1628-32.
- Ferris G.M., Clark J.B. Nicotinamide nucleotide synthesis in regenerating rat liver. *Biochem J*. 1971; 121(4):655-62.
- Fernyhough M.E., Hausman G.J., Guan L.L., Okine E., Moore S.S., Dodson M.V. Mature adipocytes may be a source of stem cells for tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 368(3):455-7.
- Filippatos T.D., Derdemezis C.S., Kiortsis D.N., Tselepis A.D., Elisaf M.S. Increased plasma levels of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obese and overweight patients with metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2007; 30(4):323-6.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226(1):497-509..
- Fondevila C., Shen X.D., Moore C., Busuttill R.W., Coito A.J. Cyclic RGD peptides with high affinity for alpha5beta1 integrin protect genetically fat Zucker rat livers from cold ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2005; 37(4):1679-81.
- Fromenty B., Berson A., Pessayre D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *J Hepatol* 1997; 26 (Suppl 1):13-22.
- Fukumori T., Ohkohchi N., Tsukamoto S., Satomi S. Why is fatty liver unsuitable for transplantation? Deterioration of mitochondrial ATP synthesis and sinusoidal structure during cold preservation of a liver with steatosis. *Transplant Proc* 1997; 29(1-2):412-415.
- Fukumori T., Ohkohchi N., Tsukamoto S., Satomi S. The mechanism of injury in a steatotic liver graft during cold preservation. *Transplantation*. 1999; 67(2):195-200.
- Fukuhara A., Matsuda M., Nishizawa M., Segawa K., Tanaka M., Kishimoto K., Matsuki Y., Murakami M., Ichisaka T., Murakami H., Watanabe E., Takagi T., Akiyoshi M., Ohtsubo T., Kihara S., Yamashita S., Makishima M., Funahashi T., Yamanaka S., Hiramatsu R., Matsuzawa Y., Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 2005; 307(5708):426-30.
- Garcea G., Maddern G.J. Liver failure after major hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2009; 16(2):145-55.

- Garden O.J., Rees M., Poston G.J., Mirza D., Saunders M., Ledermann J., Primrose J.N., Parks R.W. Guidelines for resection of colorectal cancer liver metastases. *Gut*. 2006; 55 Suppl 3:iii1-8.
- Gazit V., Weymann A., Hartman E., Finck B.N., Hruz P.W., Tzekov A., Rudnick D.A. Liver regeneration is impaired in lipodystrophic fatty liver dystrophy mice. *Hepatology*. 2010; 52(6):2109-17.
- Goetze O., Steingoetter A., Menne D., van der Voort I.R., Kwiatek M.A., Boesiger P., Weishaupt D., Thumshirn M., Fried M., Schwizer W. The effect of macronutrients on gastric volume responses and gastric emptying in humans: A magnetic resonance imaging study. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 292(1):G11-7.
- Goto T., Takeuchi S., Miura K., Ohshima S., Mikami K., Yoneyama K., Sato M., Shibuya T., Watanabe D., Kataoka E., Segawa D., Endo A., Sato W., Yoshino R., Watanabe S. Suramin prevents fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality through the suppression of NF-kappaB activity. *Cytokine*. 2006; 33(1):28-35.
- Gómez-Quiroz L.E., Factor V.M., Kaposi-Novak P., Coulouarn C., Conner E.A., Thorgeirsson S.S. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 2008; 283(21):14581-9.
- Gong Q., Zhang H., Li J.H., Duan L.H., Zhong S., Kong X.L., Zheng F., Tan Z., Xiong P., Chen G., Fang M., Gong F.L. High-mobility group box 1 exacerbates concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J Mol Med (Berl)* 2010; 88:1289-1298.
- Gonzalez-Gay M.A., Vazquez-Rodriguez T.R., Garcia-Unzueta M.T., Berja A., Miranda-Filloo J.A., de Matias J.M., Gonzalez-Juanatey C., Llorca J. Visfatin is not associated with inflammation or metabolic syndrome in patients with severe rheumatoid arthritis undergoing anti-TNF-alpha therapy. *Clin Exp Rheumatol*. 2010; 28(1):56-62.
- Gratzner H.G. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*. 1982; 218(4571):474-5.
- Grisham J.W. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res*. 1962; 22:842-9.
- Guisado-Requena IM, Guisado-Barrilao R. El tejido adiposo como órgano de secreción interna. *Scientia*, 2009, 14(1): 87-93.
- Hakamada K., Sasaki M., Takahashi K., Umehara Y., Konn M. Sinusoidal flow block after warm ischemia in rats with diet-induced fatty liver. *J Surg Res* 1997; 70(1):12-20.
- Hallemeesch M.M., Janssen B.J., de Jonge W.J., Soeters P.B., Lamers W.H., Deutz N.E. NO production by cNOS and iNOS reflects blood pressure changes in LPS-challenged mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 285(4):E871-5.
- Hallschmid M., Randeve H., Tan B., Kern W., Lehnert H. Relationship between cerebrospinal fluid visfatin (PBEF/Nampt) levels and adiposity in humans. *Diabetes* 2009; 58(3):637-40.
- Hara N., Yamada K., Shibata T., Osago H., Tsuchiya M. Nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin does not catalyze nicotinamide mononucleotide formation in blood plasma. *PLoS One* 2011; 6(8):e22781.
- Harvey P.R., Iu S., McKeown C.M., Petrunka C.N., Ilson R.G., Strasberg S.M. Adenine nucleotide tissue concentrations and liver allograft viability after cold preservation and warm ischemia. *Transplantation*. 1988; 45(6):1016-20.
- Haus J.M., Kashyap S.R., Kasumov T., Zhang R., Kelly K.R., Defronzo R.A., Kirwan J.P. Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes*. 2009; 58(2):337-43.

- Hausman D.B., DiGirolamo M., Bartness T.J., Hausman G.J., Martin R.J. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev.* 2001; 2(4):239-54.
- Hausman D.B., Lu J., Ryan D.H., Flatt W.P., Harris R.B. Compensatory growth of adipose tissue after partial lipectomy: involvement of serum factors. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004; 229(6):512-20.
- Havel P.J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes.* 2004; 53 Suppl 1:S143-51.
- Hayashi M., Tokunaga Y., Fujita T., Tanaka K., Yamaoka Y., Ozawa K. The effects of cold preservation on steatotic graft viability in rat liver transplantation. *Transplantation* 1993; 56(2):282-287.
- Hayashi M., Fujii K., Kiuchi T., Uryuhara K., Kasahara M., Takatsuki M., Takeichi T., Kitade H., Sugimoto T., Uemoto S., Asonuma K., Egawa H., Fujita S., Inomata Y., Tanaka K. Effects of fatty infiltration of the graft on the outcome of living-related liver transplantation. *Transplant Proc.* 1999; 31(1-2):403.
- Hayes N.L., Nowakowski R.S. Exploiting the dynamics of S-phase tracers in developing brain: interkinetic nuclear migration for cells entering versus leaving the S-phase. *Dev Neurosci.* 2000;22(1-2):44-55.
- Hisama N., Yamaguchi Y., Ishiko T., Miyanari N., Ichiguchi O., Goto M., Mori K., Watanabe K., Kawamura K., Tsurufuji S., Ogawa M. Kupffer cell production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia/reperfusion injury in rats. *Hepatology.* 1996; 24(5):1193-8.
- Holecek M., Simek J. Different effects of glucose and intralipid on the onset of liver regeneration in the early period after partial hepatectomy in the rat. *Exp Pathol.* 1988; 33(4):257-60.
- Holecek M. Nutritional modulation of liver regeneration by carbohydrates, lipids, and amino acids: a review. *Nutrition.* 1999;15(10):784-8.
- Hong F., Radaeva S., Pan H.N., Tian Z., Veech R., Gao B. Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver disease. *Hepatology.* 2004;40(4):933-41.
- Hong S.B., Huang Y., Moreno-Vinasco L., Sammani S., Moitra J., Barnard J.W., Ma S.F., Mirzapourzadeh T., Evenoski C., Reeves R.R., Chiang E.T., Lang G.D., Husain A.N., Dudek S.M., Jacobson J.R., Ye S.Q., Lussier Y.A., Garcia J.G. Essential role of pre-B-cell colony enhancing factor in ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 178(6):605-17.
- Horrobin D.F. Is the main problem in free radical damage caused by radiation, oxygen and other toxins the loss of membrane essential fatty acids rather than the accumulation of toxic materials? *Med Hypotheses* 1991; ;35(1):23-6.
- Hortelano S., Genaro A., Boscá L. Phorbol esters induce nitric oxide synthase activity in rat hepatocytes. Antagonism with the induction elicited by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1992; 267(35):24937-24940.
- Hortelano S., Zeini M., Casado M., Martín-Sanz P., Boscá L. Animal models for the study of liver regeneration: role of nitric oxide and prostaglandins. *Front Biosci.* 2007; 12:13-21.
- Hsu C.P., Oka S., Shao D., Hariharan N., Sadoshima J. Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through NAD⁺ synthesis in cardiac myocytes. *Circ Res* 2009; 105:481–491.
- Huguet C., Gavelli A., Chieco P.A., Bona S., Harb J., Joseph J.M., Jobard J., Gramaglia M., Lasserre M. Liver ischemia for hepatic resection: where is the limit? *Surgery.* 1992; 111(3):251-9.
- Hui A.M., Kawasaki S., Makuuchi M., Nakayama J., Ikegami T., Miyagawa S. Liver injury following normothermic ischemia in steatotic rat liver. *Hepatology* 1994; 20(5):1287-1293

- Hwang J.H., Kim D.W., Jo E.J., Kim Y.K., Jo Y.S., Park J.H., Yoo S.K., Park M.K., Kwak T.H., Kho Y.L., Han J., Choi H.S., Lee S.H., Kim J.M., Lee I., Kyung T., Jang C., Chung J., Kweon G.R., Shong M. Pharmacological stimulation of NADH oxidation ameliorates obesity and related phenotypes in mice. *Diabetes*. 2009; 58(4):965-74.
- Ido A., Moriuchi A., Marusawa H., Ikeda K., Numata M., Yamaji N., Setoyama H., Ida H., Oketani M., Chiba T., Tsubouchi H. Translational research on HGF: A phase I/II study of recombinant human HGF for the treatment of fulminant hepatic failure. *Hepatol Res*. 2008; 38 Suppl 1:S88-92.
- Ido A., Moriuchi A., Numata M., Murayama T., Teramukai S., Marusawa H., Yamaji N., Setoyama H., Kim I.D., Chiba T., Higuchi S., Yokode M., Fukushima M., Shimizu A., Tsubouchi H. Safety and pharmacokinetics of recombinant human hepatocyte growth factor (rh-HGF) in patients with fulminant hepatitis: a phase I/II clinical trial, following preclinical studies to ensure safety. *J Transl Med*. 2011;9:55.
- Jaeschke H., Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991;260 (3 Pt 1):G355-G362 (1991a).
- Jaeschke H., Bautista A.P., Spolarics Z., Spitzer J.J. Superoxide generation by Kupffer cells and priming neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic Res Commun* 1991; 15(5):277-284 (1991b).
- Jaeschke H. Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem Biol Interact* 1991; 79(2):115-136 (1991c).
- Jaeschke H., Bautista A.P., Spolarics Z., Spitzer J.J. Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukoc Biol*. 1992; 52(4):377-82.
- Jaeschke H., Farhood A., Bautista A.P., Spolarics Z., Spitzer J.J., Smith C.W. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology*. 1993; 17(5):915-23.
- Jaeschke H., Lemasters J.J. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*. 2003; 125(4):1246-57.
- Jayadev S., Liu B., Bielawska A.E., Lee J.Y., Nazaire F., Pushkareva MYu, Obeid L.M., Hannun Y.A. Role for ceramide in cell cycle arrest. *J Biol Chem*. 1995 ; 270(5):2047-52.
- Japtok L., Schaper K., Bäumer W., Radeke H.H., Jeong S.K., Kleuser B. Sphingosine 1-phosphate modulates antigen capture by murine Langerhans cells via the S1P2 receptor subtype. *PLoS One*. 2012; 7(11):e49427..
- Jarrar M.H., Baranova A., Collantes R., Ranard B., Stepanova M., Bennett C., Fang Y., Elariny H., Goodman Z., Chandhoke V., Younossi Z.M. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008; 27(5):412-21.
- Jaumot M., Estanyol J.M., Serratos J., Agell N., Bachs O. Activation of cdk4 and cdk2 during rat liver regeneration is associated with intranuclear rearrangements of cyclin-cdk complexes. *Hepatology*. 1999; 29(2):385-95.
- Jiang N., Zhang X., Zheng X., Chen D., Zhang Y., Siu L.K., Xin H.B., Li R., Zhao H., Riordan N., Ichim T.E., Quan D., Jevnikar A.M., Chen G., Min W. Targeted gene silencing of TLR4 using liposomal nanoparticles for preventing liver ischemia reperfusion injury. *Am J Transplant* 2011; 11(9):1835-1844.
- Jiménez-Castro M.B., 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(12):3257-71.

- Jiménez-Castro M.B., 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.* 2013 ; 59(6):1208-14.
- Jiménez-Pérez M., Ibarra-González I., Fernández-Lainez C., Ruiz-García M., Vela-Amieva M. Hiperamonemia en la edad pediátrica. Estudio de 72 casos. *Acta Pediatr Mex* 2013; 35:268-274.
- Jornayvaz F.R., Birkenfeld A.L., Jurczak M.J., Kanda S., Guigni B.A., Jiang D.C., Zhang D., Lee H.Y., Samuel V.T., Shulman G.I. Hepatic insulin resistance in mice with hepatic overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(14):5748-52.
- Jung H.S., Park K.H., Cho Y.M., Chung S.S., Cho H.J., Cho S.Y., Kim S.J., Kim S.Y., Lee H.K., Park K.S. Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2006; 69(1):76-85.
- Kamisoyama H., Honda K., Tominaga Y., Yokota S., Hasegawa S. Investigation of the anti-obesity action of licorice flavonoid oil in diet-induced obese rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008; 72(12):3225-31.
- Kang J.W., Koh E.J., Lee S.M. Melatonin protects liver against ischemia and reperfusion injury through inhibition of toll-like receptor signaling pathway. *J Pineal Res* 2011; 50(4):403-11.
- Kang L.I., Mars W.M., Michalopoulos G.K.. Signals and cells involved in regulating liver regeneration. *Cells.* 2012; 1(4):1261-92.
- 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(4):2716-21.
- Kariv R., Enden A., Zvibel I., Rosner G., Brill S., Shafritz D.A., Halpern Z., Oren R. Triiodothyronine and interleukin-6 (IL-6) induce expression of HGF in an immortalized rat hepatic stellate cell line. *Liver Int.* 2003; 23(3):187-93.
- Kaser S., Moschen A., Cayon A., Kaser A., Crespo J., Pons-Romero F., Ebenbichler C.F., Patsch J.R., Tilg H. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2005; 54(1):117-21. 31.
- Kaita K.D., Pettigrew N., Minuk G.Y. Hepatic regeneration in humans with various liver disease as assessed by Ki-67 staining of formalin-fixed paraffin-embedded liver tissue. *Liver* 1997, 17(1):13-16.
- Kershaw E.E., Flier J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6):2548-56.
- Kitazawa T., Tsujimoto T., Kawaratani H., Fukui H. Salvage effect of E5564, toll-like receptor 4 antagonist on d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced acute liver failure in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25(5):1009-12.
- Klover P.J., Mooney R.A. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(5):753-8.
- Küllenberg D., Taylor L.A., Schneider M., Massing U. Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis.* 2012; 11:3.
- Koniaris L.G., McKillop I.H. Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg.* 2003; 197(4):634-59.
- Koneru B., Reddy M.C., dela Torre A.N., Patel D., Ippolito T., Ferrante R.J. Studies of hepatic warm ischemia in the obese Zucker rat. *Transplantation.* 1995; 59(7):942-6.
- Kosenko E., Felipo V., Montoliu C., Grisolia S., Kaminsky Y. Effects of acute hyperammonemia in vivo on oxidative metabolism in nonsynaptic rat brain mitochondria. *Metab Brain Dis.* 1997 Mar; 12(1):69-82. (1997a)

- Kosenko E., Kaminsky Y., Kaminsky A., Valencia M., Lee L., Hermenegildo C., Felipe V. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Radic Res.* 1997; 27(6):637-44. (1997b)
- Kosenko E., Kaminsky Y., Stavroskaya I.G., Felipe V. Alteration of mitochondrial calcium homeostasis by ammonia-induced activation of NMDA receptors in rat brain in vivo. *Brain Res.* 2000; 880(1-2):139-46.
- Kusminsky C.M., McTernan P., Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and type II diabetes. *Clinical Science* 2005; 109:243-256.
- Ledda-Columbano G.M., Curto M., Piga R., Zedda A.I., Menegazzi M., Sartori C., Shinozuka H., Bluethmann H., Poli V., Ciliberto G., Columbano A. In vivo hepatocyte proliferation is inducible through a TNF and IL-6-independent pathway. *Oncogene.* 1998; 27;17(8):1039-44.
- Lee D.G., Bell S.P. ATPase switches controlling DNA replication initiation. *Curr Opin Cell Biol.* 2000; 12(3):280-5.
- Lee W.J., Wu C.S., Lin H., Lee I.T., Wu C.M, Tseng JJ, Chou MM, Sheu WH. Visfatin-induced expression of inflammatory mediators in human endothelial cells through the NF-kappaB pathway. *Int J Obes (Lond).* 2009; 33(4):465-72.
- Lehrke M., Reilly M.P., Millington S.C., Iqbal N., Rader D.J., Lazar M.A. An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS Med.* 2004; 1(2):e45.
- Lentsch A.B., Kato A., Yoshidome H., McMasters K.M., Edwards M.J. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* 2000; 32(2):169-73.
- Letteron P., Fromenty B., Terris B., Degott C., Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol.* 1996; 24(2):200-8.
- Li X., Klintman D., Liu Q., Sato T., Jeppsson B., Thorlacius H. Critical role of CXC chemokines in endotoxemic liver injury in mice. *J Leukoc Biol.* 2004; 75(3):443-52.
- Li Y., Wang Y., Li Q., Chen Y., Sun S.Z., Zhang W.D., Jia Q. Effect of resistin on vascular endothelium secretion dysfunction in rats. *Endothelium.* 2007; 14(4-5):207-14.
- Liangos O., Domhan S., Schwager C., Zeier M., Huber P.E., Addabbo F., Goligorsky M.S., Hlatky L., Jaber B.L., Abdollahi A. Whole blood transcriptomics in cardiac surgery identifies a gene regulatory network connecting ischemia reperfusion with systemic inflammation. *PLoS One.* 2010; 5(10):e13658.
- Liu C.M., Zheng G.H., Ming Q.L., Sun J.M., Cheng C. Protective effect of quercetin on lead-induced oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in rat liver via the IRE1/JNK and PI3K/Akt pathway. *Free Radic Res.* 2013; 47(3):192-201.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 2001; 25(4):402-408.
- Longato L., Tong M., Wands J.R., de la Monte S.M. High fat diet induced hepatic steatosis and insulin resistance: Role of dysregulated ceramide metabolism. *Hepatol Res.* 2012; 42(4):412-27.
- Luiking Y.C., Ten Have G.A., Wolfe R.R., Deutz N.E. Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012; 303(10):E1177-89.
- 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(2):155-8.

- Man K., Zhao Y., Xu A., Lo C.M., Lam K.S., Ng K.T., Ho J.W., Sun C.K., Lee T.K., Li X.L., Fan S.T. Man K., Ng K.T., Lee T.K., Lo C.M., Sun C.K., Li X.L., Zhao Y., Ho J.W., Fan S.T. FTY720 attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in normal and cirrhotic livers. *Am J Transplant* 2005; 5(1):40-49.
- Man K., Zhao Y., Xu A., Lo C.M., Lam K.S., Ng K.T., Ho J.W., Sun C.K., Lee T.K., Li X.L., Fan S.T. Fat-derived hormone adiponectin combined with FTY720 significantly improves small-for-size fatty liver graft survival. *Am J Transplant* 2006; 6(3):467-476.
- Malik R., Selden C., Hodgson H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol.* 2002; 13(6):425-31.
- Mandal P., Roychowdhury S., Park P.H., Pratt B.T., Roger T., Nagy L.E. Adiponectin and heme oxygenase-1 suppress TLR4/MyD88-independent signaling in rat Kupffer cells and in mice after chronic ethanol exposure. *J Immunol* 2010; 185:4928-4937.
- Marletta M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell.* 1994; 78(6):927-30.
- Marra F., Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology* 2009; 50(3):957-969.
- Martinez-Mier G., Toledo-Pereyra L.H., McDuffie J.E., Warner R.L., Ward P.A. Neutrophil depletion and chemokine response after liver ischemia and reperfusion. *J Invest Surg.* 2001; 14(2):99-107.
- Maruyama H., Harada A., Kurokawa T., Kobayashi H., Nonami T., Nakao A., Takagi H. Duration of liver ischemia and hepatic regeneration after hepatectomy in rats. *J Surg Res.* 1995; 58(3):290-4.
- Massip-Salcedo M., Roselló-Catafau J., Prieto J., Avila M.A., Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int* 2007; 27(1):6-16.
- Massip-Salcedo M., Zaouali M.A., Padriisa-Altés S., Casillas-Ramirez A., Rodés J., Roselló-Catafau J., Peralta C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha inhibits the injurious effects of adiponectin in rat steatotic liver undergoing ischemia-reperfusion. *Hepatology* 2008; 47(2):461-472.
- Matsuda A., Yang W.L., Jacob A., Aziz M., Matsuo S., Matsutani T., Uchida E., Wang P. FK866, a Visfatin Inhibitor, Protects Against Acute Lung Injury After Intestinal Ischemia-Reperfusion in Mice via NF-κB Pathway. *Ann Surg.* 2014; 259(5):1007-17.
- Mayoral P., Criado M., Hidalgo F., Flores O., Arévalo M.A., Eleno N., Sánchez-Rodríguez A., López-Novoa J.M., Esteller A. Effects of chronic nitric oxide activation or inhibition on early hepatic fibrosis in rats with bile duct ligation. *Clin Sci (Lond).* 1999; 96(3):297-305.
- McCormack L., Dutkowski P., El-Badry A.M., Clavien P.A. Liver transplantation using fatty livers: always feasible? *J Hepatol* 2011; 54(5):1055-1062.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394-397.
- Michalopoulos G.K. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J.* 1990; 4(2):176-87.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science.* 1997; 276(5309):60-6.
- Michalopoulos G.K. Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 2007; 213(2):286-300.
- Miki C., Iriyama K., Mirza D.F., Mayer A.D., Buckels J.A., Suzuki H., McMaster P. Postperfusion energy metabolism of steatotic graft and its relation to early graft viability following liver transplantation. *Dig Dis Sci* 1998; 43(1):74-79.

- Mirtallo J.M., Dasta J.F., Kleinschmidt K.C., Varon J. State of the art review: Intravenous fat emulsions: Current applications, safety profile, and clinical implications. *Ann Pharmacother.* 2010; 44(4):688-700.
- 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(2):235-8.
- Montecucco F., Bauer I., Braunersreuther V., Bruzzone S., Akhmedov A., Lüscher T.F., Speer T., Poggi A., Mannino E., Pelli G., Galan K., Bertolotto M., Lenglet S., Garuti A., Montessuit C., Lerch R., Pellieux C., Vuilleumier N., Dallegri F., Mage J., Sebastian C., Mostoslavsky R., Gayet-Ageron A., Patrone F., Mach F., Nencioni A. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase reduces neutrophil-mediated injury in myocardial infarction. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18(6):630-41.
- Morstyn G., Hsu S.M., Kinsella T., Gratzner H., Russo A., Mitchell J.B. Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody. *J Clin Invest.* 1983; 72(5):1844-50.
- 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(29):11960-5.
- Müller M.J., Rieger A., Willmann O., Lautz H.U., Balks H.J., Von Zur Mühlen A., Canzler H., Schmidt F.W. Metabolic responses to lipid infusions in patients with liver cirrhosis. *Clin Nutr.* 1992; 11(4):193-206.
- Nagayama M., Takai T., Okuno M., Umeyama K. Fat emulsion in surgical patients with liver disorders. *J Surg Res.* 1989; 47(1):59-64.
- Nakatani T, Ozawa K, Asano M, Ukikusa M, Kamiyama Y, Tobe T. Differences in predominant energy substrate in relation to the resected hepatic mass in the phase immediately after hepatectomy. *J Lab Clin Med.* 1981; 97(6):887-98.
- Nakatani T, Yasuda K, Ozawa K, Kawashima S, Tobe T. Effects of (+)-octanoylcarnitine on deoxyribonucleic acid synthesis in regenerating rabbit liver. *Clin Sci (Lond).* 1982; 62(3):295-7.
- 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(6):588-610.
- Nakano H., Nagasaki H., Barama A., Boudjema K., Jaeck D., Kumada K., Tatsuno M., Baek Y., Kitamura N., Suzuki T., Yamaguchi M. The effects of N-acetylcysteine and anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody against ischemia-reperfusion injury of the rat steatotic liver produced by a choline-methionine-deficient diet. *Hepatology.* 1997; 26(3):670-8.
- Nardo B., Grattagliano I., Domenicali M., Caraceni P., Catena F., Santoni B., Turi P., Cavallari G., Dall'Agata M., Trevisani F., Bernardi M., Cavallari A. Mitochondrial oxidative injury in rat fatty livers exposed to warm ischemia-reperfusion. *Transplant Proc* 2000; 32(1):51.
- Nardo B., Caraceni P., Pasini P., Domenicali M., Catena F., Cavallari G., Santoni B., Maiolini E., Grattagliano I., Vendemiale G., Trevisani F., Roda A., Bernardi M., Cavallari A. Increased generation of reactive oxygen species in isolated rat fatty liver during postischemic reoxygenation. *Transplantation.* 2001; 71(12):1816-20.
- Nelson L., Cox M. 2006. Integración y regulación hormonal del metabolismo de los mamíferos. En: *Principios de bioquímica de Lehninger.* Ed. Omega. Pp: 881-922.
- Newberry E.P., Kennedy S.M., Xie Y., Luo J., Stanley S.E., Semenkovich C.F., Croke R.M., Graham M.J., Davidson N.O. Altered hepatic triglyceride content after partial hepatectomy without impaired liver regeneration in multiple murine genetic models. *Hepatology.* 2008; 48(4):1097-105.

- Neumeier M., Hellerbrand C., Gäbele E., Buettner R., Bollheimer C., Weigert J., Schäffler A., Weiss T.S., Lichtenauer M., Schölmerich J., Buechler C. Adiponectin and its receptors in rodent models of fatty liver disease and liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(34):5490-4. 30.
- Newberry E.P., Xie Y., Kennedy S., Han X., Buhman K.K., Luo J., Gross R.W., Davidson N.O. Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid-binding protein gene. *J Biol Chem.* 2003; 278(51):51664-72.
- 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(2):185.
- Nokhbehsaim M, Keser S, Jäger A, Jepsen S, Deschner J. Regulation of regenerative periodontal healing by NAMPT. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:202530.
- Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes.* 2006; 55 Suppl 2:S16-23.
- Oberhammer F., Bursch W., Parzefall W., Breit P., Erber E., Stadler M., Schulte-Hermann R. Effect of transforming growth factor beta on cell death of cultured rat hepatocytes. *Cancer Res.* 1991; 51(9):2478-85.
- Oberhammer F.A., Pavelka M., Sharma S., Tiefenbacher R., Purchio A.F., Bursch W., Schulte-Hermann R. Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(12):5408-12.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2):351-358
- de Oliveira M.R., Soares Oliveira M.W., Müller Hoff M.L., Behr G.A., da Rocha R.F., Fonseca Moreira J.C. Evaluation of redox and bioenergetics states in the liver of vitamin A-treated rats. *Eur J Pharmacol.* 2009; 610(1-3):99-105.
- O'Neill L.A., Bowie A.G. The family of five: TIRdomain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:353-364.
- Pagano C., Soardo G., Pilon C., Milocco C., Basan L., Milan G., Donnini D., Faggian D., Mussap M., Plebani M., Avellini C., Federspill G., Sechi L.A., Vettor R. Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(3):1081–1086.
- Palmero E., Ricart D., Llobera M., Peinado-Onsurbe J. Partial hepatectomy and/or surgical stress provoke changes in the expression of lipoprotein lipase and actin in liver and extrahepatic tissues. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1441(1):61-8.
- Palestino-Domínguez M., Clavijo-Cornejo D., Gutiérrez-Ruiz M.C., Gómez-Quiroz L.E. El factor de crecimiento de hepatocitos y su receptor c-met en la protección contra el daño hepático inducido por el alcohol. *REB* 31(4): 118-126, 2012.
- Park B.S., Jin S.H., Park J.J., Park J.W., Namgoong I.S., Kim Y.I., Lee B.J., Kim J.G. Visfatin induces sickness responses in the brain. *PLoS One.* 2011; 6(1):e15981.
- Park P.H., Thakur V., Pritchard M.T., McMullen M.R., Nagy L.E. Regulation of Kupffer cell activity during chronic ethanol exposure: role of adiponectin. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(suppl 3):S30-S33.
- Peralta C., Hotter G., Closa D., Prats N., Xaus C., Gelpi E., Rosello-Catafau J. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 1999; 29(1):126-132.

- Peralta C., Fernández L., Panés J., Prats N., Sans M., Piqué J.M., Gelpí E., Roselló-Catafau J. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 2001; 33(1):100-113.
- Peralta C., Jiménez-Castro M.B., Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol* 2013;59:1094-1106.
- Perón J.M.R., López J.R.M., López Y.T. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cub Med Mil [revista en la Internet]*. 2001; 30(1): 15-20.
- Ploeg R.J., D'Alessandro A.M., Knechtle S.J., Stegall M.D., Pirsch J.D., Hoffmann R.M., Sasaki T., Sollinger H.W., Belzer F.O., Kalayoglu M. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation—a multivariate analysis. *Transplantation*. 1993; 55(4):807-13.
- Polyzos S.A., Kountouras J., Zavos C., Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab*. 2010; 12:365-383.
- Postuma R., Trevenen C.L. Liver disease in infants receiving total parenteral nutrition. *Pediatrics*. 1979; 63(1):110-5.
- Promrat K., Longato L., Wands J.R., de la Monte S.M. Weight loss amelioration of non-alcoholic steatohepatitis linked to shifts in hepatic ceramide expression and serum ceramide levels. *Hepatol Res*. 2011; 41(8):754-62.
- Puigserver P., Rhee J., Donovan J., Walkey C.J., Yoon J.C., Oriente F., Kitamura Y., Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*. 2003; 423(6939):550-5.
- Rabes H.M., Wirsching R., Tucek H.V., Iseler G. Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet*. 1976; 9(6):517-32.
- Rai R.M., Yang S.Q., McClain C., Karp C.L., Klein A.S., Diehl A.M. Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Am J Physiol*. 1996; 270(6 Pt 1):G909-18.
- Rajpathak S.N., Kaplan R.C., Wassertheil-Smoller S., Cushman M., Rohan T.E., McGinn A.P., Wang T., Strickler H.D., Scherer P.E., Mackey R., Curb D., Ho G.Y. Resistin, but not adiponectin and leptin, is associated with the risk of ischemic stroke among postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative. *Stroke*. 2011; 42(7):1813-20.
- Ramalho F.S., 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(1):130-40.
- Rao M.S., Reddy JK. The effect of microvesicular fatty change on liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepato-gastroenterology*. 2000; 47(34):912-5.
- Rashid A., Wu T.C., Huang C.C., Chen C.H., Lin H.Z., Yang S.Q., Lee F.Y., Diehl A.M. Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology* 1999; 29(4):1131-1138.
- Reddy R.R., Srinivasan K. Dietary fenugreek and onion attenuate cholesterol gallstone formation in lithogenic diet-fed mice. *Int J Exp Pathol*. 2011; 92(5):308-19.
- Reilly P.M., Schiller H.J., Bulkley G.B. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg*. 1991; 161(4):488-503.

- Revollo J., Korner A., Mills K. Nampt/PBEF/visfatin regulates insulin secretion in β cell as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metabolism* 2007; 6:363-375.
- Ricci C., Longo R., Gioulis E., Bosco M., Pollesello P., Masutti F., Croce L.S., Paoletti S., de Bernard B., Tiribelli C., Dalla Palma L. Noninvasive in vivo quantitative assessment of fat content in human liver. *J Hepatol* 1997; 27(1):108-113.
- Romacho T., Azcutia V., Vázquez-Bella M., Matesanz N., Cercas E., Nevado J., Carraro R., Rodríguez-Mañas L., Sánchez-Ferrer C.F., Peiró C. Extracellular PBEF/NAMPT/visfatin activates pro-inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *Diabetologia*. 2009; 52(11):2455-63.
- Rongvaux A., Shea R.J., Mulks M.H., Gigot D., Urbain J., Leo O., Andris F. Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur J Immunol*. 2002; 32(11):3225-34.
- Rothwell S.E., Richards A.M., Pemberton C.J. Resistin worsens cardiac ischaemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 349(1):400-7.
- Russell W.E., Coffey R.J. Jr, Ouellette A.J., Moses H.L. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85(14):5126-30.
- Sachithanandan N., Graham K.L., Galic S., Honeyman J.E., Fynch S.L., Hewitt K.A., Steinberg G.R., Kay T.W.. Macrophage deletion of SOCS1 increases sensitivity to LPS and palmitic acid and results in systemic inflammation and hepatic insulin resistance. *Diabetes*. 2011; 60(8):2023-31.
- Saile B., DiRocco P., Dudas J., El-Armouche H., Sebb H., Eisenbach C., Neubauer K., Ramadori G. IGF-I induces DNA synthesis and apoptosis in rat liver hepatic stellate cells (HSC) but DNA synthesis and proliferation in rat liver myofibroblasts (rMF). *Lab Invest*. 2004; 84(8):1037-49.
- Savage D.B., Sewter C.P., Klenk E.S., Segal D.G., Vidal-Puig A., Considine R.V., O'Rahilly S. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*. 2001; 50(10):2199-202.
- Schaffler A., Scholmerich J., Buchler C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue-emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2:273-280.
- Schliess F., Görg B., Fischer R., Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J*. 2002; 16(7):739-41.
- Schmekel B., Karlsson S.E., Linden M., Sundstrom C., Tegner H., Venge P. Myeloperoxidase in human lung lavage. I. A marker of local neutrophil activity. *Inflammation* 1990; 14(4):447-450.
- Segawa K., Fukuhara A., Hosogai N., Morita K., Okuno Y., Tanaka M., Nakagawa Y., Kihara S., Funahashi T., Komuro R., Matsuda M., Shimomura I. Visfatin in adipocytes is upregulated by hypoxia through HIF1 α -dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 349(3):875-82.
- Seifalian A.M., Chidambaram V., Rolles K., Davidson B.R. In vivo demonstration of impaired microcirculation in steatotic human liver grafts. *Liver Transpl Surg* 1998; 4(1):71-77.
- Selzner M., Camargo C.A., Clavien P.A. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6. *Hepatology*. 1999; 30(2):469-75.

- Selzner M., Rüdiger H.A., Sindram D., Madden J., Clavien P.A.. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology*. 2000; 32(6):1280-8.
- Selzner M., Clavien P.A. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin Liver Dis*. 2001; 21(1):105-13.
- Selzner N., Selzner M., Jochum W., Clavien P.A. Ischemic preconditioning protects the steatotic mouse liver against reperfusion injury: an ATP dependent mechanism. *Hepatology*. 2003; 39(1):55-61 (2003a).
- Selzner N., Selzner M., Odermatt B., Tian Y., Van Rooijen N., Clavien P.A. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-alpha/IL-6 in mice. *Gastroenterology*. 2003; 124(3):692-700 (2003b).
- Selzner M., Selzner N., Jochum W., Graf R., Clavien P.A. Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATP-dependent mechanism. *Liver Transpl*. 2007; 13(3):382-90.
- Sekine S., Gutiérrez P.J., Lan B.Y., Feng S., Hebrok M. Liver-specific loss of beta-catenin results in delayed hepatocyte proliferation after partial hepatectomy. *Hepatology*. 2007; 45(2):361-8.
- 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(2):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*. 2004; 39(3):688-98.
- Shaki F., Hosseini M.J., Ghazi-Khansari M., Pourahmad J. Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1820(12):1940-50.
- Shawcross D.L., Wright G.A., Stadlbauer V., Hodges S.J., Davies N.A., Wheeler-Jones C., Pitsillides A.A., Jalan R. Ammonia impairs neutrophil phagocytic function in liver disease. *Hepatology*. 2008; 48(4):1202-12.
- Shen X.D., Ke B., Zhai Y., Gao F., Tsuchihashi S., Lassman C.R., Busuttill R.W., Kupiec-Weglinski J.W. Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in the donor organ reduces ischemia and reperfusion injury in a murine liver transplantation model. *Liver Transpl* 2007; 13(10):1435-1443.
- Shen X.D., Ke B., Uchida Y., Ji H., Gao F., Zhai Y., Busuttill R.W., Kupiec-Weglinski J.W. Native macrophages genetically modified to express heme oxygenase 1 protect rat liver transplants from ischemia/reperfusion injury. *Liver Transpl* 2011;17(2):201-210.
- Shi H., Kokoeva M.V., Inouye K., Tzameli I., Yin H., Flier J.S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006; 116(11):3015-25.
- Shi H., Strader A.D., Woods S.C., Seeley R.J. Sexually dimorphic responses to fat loss after caloric restriction or surgical lipectomy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 293(1):E316-26.
- Shteyer E., Liao Y., Muglia L.J., Hruz P.W., Rudnick D.A. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology*. 2004; 40(6):1322-32.
- Shu R.Z., Zhang F., Wang F., Feng D.C., Li X.H., Ren W.H., Wu X.L., Yang X., Liao X.D., Huang L., Wang Z.G. Adiponectin deficiency impairs liver regeneration through attenuating STAT3 phosphorylation in mice. *Lab Invest*. 2009; 89(9):1043-52.
- Simek J., Mělka J., Pospíšil M., Neradilková M. Effect of protracted glucose infusion on the development of early biochemical changes and initiation of regeneration in rat liver after partial hepatectomy. *Physiol Bohemoslov*. 1965; 14(4):366-70.

- Skokowa J., Lan D., Thakur B.K., Wang F., Gupta K., Cario G., Brechlin A.M., Schambach A., Hinrichsen L., Meyer G., Gaestel M., Stanulla M., Tong Q., Welte K. NAMPT is essential for the G-CSF-induced myeloid differentiation via NAD⁺-sirtuin-1-dependent pathway. *Nat Med* 2009; 15:151–158.
- Soeda J., Miyagawa S., Sano K., Masumoto J., Taniguchi S., Kawasaki S. Cytochrome c release into cytosol with subsequent caspase activation during warm ischemia in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 281(4):G1115-23.
- Soltys K., Dikdan G., Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology*. 2001; 34(1):13-8.
- Srinivasan S.R., Chow C.K., Glauert H.P. Effect of the peroxisome proliferator ciprofibrate on hepatic DNA synthesis and hepatic composition following partial hepatectomy in rats. *Toxicology*. 1990; 62(3):321-32.
- Stanley C.A. Hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome: insights into the regulatory role of glutamate dehydrogenase in ammonia metabolism. *Mol Genet Metab*. 2004; 81 Suppl 1:S45-51.
- Steppan C.M., Bailey S.T., Bhat S., Brown E.J., Banerjee R.R., Wright C.M., Patel H.R., Ahima R.S., Lazar M.A. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001; 409(6818):307-12.
- Steppan C.M., Lazar M.A. The current biology of resistin. *J Intern Med*. 2004; 255(4):439-47.
- Stienstra R., Saudale F., Duval C., Keshtkar S., Groener J.E., van Rooijen N., Staels B., Kersten S., Müller M. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology*. 2010; 51(2):511-22.
- Su G.L., Wang S.C., Aminlari A., Tipoe G.L., Steinstraesser L., Nanji A. Impaired hepatocyte regeneration in toll-like receptor 4 mutant mice. *Dig Dis Sci*. 2004; 49(5):843-9.
- Subramanian V., Rothenberg A., Gomez C., Cohen A.W., Garcia A., Bhattacharyya S., Shapiro L., Dolios G., Wang R., Lisanti M.P., Brasaemle D.L. Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 2004; 279(40):42062-71.
- Suganami T., Tanimoto-Koyama K., Nishida J., Itoh M., Yuan X., Mizuarai S., Kotani H., Yamaoka S., Miyake K., Aoe S., Kamei Y., Ogawa Y. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(1):84-91.
- Sun C.K., Zhang X.Y., Zimmermann A., Davis G., Wheatley A.M.. Effect of ischemia-reperfusion injury on the microcirculation of the steatotic liver of the Zucker rat. *Transplantation*. 2001; 72(10):1625-31.
- Sun R., Jaruga B., Kulkarni S., Sun H., Gao B. IL-6 modulates hepatocyte proliferation via induction of HGF/p21cip1: regulation by SOCS3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 338(4):1943-9.
- Suzuki S., Nakamura S., Sakaguchi T., Ochiai H., Konno H., Baba S., Baba S. Alteration of reticuloendothelial phagocytic function and tumor necrosis factor-alpha production after total hepatic ischemia. *Transplantation*. 1997; 64(6):821-7.
- Szalowska E., Elferink M.G., Hoek A., Groothuis G.M., Vonk R.J. Resistin is more abundant in liver than adipose tissue and is not up-regulated by lipopolysaccharide. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94(8):3051-7.
- Takeda K., Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17(1):1-14..
- Takebayashi K., Suetsugu M., Wakabayashi S., Aso Y., Inukai T. Association between plasma visfatin and vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2007; 56(4):451-8.

- Tang L., Tian F., Tao W., Cui J. Hepatocellular glycogen in alleviation of liver ischemia-reperfusion injury during partial hepatectomy. *World J Surg.* 2007; 31(10):2039-43.
- Tao R., Wei D., Gao H., Liu Y., DePinho R.A., Dong X.C. Hepatic FoxOs regulate lipid metabolism via modulation of expression of the nicotinamide phosphoribosyltransferase gene. *J Biol Chem.* 2011; 286(16):14681-90.
- Tarkowski A., Bjersing J., Shestakov A., Bokarewa M.I. Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(6B):1419-31.
- Teramoto K., Bowers J.L., Kruskal J.B., Clouse M.E. Hepatic microcirculatory changes after reperfusion in fatty and normal liver transplantation in the rat. *Transplantation.* 1993; 56(5):1076-82.
- Teramoto K., Bowers J.L., Kruskal J.B., Hara J., Iwai T., Endo M., Clouse M.E. In vivo microscopic observation of fatty liver grafts after reperfusion. *Transplant Proc* 1994; 26(4):2391.
- Trevisani F., Colantoni A., Caraceni P., Van Thiel D.H. The use of donor fatty liver for liver transplantation: a challenge or a quagmire? *J Hepatol.* 1996; 24(1):114-21.
- Tijburg L.B., Nyathi C.B., Meijer G.W., Geelen M.J. Biosynthesis and secretion of triacylglycerol in rat liver after partial hepatectomy. *Biochem J.* 1991; 277 (Pt 3):723-8.
- Toshchakov V., Jones B.W., Perera P.Y., Thomas K., Cody M.J., Zhang S., Williams B.R., Major J., Hamilton T.A., Fenton M.J., Vogel S.N. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* 2002; 3(4):392-8.
- Trayhurn P., Beattie J.H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 2001; 60(3):329-39.
- Tsai C.Y., Lin Y.S., Yeh T.S., Cheong C.F., Chang C.H., Chen T.C., Chen M.F. Disrupted hepatic adiponectin signaling impairs liver regeneration of steatotic rats. *Chang Gung Med J.* 2011; 34(3):248-59.
- Tsung A., Hoffman R.A., Izuishi K., Critchlow N.D., Nakao A., Chan M.H., Lotze M.T., Geller D.A., Billiar T.R. Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells. *J Immunol* 2005; 175(11):7661-7668.
- Uchiyama H., Yanaga K., Nishizaki T., Soejima Y., Yoshizumi T., Sugimachi K. Effects of deletion variant of hepatocyte growth factor on reduced-size liver transplantation in rats. *Transplantation.* 1999; 68(1):39-44.
- Ussher J.R., Koves T.R., Cadete V.J., Zhang L., Jaswal J.S., Swyrd S.J., Lopaschuk D.G., Proctor S.D., Keung W., Muoio D.M., Lopaschuk G.D. Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes.* 2010; 59(10):2453-64.
- Vilchis-Landeros M.M., Juárez P., López-Casillas F. El papel fisiopatológico del TGF- β en las nefropatías de diversas etiologías: los inhibidores del TGF- β como agentes terapéuticos potenciales *Gac Méd Méx.* 2003; 139(2): 126 – 143.
- Veteläinen R., van Vliet A., Gouma D.J., van Gulik T.M. Steatosis as a risk factor in liver surgery. *Ann Surg.* 2007; 245(1):20-30.
- Vollmar B., Glasz J., Leiderer R., Post S., Menger M.D. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol.* 1994; 145(6):1421-31.
- Vendemiale G., Grattagliano I., Caraceni P., Caraccio G., Domenicali M., Dall'Agata M., Trevisani F., Guerrieri F., Bernardi M., Altomare E. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 2001; 33(4):808-815.

- Veech R.L., Veloso D., Mehlman M.A. Thiamin deficiency: liver metabolite levels and redox and phosphorylation states in thiamin-deficient rats. *J Nutr.* 1973; 103(2):267-72.
- Véret J., Coant N., Berdyshev E.V., Skobeleva A., Therville N., Bailbé D., Gorshkova I., Natarajan V., Portha B., Le Stunff H. Ceramide synthase 4 and de novo production of ceramides with specific N-acyl chain lengths are involved in glucolipototoxicity-induced apoptosis of INS-1 β -cells. *Biochem J.* 2011; 438(1):177-89.
- Vázquez-Gil M.J., Mesonero M.J., Flores O., Criado M., Hidalgo F., Arévalo M.A., Sánchez-Rodríguez A., Tuñón M.J., López-Novoa J.M., Esteller A. Sequential changes in redox status and nitric oxide synthases expression in the liver after bile duct ligation. *Life Sci.* 2004; 75(6):717-32.
- Xu A., Wang Y., Keshaw H., Xu L.Y., Lam K.S., Cooper G.J. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112(1):91-100.
- Zabielski P., Baranowski M., Błachnio-Zabielska A., Zendzian-Piotrowska M., Górski J. The effect of high-fat diet on the sphingolipid pathway of signal transduction in regenerating rat liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010; 93(3-4):75-83
- Zabielski P., Baranowski M., Zendzian-Piotrowska M., Błachnio-Zabielska A., Górski J. Bezafibrate decreases growth stimulatory action of the sphingomyelin signaling pathway in regenerating rat liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2008; 85(1-2):17-25
- Zhai Y., Shen X.D., O'Connell R., Gao F., Lassman C., Busuttill R.W., Cheng G., Kupiec-Weglinski J.W. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol* 2004; 173(12):7115-9.
- Zhai Y., Qiao B., Shen X.D., Gao F., Busuttill R.W., Cheng G., Platt J.L., Volk H.D., Kupiec-Weglinski J.W. Evidence for the pivotal role of endogenous toll-like receptor 4 ligands in liver ischemia and reperfusion injury. *Transplantation* 2008; 85(7):1016-1022.
- Zhang B.H., Weltman M., Farrell G.C. Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 1999;14(2):133-7.
- 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(6):e66382.
- Zhou M., Xu A., Tam P.K., Lam K.S., Chan L., Hoo R.L., Liu J., Chow K.H., Wang Y. Mitochondrial dysfunction contributes to the increased vulnerabilities of adiponectin knockout mice to liver injury. *Hepatology.* 2008; 48(4):1087-96.
- Zimmermann A. Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant.* 2004; 19 Suppl 4:iv6-10.
- Zimmers T.A., McKillop I.H., Pierce R.H., Yoo JY, Koniaris LG. Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. *Hepatology.* 2003; 38(2):326-34.
- Wada K., Fujimoto K., Fujikawa Y., Shibayama Y., Mitsui H., Nakata K. Sinusoidal stenosis as the cause of portal hypertension in choline deficient diet induced fatty cirrhosis of the rat liver. *Acta Pathol Jpn* 1974; 24(2):207-217.
- 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(4):456-63.
- Walldorf J., Hillebrand C., Aurich H., Stock P., Hempel M., Ebensing S., Fleig W.E., Seufferlein T., Dollinger M.M., Christ B. Propranolol impairs liver regeneration after partial hepatectomy in C57Bl/6-mice by transient

- attenuation of hepatic lipid accumulation and increased apoptosis. *Scand J Gastroenterol.* 2010; 45(4):468-76.
- Wang G., Chen Q.M., Minuk G.Y., Gong Y., Burczynski F.J. Enhanced expression of cytosolic fatty acid binding protein and fatty acid uptake during liver regeneration in rats. *Mol Cell Biochem.* 2004; 262(1-2):41-9.
 - Wang Y., Lam K.S., Chan L., Chan K.W., Lam J.B., Lam M.C., Hoo R.C., Mak W.W., Cooper G.J., Xu A. Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. *J Biol Chem* 2006; 281(24):16391-400.
 - Wang Y., Zhou M., Lam K.S., Xu A. Protective roles of adiponectin in obesity-related fatty liver diseases: mechanisms and therapeutic implications. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009; 53(2):201-12.
 - Weinbren K., Dowling F. Hypoglycaemia and the delayed proliferative response after subtotal hepatectomy. *Br J Exp Pathol.* 1972; 53(1):78-84.
 - Weymann A1, Hartman E, Gazit V, Wang C, Glauber M, Turmelle Y, Rudnick DA. p21 is required for dextrose-mediated inhibition of mouse liver regeneration. *Hepatology.* 2009 Jul; 50(1):207-15.
 - Whitehead J.P., Richards A.A., Hickman I.J., Macdonald G.A., Prins J.B. Adiponectin—a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 2006; 8(3):264-80..
 - Woo C.W., Siow Y.L., O K. Homocysteine induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in hepatocytes mediated via activator protein-1 activation. *J Biol Chem.* 2008; 283(3):1282-92.
 - Wright P.A. Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *J Exp Biol.* 1995; 198(Pt 2):273-81.
 - Wu G., Morris S.M. Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 1998; 336 (Pt 1):1-17.
 - Weymann A., Hartman E., Gazit V., Wang C., Glauber M., Turmelle Y., Rudnick D.A. p21 is required for dextrose-mediated inhibition of mouse liver regeneration. *Hepatology.* 2009; 50(1):207-15.
 - Yamada Y., Kirillova I., Peschon J.J., Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(4):1441-6.
 - Yamada S., Iida T., Tabata T., Nomoto M., Kishikawa H., Kohno K., Eto S. Alcoholic fatty liver differentially induces a neutrophil-chemokine and hepatic necrosis after ischemia-reperfusion in rat. *Hepatology.* 2000; 32(2):278-88.
 - Yamauchi T., Nio Y., Maki T., Kobayashi M., Takazawa T., Iwabu M., Okada-Iwabu M., Kawamoto S., Kubota T., Ito Y., Kamon J., Tsuchida A., Kumagai K., Kozono H., Hada Y., Ogata H., Tokuyama K., Tsunoda M., Ide T., Kadowaki T. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 2007;13(3):332-339.
 - Yanaga K., Matsumata T., Nishizaki T., Shimada M., Sugimachi K. Alternate hemihepatic vascular control technique for hepatic resection. *Am J Surg.* 1993; 165(3):365-6
 - Yang C.C., Deng S.J., Hsu C.C., Liu B.H., Lin E.C., Cheng W.T., Wang P.H., Ding S.T. Visfatin regulates genes related to lipid metabolism in porcine adipocytes. *J Anim Sci.* 2010;88(10):3233-41.
 - Yee S.B, Ganey P.E, Roth R.A. The role of Kupffer cells and TNF-alpha in monocrotaline and bacterial lipopolysaccharide-induced liver injury. *Toxicol Sci.* 2003; 71(1):124-32.

- Yin S., Gao B. Toll-like receptor 3 in liver diseases. *Gastroenterol Res Pract.* 2010;2010. pii: 750904.
- Yilmaz M.I., Saglam M., Carrero J.J., Qureshi A.R., Caglar K., Eyileten T., Sonmez A., Oguz Y., Aslan I., Vural A., Yenicesu M., Stenvinkel P., Lindholm B., Axelsson J. Normalization of endothelial dysfunction following renal transplantation is accompanied by a reduction of circulating visfatin/NAMPT. A novel marker of endothelial damage? *Clin Transplant.* 2009; 23(2):241-8.
- Yin C.G., Jiang L., Tang B., Zhang H, Qian Q, Niu GZ. Prognostic significance of plasma visfatin levels in patients with ischemic stroke. *Peptides.* 2013; 42:101-4.

ANEXOS

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

1. **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.* 2013.
2. 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(1):87-95. * **Ambos autores contribuyeron de la misma forma al presente trabajo.**
3. **Mendes-Braz M**, Elias-Miró M, Jiménez-Castro MB, Casillas-Ramírez A, Ramalho FS, Peralta C. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:298657.
4. 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.* 2013; 59(6):1208-14.
5. Elias-Miró M, Massip-Salcedo M, Raila J, Schweigert F, **Mendes-Braz M**, Ramalho F, Jiménez-Castro MB, Casillas-Ramírez A, Bermudo R, Rimola A, Rodes J, Peralta C. Retinol binding protein 4 and retinol in steatotic and nonsteatotic rat livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia/reperfusion. *Liver Transpl.* 2012; 18(10):1198-208.
6. 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(12):3257-71.
7. 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.

Artículos originados a partir de la presente Tesis.

ORIGINAL ARTICLE

The effects of glucose and lipids in steatotic and non-steatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischaemia-reperfusion

Mariana Mendes-Braz^{1,2,*}, Maria Elias-Miró^{1,*}, Burkhard Kleuser³, Susann Fayyaz³, Mónica B. Jiménez-Castro¹, Marta Massip-Salcedo^{1,4}, Jordi Gracia-Sancho⁵, Fernando S. Ramalho², Juan Rodes^{1,4} and Carmen Peralta^{1,4}

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

2 Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

3 Institute of Nutritional Science, University of Postdam, Postdam, Germany

4 Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Barcelona, Spain

5 Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain

Keywords

hepatic steatosis – ischaemia – liver surgery – regeneration – resection

Abbreviations

ALT, alanine aminotransferase; ANOVA, analysis of variance; AST, aspartate aminotransferase; BrdU, bromodeoxyuridine; CER, Ceramides; ESI, electrospray ionization; H&E, Haematoxylin and Eosin; HDL, high-density lipoprotein; HGF, hepatocyte growth factor; I/R, ischaemia-reperfusion; IL-1 β , interleukin-1 β ; IL-6, interleukin-6; LC-MS/MS, liquid chromatography/tandem mass spectrometry; LDL, low-density lipoprotein; Ln, lean; LPT, lipectomy; MCP1, monocyte chemoattractant protein-1; MyD88, myeloid differentiation factor 88; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; Ob, obese; PH, partial hepatectomy; QTOF, quadrupole/time-of-flight; S1P, sphingosine-1-phosphate; TGF- β , transforming growth factor- β ; TLR4, toll-like receptor 4; TNF- α , tumour necrosis factor- α ; TRIF, TIR domain-containing-adaptor inducing IFN-beta; VLDL, very-low-density lipoprotein.

Correspondence

Dr Carmen Peralta, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Esther Koplowitz Center, Roselló 149-153, 3rd floor, 08036 Barcelona, Spain
Tel: +34 9 3227 5400 ext 4177
Fax: +34 9 3312 9406
e-mail: cperalta@clinic.ub.es

Received 10 May 2013

Accepted 25 September 2013

DOI:10.1111/iv.12348

Abstract

Background: Steatosis is a risk factor in partial hepatectomy (PH) under ischaemia-reperfusion (I/R), which is commonly applied in clinical practice to reduce bleeding. Nutritional support strategies, as well as the role of peripheral adipose tissue as energy source for liver regeneration, remain poorly investigated. **Aims:** To investigate whether the administration of either glucose or a lipid emulsion could protect steatotic and non-steatotic livers against damage and regenerative failure in an experimental model of PH under I/R. The relevance of peripheral adipose tissue in liver regeneration following surgery is studied. **Methods:** Steatotic and non-steatotic rat livers were subjected to surgery and the effects of either glucose or lipid treatment on damage and regeneration, and part of the underlying mechanisms, were investigated. **Results:** In non-steatotic livers, treatment with lipids or glucose provided the same protection against damage, regeneration failure and ATP drop. Adipose tissue was not required to regenerate non-steatotic livers. In the presence of hepatic steatosis, lipid treatment, but not glucose, protected against damage and regenerative failure by induction of cell cycle, maintenance of ATP levels and elevation of sphingosine-1-phosphate/ceramide ratio and phospholipid levels. Peripheral adipose tissue was required for regenerating the steatotic liver but it was not used as an energy source. **Conclusion:** Lipid treatment in non-steatotic livers provides the same protection as that afforded by glucose in conditions of PH under I/R, whereas the treatment with lipids is preferable to reduce the injurious effects of liver surgery in the presence of steatosis.

*Both authors contributed equally to this work



Resistin and visfatin in steatotic and non-steatotic livers in the setting of partial hepatectomy under ischemia-reperfusion

Maria Elias-Miró^{1,†}, Mariana Mendes-Braz^{1,2,†}, Ruben Cereijo³, Francesc Villarroya³,
Mónica B. Jiménez-Castro¹, Jordi Gracia-Sancho⁴, Sergi Guixé-Muntet⁴, Marta Massip-Salcedo¹,
Joan Carles Domingo⁵, Raquel Bermudo⁶, Juan Rodés^{1,7}, Carmen 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; ²Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil; ³Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, i Institut de Biomedicina, Universitat de Barcelona, CIBER Fisopatologia de la Obesidad y Nutrición, Spain; ⁴Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS, CIBEREHD, Barcelona, Spain; ⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Spain; ⁶Tumour Bank, IDIBAPS, Barcelona, Spain; ⁷Liver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Background & Aims: This study examined whether the regulation of resistin and visfatin could reduce damage and improve regeneration in both steatotic and non-steatotic livers undergoing partial hepatectomy under ischemia-reperfusion, a procedure commonly applied in clinical practice to reduce bleeding.

Methods: Resistin and visfatin were pharmacologically modulated in lean and obese animals undergoing partial hepatectomy under ischemia-reperfusion.

Results: No evident role for these adipocytokines was observed in non-steatotic livers. However, obese animals undergoing liver surgery showed increased resistin in liver and plasma, without changes in adipose tissue, together with visfatin downregulation in liver and increment in plasma and adipose tissue. Endogenous resistin maintains low levels of visfatin in the liver by blocking its hepatic uptake from the circulation, thus regulating the visfatin detrimental effects on hepatic damage and regenerative failure. Indeed, the administration of anti-resistin antibodies increased hepatic accumulation of adipocyte-derived visfatin, exacerbating damage and regenerative failure. Interestingly, treatment with

anti-visfatin antibodies protected steatotic livers, and similar results were obtained with the concomitant inhibition of resistin and visfatin. Thus, when visfatin was inhibited, the injurious effects of anti-resistin antibodies disappeared. Herein we show that upregulation of visfatin increased NAD levels in the remnant steatotic liver, whereas visfatin inhibition decreased them. These later observations suggest that visfatin may favour synthesis of NAD instead of DNA and induces alterations in amino acid metabolism-urea cycle and NO production, overall negatively affecting liver viability.

Conclusions: Our results indicate the clinical potential of visfatin blocking-based therapies in steatotic livers undergoing partial hepatectomy with ischemia-reperfusion.

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

Introduction

In clinical situations, partial hepatectomy (PH) under ischemia-reperfusion (I/R) is usually performed to control bleeding during parenchymal dissection [1]. More than 20% of patients coming to liver resection have some degree of steatosis, usually related to obesity [2,3]. Hepatic steatosis is a major risk factor for liver surgery since it is associated with an increased complication index and postoperative mortality after major liver resection [4].

Under pathological conditions, adipose tissue has appeared as a highly active endocrine gland, secreting adipocytokines such as resistin and visfatin [5]. However, resistin and visfatin are also expressed in liver under obesity conditions and during fibrosis [6,7].

Increased levels of resistin have been reported in patients with cirrhosis, correlating with the severity of the disease [5,8]. Opposite effects of resistin on myocardial injury have been reported [9].

Visfatin, also known as nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt), is critical for the synthesis of nicotinamide adenine

Keywords: Liver surgery; Hepatic steatosis; Regeneration; Resection; Adipocytokines; Ischemia-reperfusion.

Received 27 March 2013; received in revised form 28 June 2013; accepted 18 July 2013; available online 19 August 2013

* Corresponding author. Address: Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Esther Koplowitz Center, Roselló 149-153, 3rd floor, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275400x4177; fax: +34 933129406.

E-mail address: cperalta@clinic.ub.es (C. Peralta).

† These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: PH, partial hepatectomy; I/R, ischemia-reperfusion; Nampt, nicotinamide phosphoribosyltransferase; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; Ob, obese; Ln, lean; BrdU, bromo-deoxyuridine; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; HGF, hepatocyte growth factor; TGF, transforming growth factor; MPO, myeloperoxidase; MDA, malondialdehyde; LDL, Low-density lipoprotein; VLDL, very-low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; GDH, glutamate dehydrogenase; CPT2, carnitine palmitoyl transferase-2; MCAD, medium chain acyl-CoA dehydrogenase; FGF21, fibroblast growth factor-21; SOD2, superoxide dismutase-2; GPX1, glutathione peroxidase-1; SCD1, stearyl-CoA desaturase-1; FAS, fatty acid synthase; COX1, cytochrome c oxidase subunit I; COXIV, cytochrome c oxidase subunit IV.



Review Article

The Current State of Knowledge of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury Based on Its Study in Experimental Models

M. Mendes-Braz,¹ M. Elias-Miró,² M. B. Jiménez-Castro,² A. Casillas-Ramírez,²
F. S. Ramalho,¹ and C. Peralta^{2,3}

¹Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, 14040-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

²Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain

³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, 08036 Barcelona, Spain

Correspondence should be addressed to C. Peralta, cperalta@clinic.ub.es

Received 1 December 2011; Accepted 23 February 2012

Academic Editor: Oreste Gualillo

Copyright © 2012 M. Mendes-Braz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The present review focuses on the numerous experimental models used to study the complexity of hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury. Although experimental models of hepatic I/R injury represent a compromise between the clinical reality and experimental simplification, the clinical transfer of experimental results is problematic because of anatomical and physiological differences and the inevitable simplification of experimental work. In this review, the strengths and limitations of the various models of hepatic I/R are discussed. Several strategies to protect the liver from I/R injury have been developed in animal models and, some of these, might find their way into clinical practice. We also attempt to highlight the fact that the mechanisms responsible for hepatic I/R injury depend on the experimental model used, and therefore the therapeutic strategies also differ according to the model used. Thus, the choice of model must therefore be adapted to the clinical question being answered.

1. Introduction

Ischemia-reperfusion (I/R) injury is a phenomenon in which cellular damage in a hypoxic organ is accentuated following the restoration of oxygen delivery [1–3]. In the liver, this form of injury was recognized as a clinically important pathological disorder by Toledo-Pereyra et al. in 1975 during studies of experimental liver transplantation (LT). However, it was not until the mid-1980s that the term reperfusion injury was generally used in the literature on LT [2]. I/R injury is an important cause of liver damage occurring during surgical procedures including hepatic resections and LT [4–6]. The shortage of organs has led centers to expand their criteria for the acceptance of marginal grafts that exhibit poor tolerance to I/R [7]. Some of these include the use of organs from older donors and grafts such as small-for-size or steatotic livers. However, I/R injury is the underlying cause of graft dysfunction in marginal organs [7]. Indeed, the use of steatotic livers for transplantation is associated with an

increased risk of primary nonfunction or dysfunction after surgery [8]. In addition, the occurrence of postoperative liver failure after hepatic resection in a steatotic liver exposed to normothermic ischemia has been reported [9]. Therefore, minimizing the adverse effects of I/R injury could improve outcomes in steatotic liver surgery, increasing the number of patients who successfully recover from major liver surgery.

Animal models of cold and warm hepatic I/R are valuable tools for understanding the physiopathology of hepatic I/R injury and discovering novel therapeutic targets and drugs. Some of the mechanisms and cell types involved in hepatic I/R injury are described below.

The lack of oxygen in hepatocytes during ischemia causes ATP depletion and alterations in H^+ , Na^+ , and Ca^{2+} homeostasis that activate hydrolytic enzymes and impair cell volume regulation leading to the swelling of sinusoidal endothelial cells (SECs) and Kupffer cells (KCs) [10]. This fact, together with the imbalance between nitric oxide (NO) and endothelin production, contributes to the narrowing of the

Adiponectin and resistin protect steatotic livers undergoing transplantation

Mónica B. Jiménez-Castro^{1,†}, Araní Casillas-Ramírez^{1,2,†}, Mariana Mendes-Braz¹, Marta Massip-Salcedo^{1,3}, Jordi Gracia-Sancho⁴, María Elias-Miró¹, Juan Rodés^{1,5}, Carmen Peralta^{1,3,*}

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

Transplantation

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

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

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

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

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



Retinol Binding Protein 4 and Retinol in Steatotic and Nonsteatotic Rat Livers in the Setting of Partial Hepatectomy Under Ischemia/Reperfusion

Maria Elias-Miró,^{1*} Marta Massip-Salcedo,^{1,2*} Jens Raila,³ Florian Schweigert,³ Mariana Mendes-Braz,⁴ Fernando Ramalho,⁴ Mónica B. Jiménez-Castro,¹ Araní Casillas-Ramírez,¹ Raquel Bermudo,⁵ Antoni Rimola,^{2,6} Juan Rodes,^{1,2} and Carmen Peralta^{1,2}

¹August Pi i Sunyer Institute for Biomedical Research, Barcelona, Spain; ²Network Center for Biomedical Research in Hepatic and Digestive Diseases, Barcelona, Spain; ³Institute of Nutritional Science, University of Potsdam, Nuthetal, Germany; ⁴Department of Pathology and Forensic Medicine, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; and ⁵Tumour Bank; and ⁶Liver Unit, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Steatotic livers show increased hepatic damage and impaired regeneration after partial hepatectomy (PH) under ischemia/reperfusion (I/R), which is commonly applied in clinical practice to reduce bleeding. The known function of retinol-binding protein 4 (RBP4) is to transport retinol in the circulation. We examined whether modulating RBP4 and/or retinol could protect steatotic and nonsteatotic livers in the setting of PH under I/R. Steatotic and nonsteatotic livers from Zucker rats were subjected to PH (70%) with 60 minutes of ischemia. RBP4 and retinol levels were measured and altered pharmacologically, and their effects on hepatic damage and regeneration were studied after reperfusion. Decreased RBP4 levels were observed in both liver types, whereas retinol levels were reduced only in steatotic livers. RBP4 administration exacerbated the negative consequences of liver surgery with respect to damage and liver regeneration in both liver types. RBP4 affected the mobilization of retinol from steatotic livers, and this revealed actions of RBP4 independent of simple retinol transport. The injurious effects of RBP4 were not due to changes in retinol levels. Treatment with retinol was effective only for steatotic livers. Indeed, retinol increased hepatic injury and impaired liver regeneration in nonsteatotic livers. In steatotic livers, retinol reduced damage and improved regeneration after surgery. These benefits of retinol were associated with a reduced accumulation of hepatocellular fat. Thus, strategies based on modulating RBP4 could be ineffective and possibly even harmful in both liver types in the setting of PH under I/R. In terms of clinical applications, a retinol pretreatment might open new avenues for liver surgery that specifically benefit the steatotic liver. *Liver Transpl* 18:1198-1208, 2012. © 2012 AASLD.

Received February 27, 2012; accepted June 3, 2012.

In clinical situations, partial hepatectomy (PH) under ischemia/reperfusion (I/R) is usually performed to control bleeding during parenchymal dissection.¹

Hepatic steatosis, a major risk factor for liver surgery, is associated with an increased complication index and increased postoperative mortality after major liver

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BrdU, bromodeoxyuridine; HGF, hepatocyte growth factor; I/R, ischemia/reperfusion; Ln, lean; mRNA, messenger RNA; Ob, obese; PH, partial hepatectomy; RBP4, retinol-binding protein 4; TGF- β , transforming growth factor β ; TTR, transthyretin; I/R_{REP}, ischemia/reperfusion at different reperfusion times.

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (project grant BFU2009-07410) and the Agency for the Innovation and Internationalization of Catalan Enterprise (project grant VALTEC08-2-0033). Mariana Mendes-Braz received a fellowship from the Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Brazilian Ministry of Education). Mónica B. Jiménez-Castro received a fellowship from the Spanish Society for Liver Transplantation Foundation.

*These authors contributed equally to this work.

Address reprint requests to Carmen Peralta, M.D., Ph.D., August Pi i Sunyer Institute for Biomedical Research, Roselló 149-153, 3rd Floor, Office 3.8, Barcelona, Spain 08036. Telephone: +34932275400, extension 4177; FAX: +34933129406; E-mail: cperalta@clinic.ub.es

DOI 10.1002/lt.23489

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

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

Tauroursodeoxycholic Acid Affects PPAR γ and TLR4 in Steatotic Liver Transplantation

M. B. Jiménez-Castro^a, M. Elias-Miro^a,
M. Mendes-Braz^{a,b}, A. Lemoine^c, A. Rimola^{d,e},
J. Rodés^{a,e}, A. Casillas-Ramírez^{a,†}
and C. Peralta^{a,d,*}

^aInstitut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBPAs), Barcelona, Spain

^bDepartamento de Patología e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

^cAPHP, Biochimie et Oncogénétique Moléculaire, Inserm U1004/Université Paris 11, Institut du Foie, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

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

^eLiver Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

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

†Both authors contributed equally to this work.

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

Key words: ER stress, PPAR- γ , steatotic liver grafts, TLR4, transplantation, TUDCA

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

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

Introduction

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

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

Review Article

The Current Knowledge of the Role of PPAR in Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury

M. Elias-Miró,¹ M. B. Jiménez-Castro,¹ M. Mendes-Braz,²
 A. Casillas-Ramírez,¹ and C. Peralta^{1,3}

¹ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Esther Koplowitz Center, Roselló 149–153, 3rd Floor, Office 3.8, 08036 Barcelona, Spain

² Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, 14049-900 Sao Paulo, SP, Brazil

³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, 08036 Barcelona, Spain

Correspondence should be addressed to C. Peralta, cperalta@clinic.ub.es

Received 22 December 2011; Accepted 16 March 2012

Academic Editor: Stefan Alexson

Copyright © 2012 M. Elias-Miró et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Strategies to improve the viability of steatotic livers could reduce the risk of dysfunction after surgery and increase the number of organs suitable for transplantation. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are major regulators of lipid metabolism and inflammation. In this paper, we review the PPAR signaling pathways and present some of their lesser-known functions in liver regeneration. Potential therapies based on PPAR regulation will be discussed. The data suggest that further investigations are required to elucidate whether PPAR could be a potential therapeutic target in liver surgery and to determine the most effective therapies that selectively regulate PPAR with minor side effects.

1. Introduction

Liver transplantation has evolved as the therapy of choice for patients with end-stage liver disease. However, the waiting list for liver transplantation is growing at a rapid pace, whereas the number of available organs is not increasing proportionately. The potential use of steatotic livers, one of the most common types of organs in marginal donors, for transplantation has become a major focus of investigation. However, steatotic livers are more susceptible to ischemia-reperfusion (I/R) injury, and the transplantation of steatotic levels results in a poorer outcome than that of nonsteatotic livers. Indeed, the use of steatotic livers for transplantation is associated with an increased risk of primary nonfunction or dysfunction after surgery [1, 2]. In hepatic resections, the operative mortality associated with steatosis exceeds 14%, compared with 2% for healthy livers, and the risks of dysfunction after surgery are similarly higher [2, 3]. Despite advances aimed at reducing the incidence of hepatic I/R injury (summarized in earlier reviews) [1, 2], the results to date are inconclusive. In this paper, we review the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) and PPAR γ

signaling pathways in steatosis, inflammation and regeneration, three key factors in steatotic liver surgery [1–5]. Our review of the different strategies pursued to regulate PPAR in liver diseases may motivate researchers to develop effective treatments for steatotic livers in patients undergoing I/R. The potential clinical application of strategies that regulate PPAR in the setting of steatotic liver surgery is also discussed.

2. Characteristics of PPAR

PPARs belong to the hormone nuclear receptor superfamily and consist of three isoforms: PPAR α , PPAR γ , and PPAR β/δ . Of these, our group and others have demonstrated that PPAR α and PPAR γ are important regulators of postischemic liver injury [1, 2, 6, 7] that exert their effects on steatosis and inflammation, which is inherent in steatotic liver surgery [8–12].

Previous results indicate that the presence of fatty infiltration by itself in the liver (without any surgical intervention) does not induce changes in PPAR α or PPAR γ levels, as no differences were observed in the levels of these transcription factors between steatotic and nonsteatotic livers of