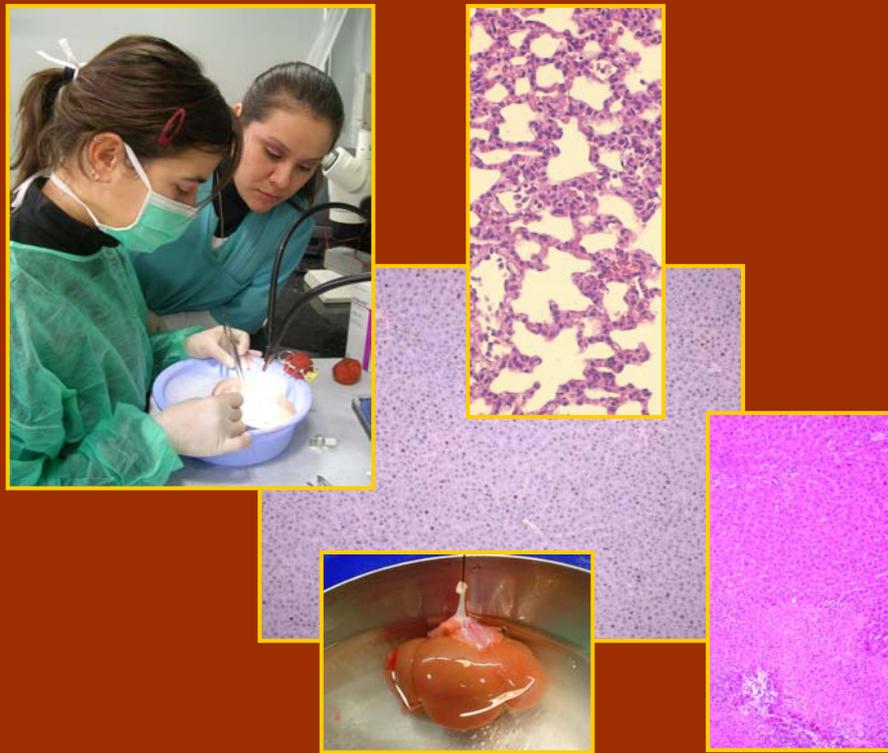


TESIS DOCTORAL

EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO COMO ESTRATEGIA QUIRÚRGICA ÚTIL EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO CON INJERTO DE TAMAÑO REDUCIDO



Rosa Franco Gou

**Universidad de Barcelona
Departamento de Fisiología Animal
2006**

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Como animales de experimentación se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 200-250 g de peso (IFFA-CREDO, L'abresle, France) mantenidas en el estabulario de la Facultad de Medicina por lo menos una semana antes de su intervención. Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes, la temperatura fue de 21-22° C, la humedad relativa del 70% y los ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con las normas reguladoras de la Unión Europea para modelos de experimentación animal (Directiva 86/609/ECC).

3.2. MODELO EXPERIMENTAL: TRASPLANTE HEPÁTICO ORTOTÓPICO CON INJERTO DE TAMAÑO REDUCIDO.

3.2.1. ANESTESIA

La cirugía se realizó bajo anestesia inhalatoria (Fluorane Abbott Laboratories, Madrid). La inducción anestésica 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 donantes consistió en la inhalación de isoflurano al 1.5-2% y flujo de oxígeno de 2-2.5 l/min, hasta el momento de la perfusión del hígado con solución de UW y la posterior parada cardiaca. En el receptor, la anestesia fue interrumpida en el periodo de fase anhepática; una vez finalizada dicha fase, la inhalación de isoflurano fue del 0.5-1%, hasta finalizar la intervención. El flujo de oxígeno se mantuvo constante durante toda la operación.

3.2.2. TÉCNICA QUIRÚRGICA

Cirugía del donante

Se utilizó la técnica del doble "cuff" descrita por Kamada y col. (230), sin reconstrucción de la arteria hepática. Una vez anestesiada la rata, se rasuró el abdomen y se colocó al animal en decúbito supino sobre la mesa de operaciones (Figura 3.1). El campo quirúrgico se lavó con povidona iodada y se realizó una laparotomía transversal a 1 cm por debajo del apéndice xifoides. El ligamento redondo fue seccionado, se liberó la vena cava inferior suprahepática y se ligó la vena diafragmática derecha.



Figura 3.1. Campo quirúrgico

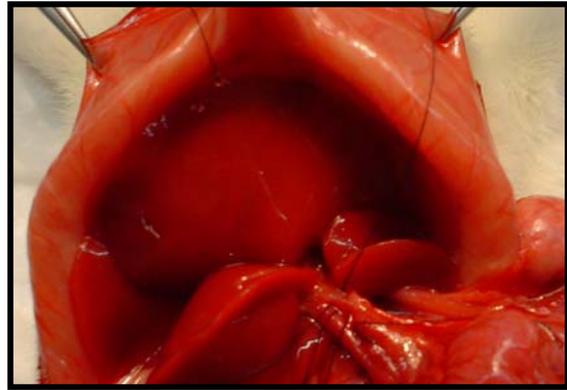


Figura 3.2. Hilio hepático del donante

Seguidamente, se diseccionó la aorta, la vena cava inferior y el pedículo renal derecho y se ligaron la arteria y vena renal derecha, las venas suprarrenal y las lumbares derechas. En el hilio hepático se separó la vena porta de la arteria hepática y del conducto biliar común. El conducto biliar se canuló con un catéter de polietileno de aproximadamente 2 cm de largo, 0.96 mm de diámetro externo y 0.5 mm de diámetro interno (Cole-Palmer Instrument Company, Vernon Hills, Illinois, USA), y se fijó con una doble ligadura de seda 6/0 (Suturas Aragón, Barcelona) (Figura 3.2).

La reducción del hígado se llevó a cabo mediante la extirpación del lóbulo lateral izquierdo y los dos lóbulos caudados en base a la realización de una doble ligadura con seda 5.0 en el pedículo de dichos lóbulos (Figura 3.3) y la siguiente extirpación (Figura 3.4) (44,231,232).

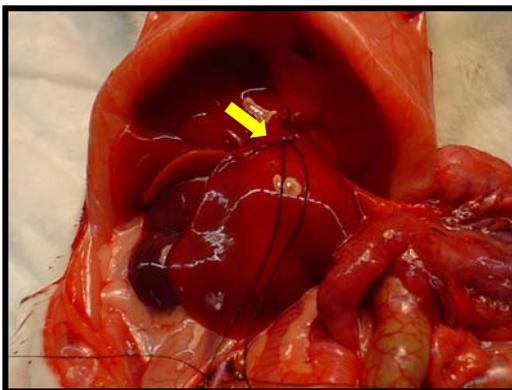


Figura 3.3. Ligadura del lóbulo lateral izquierdo

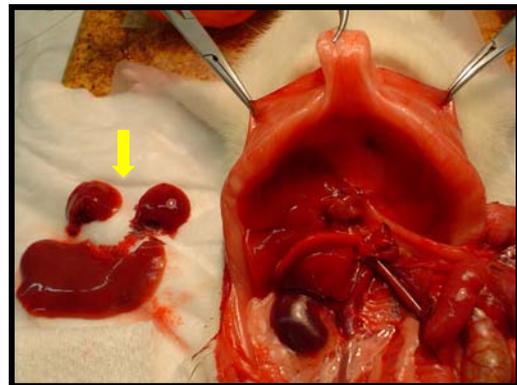


Figura 3.4. Lóbulos extirpados

Se administraron 300 unidades de heparina. Una vez preparado el órgano para su extracción se canuló la aorta con un catéter de 20 G (Medicuth, Venflon, Helsinborg, Suecia); previa apertura del diafragma, se ocluyó la aorta torácica y se seccionó la vena cava inferior suprahepática por encima del diafragma.



Figura 3.5. Perforación del injerto

Fue entonces cuando empezó la perfusión del injerto con 50 ml de solución de UW (ViaSpan®, Bristol-Myers, Madrid) (Figura 3.5). A continuación se realizó la extracción del hígado donante y se colocó en un baño con solución UW a 4° C.

Cirugía de banco

La cirugía de banco tiene como finalidad preparar el injerto para el implante en el animal receptor. Se recortó el diafragma que rodea la vena cava inferior suprahepática, dejando aproximadamente un pequeño reborde de unos 3 mm para facilitar la posterior anastomosis (Figura 3.6). Se colocaron dos puntos de referencia de Prolene 7/0 en ambos extremos de la vena cava para facilitar la orientación de esta anastomosis.



Figura 3.6: Vena cava suprahepática del donante.

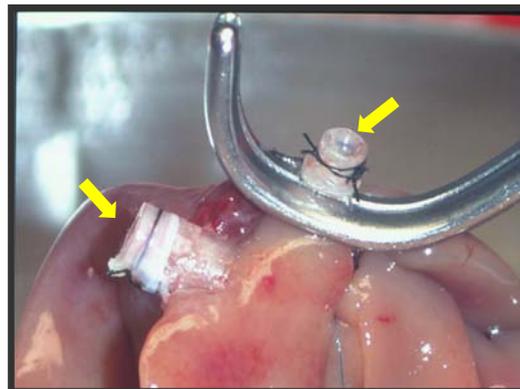


Figura 3.7: Cuffs de la vena porta y de la vena cava inferior infrahepática.

Las anastomosis de las venas porta y cava inferior infrahepática se realizaron mediante la técnica del cuff. Se colocaron, en ambas venas, unas estructuras tubulares de polietileno, llamadas cuffs. El cuff utilizado en la vena cava tiene un

diámetro externo de 3.3 mm e interno de 2.6 mm; el de la vena porta, 2.09 mm de diámetro externo y 1.58 mm de interno (Figura 3.7). La colocación de estas estructuras permitió, en el momento del implante, la unión de estas venas sin necesidad de realizar una sutura continua y disminuyendo, por tanto, la duración de la intervención (factor importante para la supervivencia del receptor) (Figura 3.7).

Cirugía del receptor

Se realizaron la laparotomía y la disección del hígado de forma similar a la realizada en el donante. En el hilio hepático se seccionó el conducto biliar al nivel de la confluencia de ambos conductos hepáticos. Para facilitar la introducción de los cuffs y orientar de forma adecuada las venas porta y cava inferior infrahepática se colocaron dos puntos de sutura de Prolene 7/0 en sus extremos.

Mediante la utilización de clamps microvasculares, fueron ocluidas la vena porta en su confluencia con la vena esplénica y la vena cava inferior infrahepática justo por encima de la vena renal derecha.

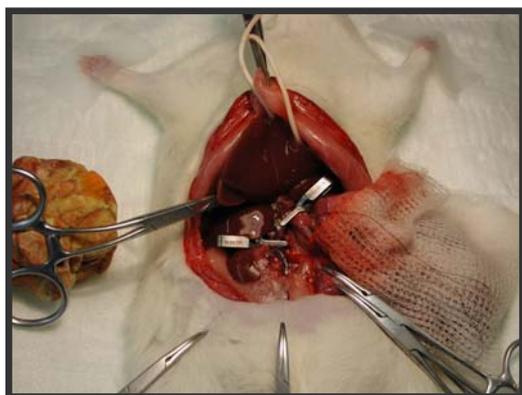


Figura 3.8: Inicio de la fase anhepática

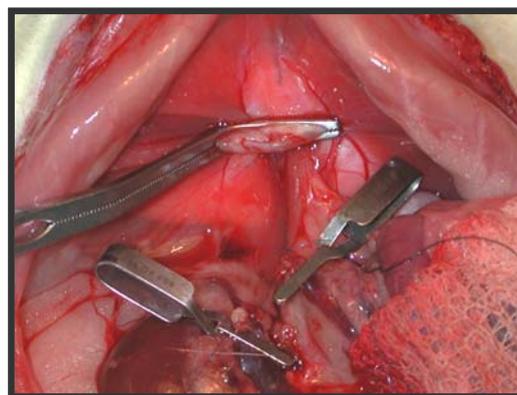


Figura 3.9: Hepatectomía del receptor

Con una pinza Satinsky, se ocluyó la vena cava inferior suprahepática (Figura 3.8). En este momento empezó la fase anhepática. La hepatectomía del receptor se completó al seccionar las venas porta y cava inferior supra e infrahepáticas, todas en la zona más proximal al hígado (Figura 3.9).

El implante del injerto comenzó con la sutura continua, con Prolene 7/0, entre la vena cava inferior suprahepática del donante y la del receptor (Figura 3.10). Le siguió la anastomosis de la vena porta, mediante la introducción del cuff, colocado en la vena porta del injerto, dentro de la vena porta del receptor; una vez introducida, se aseguró con una sutura de seda 6/0. Una vez realizadas estas dos anastomosis se procedió a la reperusión del injerto, mediante la liberación de las pinzas que ocluían

las venas, primero la vena porta e inmediatamente después la vena cava inferior infrahepática.

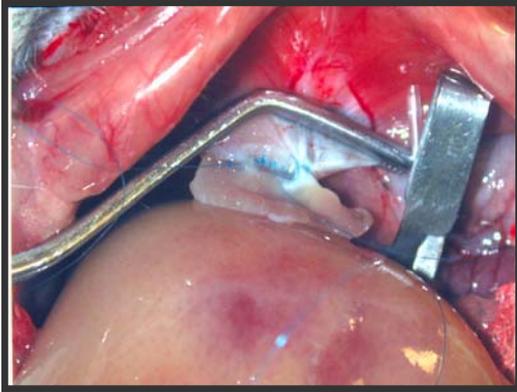


Figura 3.10: Anastomosis de la vena cava inferior suprahepática

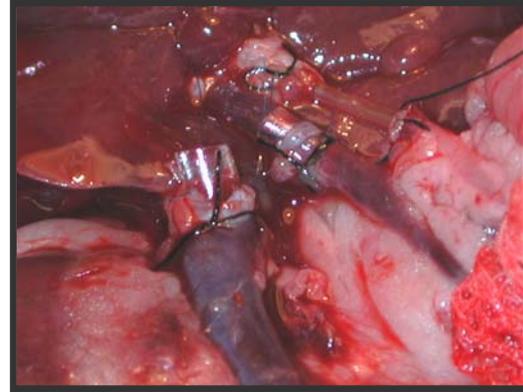


Figura 3.11: Anastomosis de la vena cava inferior infrahepática, porta y conducto biliar

La anastomosis de la vena cava inferior infrahepática se realizó de forma similar a la vena porta, y se liberó la pinza de la vena, reconstituyendo el flujo sanguíneo a este nivel.

Reestablecido el flujo sanguíneo, se procedió a la rehidratación del injerto mediante la inyección de un bolus intravenoso, a través de la vena dorsal del pene, que contenía 0.5 ml de bicarbonato sódico 1 M, y 2.5 ml de solución isotónica de Ringer Lactato; de esta manera se restauraba el volumen perdido y se contrarrestaba la acidosis producida durante la intervención.

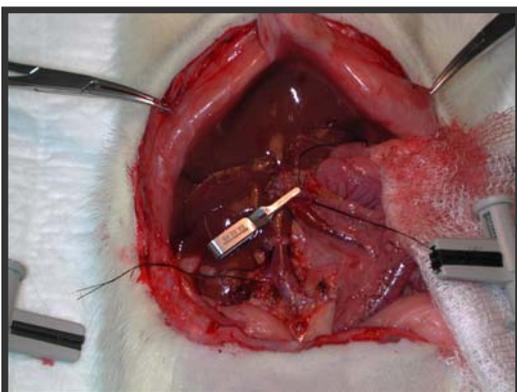


Figura 3.12. Inducción del preconditionamiento isquémico.

A continuación, se realizó la anastomosis del conducto biliar con la unión de los conductos de donante y receptor, mediante el tubo de polietileno previamente colocado en el hígado donante (Figura 3.11). Para terminar la intervención se cerró el plano muscular y después la piel con sutura continua con seda 2/0.

Precondicionamiento isquémico (PC)

El PC se realizó en el hígado donante mediante la oclusión de la arteria hepática y la vena porta con un clamp microvascular durante 10 minutos (Figura 3.12). Se retiró el clamp y la reperfusión posterior fue de 10 minutos, tras los cuales se procedió a la perfusión del injerto con solución de UW (205).

3.3. RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se recogieron muestras de hígado en diferentes momentos dependiendo del estudio a realizar. Así, con el animal anestesiado se recogieron muestras del tejido hepático a las 6 y a las 24 horas después del trasplante; una parte se congeló en nieve carbónica (y se mantuvo a -80°C) y otra parte se fijó en paraformaldehído al 4% tamponado, para su posterior procesamiento con el fin de realizar el análisis histológico e inmunohistológico. También se recogieron muestras de hígado al final del periodo de preservación o isquemia fría, las cuales se congelaron en nieve carbónica y se mantuvieron a -80°C .

Las muestras de sangre se recogieron a las 6 y 24 horas después del trasplante, dependiendo del estudio, en tubos con heparina que se mantuvieron a 4°C hasta que fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C para obtener el plasma que se almacenó a -80°C .

Por otra parte, se recogieron muestras de pulmón a las 24 horas después de la cirugía, una parte de las cuales fueron congeladas en nieve carbónica y mantenidas a -80°C y otra mantenidas en paraformaldehído al 4% tamponado hasta su procesamiento para el posterior análisis histológico.

3.4. GRUPOS EXPERIMENTALES

3.4.1. PRIMER ESTUDIO

Protocolo 1. Efecto del PC sobre la lesión por I/R y la regeneración hepática. Con el fin de evaluar el efecto del PC sobre el daño hepático por I/R y sobre la regeneración hepática asociada al trasplante hepático ortotópico con injerto de tamaño reducido (ROLT) se realizaron los siguientes grupos experimentales:

1. Sham (n=8): Los animales fueron sometidos a laparotomía transversal y se ligaron las venas suprarrenal derecha, la arteria hepática y la vena diafragmática.

2. Trasplante hepático ortotópico con injerto de tamaño reducido (ROLT) (n=12, 6 trasplantes): Los animales fueron sometidos a un trasplante hepático de tamaño reducido siguiendo la técnica de Kamada expuesta en esta tesis (230), llevándose a cabo una hepatectomía parcial del injerto del 40% (44,231,232). La solución de perfusión y de preservación del hígado fue la solución UW. El tiempo de isquemia fría fue de 1 hora (44), Este es un periodo corto de isquemia fría, tal como ocurre en la práctica clínica del trasplante hepático de donante vivo. La duración de la fase anhepática fue de 17-20 minutos (233).

3. Precondicionamiento isquémico + Trasplante hepático ortotópico con injerto de tamaño reducido (PC+ROLT) (n=12, 6 trasplantes): Se realizó el ROLT, pero el hígado donante fue sometido al PC, que consistió en interrumpir el flujo sanguíneo, mediante un clamp vascular, de la vena aorta y la arteria hepática durante 10 minutos, con el posterior reestablecimiento de dicho flujo durante otros diez minutos, justo antes de la perfusión del injerto con solución de UW (205).

Tras 24 horas del trasplante se recogieron muestras de plasma y de tejido hepático. La evaluación del daño hepático se realizó mediante la determinación de transaminasas en plasma. Se realizó la determinación de la peroxidación lipídica (a través de los parámetros de malondialdehído, MDA, y hidroperóxidos lipídicos, LPO) y de los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en hígado. Para evaluar la regeneración hepática se determinó el índice de marcaje del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y los niveles del HGF en plasma y en tejido hepático. Las citoquinas IL-6 y TNF- α fueron evaluadas en tejido hepático. Se llevó a cabo el análisis histológico del hígado.

Protocolo 2. Efecto del PC sobre los sistemas generadores de RLO. Para estudiar el efecto del PC sobre los sistemas generadores de RLO se realizaron los siguientes grupos experimentales:

2. *1.Sistema xantina/XOD.* Se evaluó el efecto del PC sobre la acumulación de hipoxantina y xantina y sobre la conversión de XDH a XOD en los injertos hepáticos de tamaño reducido al finalizar el periodo de isquemia fría o preservación en solución UW; para ello se realizaron los siguientes grupos experimentales:

4. Control (n=6): Se realiza una hepatectomía del 40%, mediante la resección del lóbulo lateral izquierdo y los dos lóbulos caudados y se perfunde el hígado con solución de UW.

5. Isquemia (I) (n=6): Se sigue el mismo procedimiento que en el grupo 4, y se preserva el injerto 1 hora a 4° C en un recipiente que contiene solución UW.

6. Precondicionamiento isquémico + Isquemia (PC+I): Igual al grupo 5, pero antes de profundir el órgano se realizó el PC (que constó de 10 minutos de isquemia seguidos de diez minutos de reperfusión).

Después de la isquemia fría, las muestras de hígado fueron congeladas en nieve carbónica y mantenidas a -80°C , luego fueron procesadas para determinar la proporción XDH/XOD, la hipoxantina y la xantina. Estos parámetros fueron determinados en los grupos 1-3 del protocolo1 para evaluar el efecto del PC sobre el sistema xantina/XOD después de 24 horas de reperfusión.

2. 2. *Células de kupffer*. Para evaluar el papel de las células de Kupffer en la generación de RLO se realizó el siguiente grupo:

7. Trasplante hepático ortotópico con injerto de tamaño reducido + cloruro de gadolinio (ROLT+GdCl₃) (n=12, 6 trasplantes): Igual que el grupo 2, pero con previa administración de GdCl₃ en el donante, 48 y 24 horas antes de la hepatectomía, con tal de inactivar las células de Kupffer; la dosis fue de 10 mg/kg, por vía intravenosa (234).

24 horas después del trasplante se recogieron muestras de plasma y de hígado. Las determinaciones bioquímicas y el análisis histológico fueron los mismos que en el protocolo 1.

Protocolo 3. Efecto del PC sobre el metabolismo energético. Para evaluar si los beneficios del PC podían ser debidos a cambios en el metabolismo energético, se determinaron los siguientes parámetros en la muestras de hígado correspondientes a los grupos 1-6 mencionados anteriormente: ATP, nucleótidos de adenina (ATP+ADP+AMP), balance energético (relación ATP/ADP) y carga energética (ATP+[1/2]ADP/ATP+ADP+AMP).

Protocolo 4. Papel del NO en el PC.

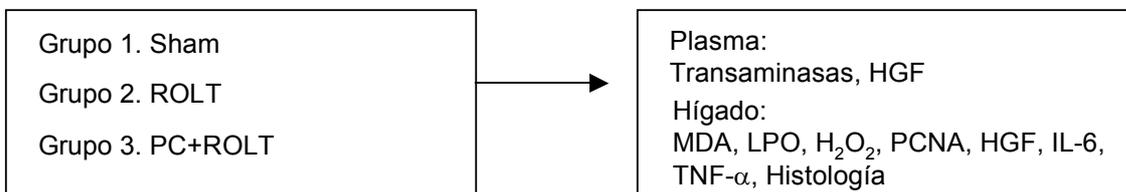
4. 1. *Lesión y regeneración hepática*. Se pretendía estudiar el papel del NO en el efecto del PC sobre la lesión y la regeneración hepática en el modelo de ROLT y se realizaron los siguientes grupos experimentales:

8. Trasplante hepático ortotópico con injerto de tamaño reducido + donador de óxido nítrico (ROLT+NO) (n=12, 6 trasplantes): Se realizó el ROLT, pero al donante se le administró un donador de óxido nítrico, spermine NONOate, a una dosis de 10 mg/kg por vía intravenosa, justo antes de la profundir el hígado (192).

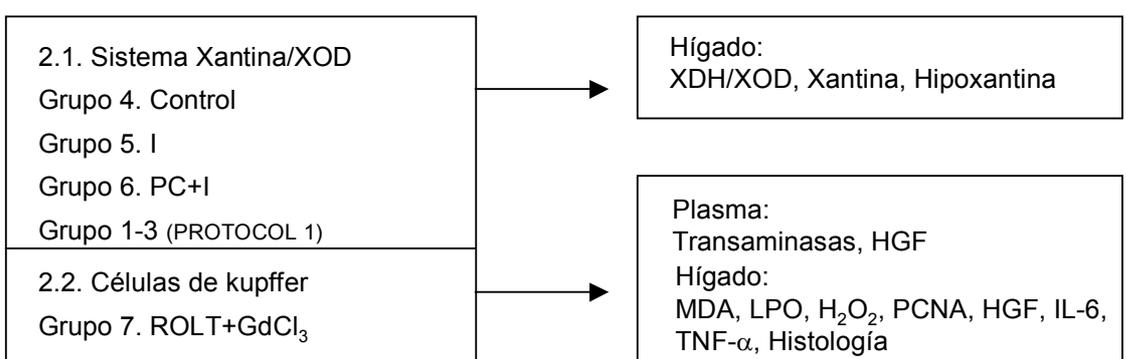
INTERVENCIONES

DETERMINACIONES

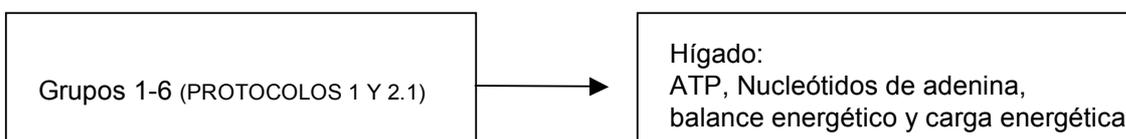
PROTOCOLO 1. Efecto del PC sobre la lesión por I/R y la regeneración hepática



PROTOCOLO 2. Efecto del PC sobre sistemas generadores de RLO



PROTOCOLO 3. Efecto del PC sobre el metabolismo energético



PROTOCOLO 4. Papel del NO en el PC

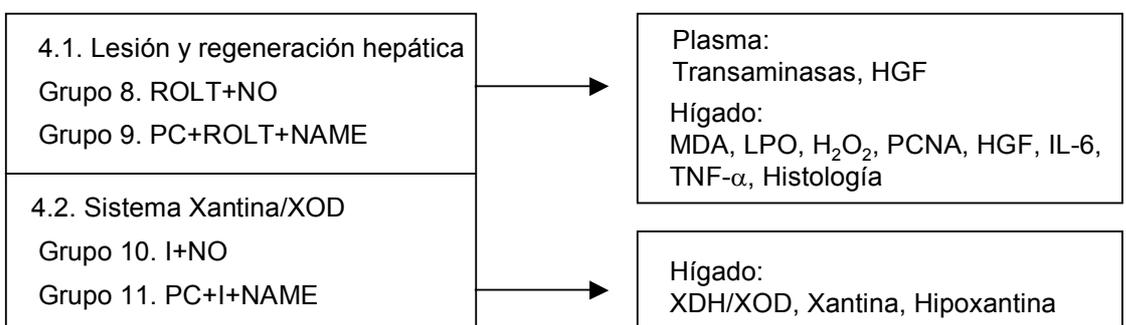


Tabla 1.1. Intervenciones y determinaciones del estudio 1

9. Precondicionamiento isquémico + Trasplante hepático ortotópico con injerto de tamaño reducido + NAME (PC+ROLT+NAME) (n=12, 6 trasplantes): Igual que el grupo 3, pero se administró un inhibidor de la síntesis de NO, N ω -nitro-L-arginine methyl ester (NAME). Cuando el hígado fue perfundido y extraído del donante para ser colocado en solución UW se le administraron 20 ml de una solución que contenía NAME 10 mM a través de la vena porta y luego, al animal receptor se le inyectó dicho inhibidor a una dosis de 20 mg/kg por vía intravenosa, justo cuando empezaba la reperusión del injerto, es decir, cuando el hígado había sido implantado y se reestablecía el flujo sanguíneo (100).

Los tiempos de administración y las dosis del tratamiento con NAME y spermine NONOate fueron utilizados previamente para evaluar el papel de NO en el PC en hígados en un modelo de isquemia caliente (187,202).

24 horas después del trasplante, se recogieron las muestras de plasma y hígado y se realizaron las determinaciones bioquímicas y el análisis histológico de la misma forma que en el protocolo 1. También se determinaron la hipoxantina, la xantina y la proporción XDH/XOD.

4. 2. *Sistema Xantina/XOD*. Para evaluar el papel del NO en el sistema xantina/XOD se evaluaron los siguientes grupos experimentales:

10. Isquemia + Donador de NO (I+NO) (n=6): Igual que en el grupo 5, pero cinco minutos antes de perfundir el hígado se le administró al animal el donador de NO, spermine NONOate, a una dosis de 10 mg/kg por vía intravenosa (192).

11. Precondicionamiento isquémico + Isquemia + NAME (PC+I+NAME) (n=6): se procedió de la misma manera que en el grupo 6, pero cuando el hígado se colocó en solución de preservación UW, se le administró a través de la vena porta una solución 10 mM de L-NAME (100).

Pasada una hora de isquemia fría, las muestras de hígado fueron congeladas en nieve carbónica y se determinaron los niveles de hipoxantina y xantina y la actividad de los enzimas XDH/XOD.

En la Tabla 1.1. se presenta un esquema con las intervenciones y las determinaciones realizadas en los diferentes grupos de este estudio.

3.4.2. SEGUNDO ESTUDIO

Protocolo 1. Efecto del PC sobre la IL-1. Se pretendía evaluar la implicación de la IL-1 en los efectos beneficiosos del PC sobre la lesión y regeneración hepática asociadas al ROLT a las 24 horas después del trasplante.

1.1) Para averiguar la influencia del PC sobre los efectos adversos de la IL-1 en el trasplante hepático ortotópico de tamaño reducido se realizaron los siguientes grupos:

1. Sham (n=8): Los animales fueron sometidos a laparotomía transversal y se ligaron las venas suprarrenal derecha, la arteria hepática y la vena diafragmática.

2. Trasplante hepático ortotópico con injerto de tamaño reducido (ROLT) (n=12, 6 trasplantes): Los animales fueron sometidos a un trasplante hepático de tamaño reducido siguiendo la técnica de Kamada expuesta en esta tesis (230), llevándose a cabo una hepatectomía parcial del injerto del 40% (44,231,232). La solución de perfusión y de preservación del hígado fue la solución UW. El tiempo de isquemia fría fue de 1 hora (44), Este es un periodo corto de isquemia fría, tal como ocurre en la práctica clínica del trasplante hepático de donante vivo. La duración de la fase anhepática fue de 17-20 minutos (233).

3. Trasplante hepático ortotópico con injerto de tamaño reducido + IL-1ra (ROLT+IL-1ra) (n=12, 6 trasplantes): Igual que el grupo 2, con la administración de un antagonista del receptor de IL-1, IL-1ra, a una dosis de 40 mg/kg por vía intravenosa, justo cuando empezaba la reperusión del injerto en el receptor (203).

4. Precondicionamiento isquémico + Trasplante hepático ortotópico con injerto de tamaño reducido (PC+ROLT) (n=12, 6 trasplantes): Se realizó el ROLT, pero el hígado donante fue sometido al preconditionamiento isquémico (PC), que constó en interrumpir el flujo sanguíneo, mediante un clamp vascular, de la vena aorta y la arteria hepática durante 10 minutos, con el posterior reestablecimiento de dicho flujo durante otros diez minutos, justo antes de la perfusión del injerto con solución de UW (205).

5. Precondicionamiento isquémico + Trasplante hepático ortotópico de tamaño reducido + IL-1 α (PC+ROLT+IL-1 α) (n=12, 6 trasplantes): igual que el grupo 4, pero con previa administración de IL-1 α recombinante en el receptor, justo después de la reperusión del injerto en el receptor, a una dosis de 5 μ g/kg por vía intraperitoneal (235,236).

1.2) Papel del NO. Para estudiar el papel del NO en los efectos beneficiosos del PC sobre la liberación de IL-1 se llevaron a cabo los siguientes grupos experimentales:

6. Trasplante hepático ortotópico con injerto de tamaño reducido + Donador de óxido nítrico (ROLT+NO) (n=12, 6 trasplantes): Se realizó el ROLT, pero al donante se le administró un donador de óxido nítrico, spermine NONOate, a una dosis de 10 mg/kg por vía intravenosa, justo antes de la perfundir el hígado (192).

7. Precondicionamiento isquémico + Trasplante hepático ortotópico con injerto de tamaño reducido + NAME (PC+ROLT+NAME) (n=12, 6 trasplantes): Igual que el grupo 4, pero se administró un inhibidor de la síntesis de NO, N ω -nitro-L-arginine methyl ester (NAME). Cuando el hígado fue perfundido y extraído del donante para ser colocado en solución UW se le administraron 20 ml de una solución que contenía L-NAME 10 mM a través de la vena porta y luego, al animal receptor se le inyectó dicho inhibidor a una dosis de 20 mg/kg por vía intravenosa, justo cuando empezaba la reperusión del injerto, es decir, cuando el hígado había sido implantado y se reestablecía el flujo sanguíneo (100).

8. Precondicionamiento isquémico + Trasplante hepático ortotópico de tamaño reducido + NAME + IL-1ra (PC+ROLT+NAME+IL-1ra) (n=12, 6 trasplantes): Igual que el grupo 7, pero con la administración de un antagonista del receptor de IL-1, IL-1ra, a una dosis de 40 mg/kg por vía intravenosa, justo cuando empieza la reperusión del injerto en el receptor (231).

24 horas después del trasplante se recogieron muestras de sangre e hígado. Se evaluó la lesión del tejido hepático mediante la determinación de las transaminasas en plasma. Fueron determinados en hígado la Interleuquina-1 (IL-1), el MDA, el índice de marcaje de PCNA, el HGF, el TGF- β y la acumulación de nitritos y nitratos. También se realizó el análisis histológico del tejido hepático.

Protocolo 2. Implicación de las proteínas del shock térmico (HSPs) en los efectos protectores del PC sobre la lesión y regeneración hepática en el ROLT a las 24 horas después del trasplante.

2.1) Efecto del PC sobre las HSPs.

Se analizaron los niveles de diferentes HSPs implicadas en el síndrome de I/R, como son la HSP90, la HSP70 y la HO-1, en los grupos 1, 2, 4 y 7 del protocolo 1, por la técnica del Western blot.

2.2) Papel de las HSPs. Para evaluar si los cambios inducidos por el PC sobre las HSPs se veían reflejados en la lesión y la regeneración hepática, se realizaron los siguientes grupos experimentales:

9. Precondicionamiento isquémico + Trasplante hepático ortotópico con injerto de tamaño reducido + HSP70inh (PC+ROLT+HSP70inh) (n=12, 6 trasplantes): Igual que el grupo 4, pero se le administró al donante un inhibidor de la HSP70, la quercetina, a una dosis de 100 mg/kg por vía intraperitoneal y 2 horas antes de realizar el PC (237,238). Se ha visto que la quercetina es también un inhibidor de la HSP90 y la HSP25 (239,240).

10. Precondicionamiento isquémico + Trasplante hepático ortotópico con injerto de tamaño reducido + HO-1inh (PC+ROLT+HO-1inh) (n=12, 6 trasplantes): Igual que el grupo 4, pero el donante fue tratado con un inhibidor de la HO-1, Zinc (II) protoporphyrin IX, a una dosis de 20 mg/kg por vía intraperitoneal, 24 horas antes del PC (241). Además de inhibir la HO-1, Zinc (II) protoporfirina IX también inhibe la actividad mediada por HO-2 y HO-3 (242,243).

Las dosis de quercetina y Zinc (II) protoporfirina IX utilizadas en el presente estudio fueron efectivas para evaluar el papel de la HSP70 y la HO-1 en previos estudios con diferentes modelos experimentales de I/R (237,238,241). Se llevaron a cabo experimentos control con dosis más altas de dichos inhibidores y los resultados fueron similares a los obtenidos con las dosis escogidas. La quercetina y los demás fármacos fueron disueltos en dimethylsulfoxide y salino respectivamente, tal como se describe en artículos previos (150,241,244,245) y siguiendo las instrucciones de los fabricantes. También se realizaron experimentos control usando sólo los vehículos de los fármacos y no modificaron los parámetros respecto al grupo trasplantado.

24 horas después del trasplante se recogieron muestras de plasma y de hígado. Se realizaron las mismas determinaciones bioquímicas y los análisis histológicos hechos en protocolo 1. Se analizó el efecto de la quercetina sobre los niveles de HSP90, HSP70, HO-1 y HSP25 por Western blot.

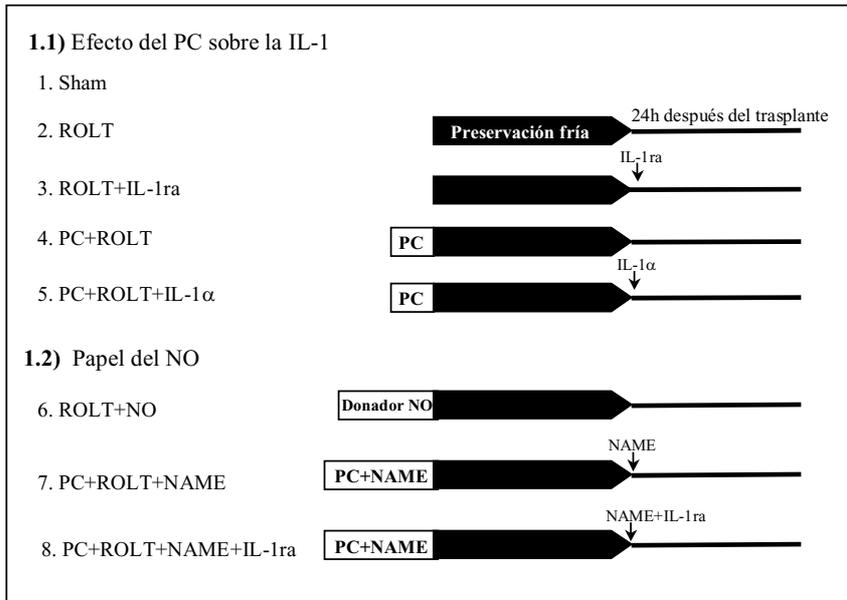
Protocolo 3. Efecto del PC sobre la IL-1 y las HSPs a las 6 y 12 horas después del trasplante.

Para evaluar si los cambios producidos por el PC sobre las HSPs y la IL-1 observados a las 24 horas después del trasplante tenían lugar también en fases más tempranas, se llevó a cabo el mismo proceso quirúrgico que en los grupos 2,4,5 y 10 y se recogieron las muestras a las 6 y 12 horas después del trasplante. Se determinaron

los siguientes parámetros: transaminasas, IL-1, el índice de marcaje de PCNA, el HGF, el TGF- β , niveles de HSPs y grado 3 de necrosis.

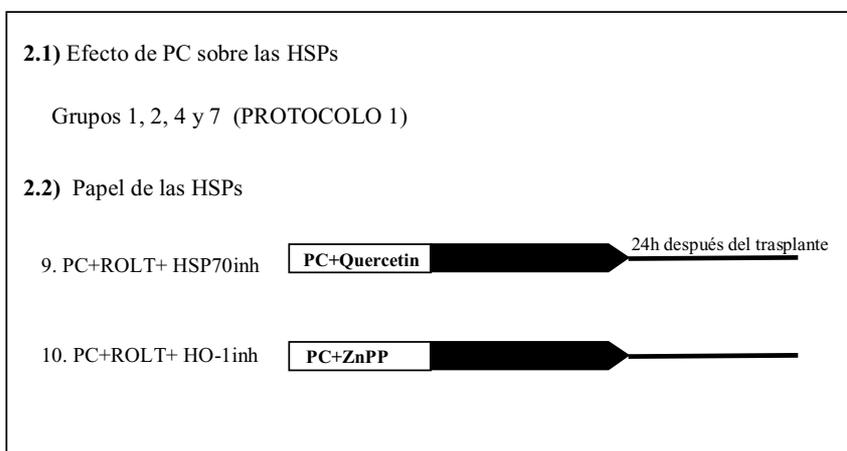
A continuación, un esquema de los grupos experimentales y los análisis realizados en este estudio:

PROTOCOLO 1



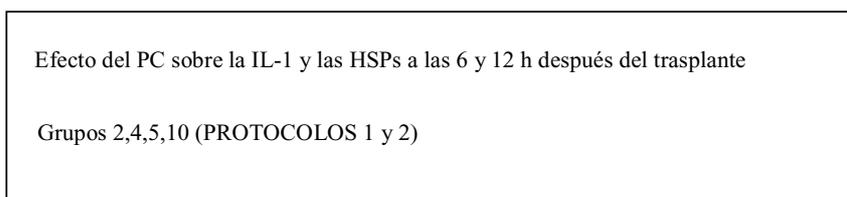
Transaminasas, IL-1, MDA, PCNA, HGF, TGF- β , Nitritos y nitratos Histología

PROTOCOLO 2



Igual PROTOCOLO 1 y niveles de HSPs

PROTOCOLO 3



Transaminasas, IL-1, PCNA, HGF, TGF- β , Niveles de HSPs, Histología

3.4.3. TERCER ESTUDIO

Para evaluar la efectividad del PC en la lesión pulmonar asociada al trasplante hepático con injerto de tamaño reducido se recogieron muestras de plasma, tejido hepático y pulmonar, a las 24 horas después del trasplante de los grupos 1, 2, 3, 7, 8 y 9 del primer estudio y los grupos 3 y 8 del segundo estudio. Se determinaron los niveles de MDA y la actividad de mieloperoxidasa (MPO) en tejido pulmonar. Se midieron los niveles de IL-1 α y IL-1 β en muestras hepáticas. Se determinaron los niveles de TNF- α total, TNF- α libre y receptores solubles del TNF en plasma. Se realizaron análisis histológicos del tejido pulmonar.

A continuación se puede observar un esquema con las intervenciones y las determinaciones realizadas en este estudio:

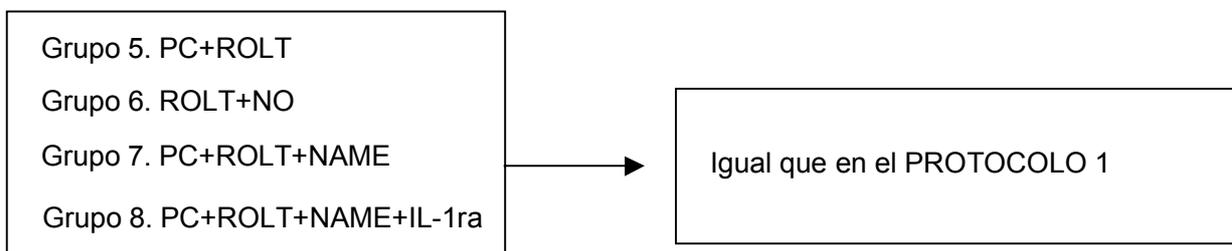
INTERVENCIONES

DETERMINACIONES

PROTOCOLO 1. Papel de la IL-1 en el daño pulmonar



PROTOCOLO 2. Efecto del PC sobre la IL-1 y el daño pulmonar



3.5. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

3.5.1. TRANSAMINASAS

Las transaminasas (aspartato amino transferasa, AST y alanina aminotransferasa, ALT) son enzimas citoplasmáticas muy abundantes en hígado que participan en el metabolismo de los aminoácidos y realizan la conversión de un aminoácido en un ácido carboxílico. Cuando existe una lesión hepática son liberadas al torrente sanguíneo; de tal forma que la determinación de los niveles en plasma es un reflejo de la lesión hepática.

La actividad de estas enzimas se determinó mediante un kit comercial (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). El ensayo enzimático mide la desaparición de NADH mediante espectrofotometría a una longitud de onda $\lambda=365$ nm.

Para la ALT se dan las siguientes reacciones:



En el caso de la AST tienen lugar las reacciones siguientes:



3.5.2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO

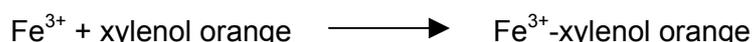
Determinación de malonildialdehido

El malonildialdehido (MDA) se utilizó como parámetro indirecto de estrés oxidativo inducido por los RLO en muestras tejido hepático y pulmonar. Las muestras de tejido congelado se homogenizaron en 2 ml de tampón Tris. A 250 μ l de este homogenado se le añadieron 250 μ l de ácido tricloroacético al 40% para precipitar las proteínas. Se vorteoó y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min a 4° C. Al sobrenadante se le añadió 250 μ l de ácido tiobarbitúrico 0.67%. Esta mezcla se llevó a 100° C durante 15 min. Se obtuvo un producto de color rosado que absorbía una longitud de onda de $\lambda=530$ nm y se determinó mediante espectrofotometría (202).

El estándar de MDA se preparó disolviendo 120 μl de 1,1,3,3-tetrahidroxipropano en 50 ml de HCl 0.1M; esta solución se calentó durante una hora a 50° C. Para la preparación de la recta de calibración se añadieron 50 μl de esta solución en 5 ml de agua; se cogieron 500 μl de esta última y se añadieron a 4.5 ml de agua, siendo éste el punto más concentrado de la recta patrón (10 nmoles/ml), a partir de ésta se hicieron 3 diluciones seriadas a la mitad.

Determinación de hidroperóxidos lipídicos

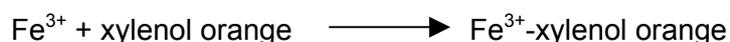
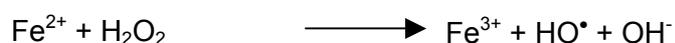
La determinación de hidroperóxidos lipídicos (LPO) es otra medida indirecta del estrés oxidativo. Dicha determinación se realizó mediante un kit comercial colorimétrico (OxisResearch, Portland, OR) que se basa en la oxidación del ión férrico por los hidroperóxidos, bajo condiciones ácidas. Luego, el ión férrico se une a una molécula que capta la longitud de onda $\lambda=560\text{nm}$.



Las muestras de hígado se pesaron y se homogenizaron en tampón fosfato 50 mM y pH=7.4 a 4° C. 500 μl del homogenado fueron desproteinizados y mezclados bajo condiciones ácidas con 1 ml de cloroformo. El extracto contenido en el cloroformo se centrifugó a 1600g durante 5 minutos a 0° C (246,247). En el sobrenadante obtenido se determinaron los hidroperóxidos mediante el kit comercial.

Peróxido de hidrógeno

La determinación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una medida de estrés oxidativo. El tejido hepático se homogenizó en un tampón Na_2HPO_4 0.033 M y KCl al 0.9%, con un pH=7.4 y a 4° C, con una relación peso/volumen de 10%. El homogenado se centrifugó a 40000 g durante 45 minutos y los sobrenadantes fueron utilizados para la determinación de H_2O_2 (248,249); para ello se utilizó un kit comercial (OxisResearch, Portland, OR) colorimétrico basado en la siguiente reacción:



3.5.3. MIELOPEROXIDASA (MPO)

La MPO es un enzima que se encuentra en los gránulos de los neutrófilos polimorfonucleares; y su determinación se utilizó como parámetro de infiltración y actividad de neutrófilos en tejido pulmonar (84,250).

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; con Hexadecirtrimetilamonio de bromuro 0.5%) y posteriormente se sonicaron y pasaron por tres ciclos de congelación/descongelación en nieve carbónica. Después las muestras fueron incubadas 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 3000-4000 g a 4° C y se recuperó el sobrenadante (204). A 5 μl del sobrenadante se le añadieron 10 μl de reactivo de tetrametilbencidina (5 mg/ml disuelto en dimetilsulfóxido). A tiempo $t=0$ se añadió 70 μl de tampón fosfato (KH_2PO_4 8 mM, 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 $\lambda=630$ nm.

3. 5.4. ACTIVIDAD XANTINA DESHIDROGENASA, XANTINA OXIDASA

Las muestras de tejido hepático se homogenizaron en tampón Tris 100 mM, que contenía EDTA 10 mM, 1 mM de fenilmetilsulfonilfluoride y 1 mM de ditiotreitól. El homogenado se centrifugó a 15000 g a 4° C. El sobrenadante se pasó por cromatografía de columna Sephadex G-25 80 en el mismo buffer a 4° C. Los eluatos resultantes se utilizaron para medir la actividad XDH y XOD. Las actividades fueron medidas por espectrofotometría mediante la detección del ácido úrico que se formaba por la acción de estas enzimas. Se determinó la aparición de ácido úrico a una longitud de onda $\lambda=292$ nm con presencia de NAD^+ (para medir actividad total, XDH+XOD) o ausencia de NAD^+ (para medir la actividad específica XOD). Se utilizó xantina como sustrato. Se determinó la cinética del enzima durante 5 min a 20° C (59,251).

3.5.5. NUCLEÓTIDOS DE ADENINA, HIPOXANTINA Y XANTINA

La determinación de ATP, ADP Y AMP en tejido hepático se utilizó como parámetro de funcionalidad hepática (252). La determinación de estos nucleótidos, al igual que la de la hipoxantina y xantina, se llevó a cabo por cromatografía líquida de

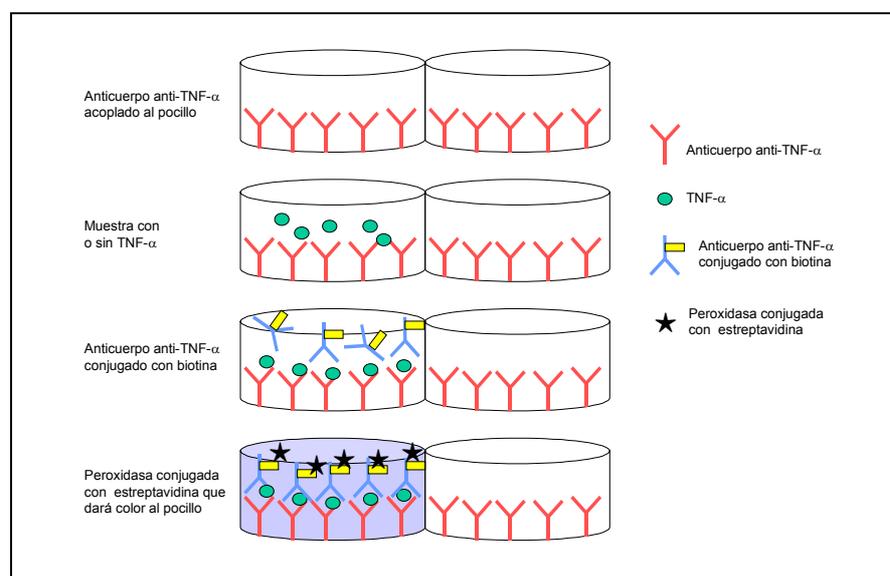
alta resolución (HPLC). Brevemente, las muestras fueron homogenizadas en 10 volúmenes de HClO_4 al 3.6% y mantenidas a 0.5°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo las muestras fueron centrifugadas a 850 g durante 15 min. Los sobrenadantes se ajustaron a $\text{pH}=6$ y fueron centrifugados a 14000 rpm. Los perfiles de nucleótidos y productos de degradación se obtuvieron usando una columna de fase reversa Spherisob ODS (C18, $5\ \mu\text{m}$ de medida de partícula, $15\times 0.4\ \text{cm}$, Teknokroma, Sant Cugat, Spain) acoplado a un cromatógrafo líquido 600 (Waters, Milford, MA). Las separaciones de los diferentes nucleótidos y productos de degradación se realizaron a 254 nm (251,253).

3.5.6. NITRITOS Y NITRATOS

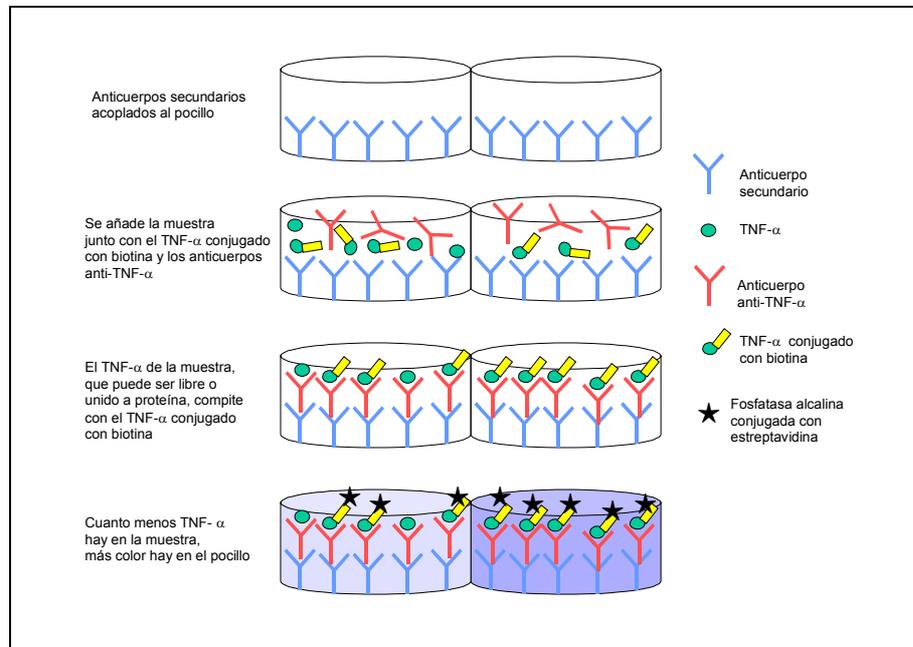
El tejido hepático congelado se homogenizó en tampón Tris-HCl 100 mM $\text{pH}=7.4$ y a 4°C . Para desproteinizar el homogenado, 500 μl del mismo se mezclaron con 100 μl de HCl 1N. Después de una centrifugación, el sobrenadante se ajustó a un $\text{pH}=7.6$ con 100 μl de solución NaOH 1N y 300 μl de Tris-HCl 100mM. La concentración de nitritos y nitratos se realizó mediante el uso de un kit comercial (Cayman Chmical, 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 (150,254).

3.5.7. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α (TNF- α)

El TNF- α libre se determinó en plasma mediante un kit de ELISA (Biosource, CA USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el siguiente esquema se muestra el proceso:



El TNF- α total, libre y unido a proteína (como pueden ser los sTNFRs) se determinó mediante un kit de inmunoensayo competitivo (Chemicon International, Temecula, CA). El procedimiento tiene lugar como se indica en el siguiente esquema:



3.5.8. RECEPTORES SOLUBLES DE TNF- α

Los receptores solubles de TNF- α , sTNFR1 y sTNFR2, se determinaron en plasma mediante la realización de un kit de ELISA (R&D systems, Minneapolis, USA).

3.5.9. INTERLEUQUINA 6

Las muestras de tejido hepático se homogenizaron en un tampón que constaba de 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 3000 g durante 15 minutos a 4° C (255). La detección de IL-6 se realizó mediante un kit comercial de ELISA (rat IL-6 ELISA kit, Biosource, Camarillo, CA).

3.5.10. FACTORES DE CRECIMIENTO (HGF Y TGF- β)

Para la determinación del HGF las muestras de hígado se homogenizaron en un tampón que contenía Tris(hidroximetil)aminometano-HCl 20 mM, NaCl 2M, Fluoruro de fenilmetilsulfóxido (PMSF) 1 mM, ácido etilendiaminotetraacético 1 mM y

polioxietilensorbitano mono-oleato al 0.1%. El homogenado se centrifugó a 20000 g 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) (256,257).

Para la determinación del TGF- β , las muestras de hígado se homogenizaron en tampón fosfato, pH=7.4, que contenía PMSF 2 mM y Pepstatina A 1 mg/ml, a 4° C. Los homogenados se centrifugaron a 10000 g 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) (258,259).

3.5.11. INTERLEUQUINA 1 (IL-1)

Las muestras de hígado se homogenizaron en tampón fosfato 50mM a pH 6.0, conteniendo PMSF 2 mM, antipaina 1 mg/ml, leupeptina 1 mg/ml y pepstatina A 1 mg/ml. Los homogenados se centrifugaron a 100000 g durante 1 hora a 15° C y los sobrenadantes se conservaron a -80° C para su posterior determinación de IL- α y IL-1 β (203).

Se utilizaron unos kits de ELISA (Amersham Life Science, UK) que utilizan anticuerpos de rata contra IL-1 α y IL-1 β unidos al fondo del pocillo, anticuerpos biotilados contra IL-1 α y IL-1 β , un conjugado de estreptavidina con peroxidasa y TMB, con la posterior lectura de absorbancia a 450 nm.

3.5.12. 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 Coomassie en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. La concentración de proteínas en la muestra es directamente proporcional a la absorbancia observada a una longitud de onda $\lambda=595$ 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.

3.6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.6.1. WESTERN BLOT PARA LAS HSPs

Para obtener los extractos totales, 250 mg de tejido hepático fueron homogenizados en un tampón de lisis que contenía Tris-HCl 50 mM (pH=7.5), NaCl 150 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 0.1 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tritón X-100 al 0.05%, y una pastilla de inhibidores de proteasas por cada 50 ml de tampón (Complete, Roche). Se incubó el homogenado 15 minutos en hielo y se centrifugó a 15000 g durante 20 minutos y a 4° C.

Las muestras se mezclaron con tampón de carga (relación 1:1), que constaba de β-mercaptoetanol y tampón Laemmli (Biorad, CA) en proporción 1:19. Se carga igual cantidad de proteína, 20 μg para la HSP70 y HSP90 y 50 μg para la HO-1 y la HSP25. Se corrió un gel al 10% de SDS-poliacrilamida para separar las proteínas y fueron transferidas a una membrana de PVDF. Los geles se tiñeron con Comassie para asegurarnos que se había cargado igual cantidad de proteína y que las proteínas se habían transferido a la membrana.

Las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (5% de leche en polvo no grasa en PBS con el 0.1% de Tween-20). La incubación con el anticuerpo primario se hizo durante toda la noche a 4° C (dilución 1/500 para la HSP-70, HO-1 y la HSP25 y 1/1000 para la HSP90 en tampón PBS con el 0.1% de Tween-20 y el 5% de leche en polvo no grasa). Luego se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano, anti-conejo para al HO-1 y anti-ratón para la HSP90, HSP70 y HSP25 (dilución 1/5000 en tampón PBS con el 0.1% de Tween-20 y el 5% de leche en polvo no grasa) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para la visualización de la señal quimioluminiscente se utilizó el sistema Immun-Star HRP (Bio-rad, CA) y las membranas se expusieron frente a películas fotográficas. Las películas obtenidas se escanearon y se cuantificaron con un sistema de análisis de imagen (Bio-Rad, CA). La cuantificación de las diferentes HSPs se estandarizó respecto la β-actina, para ello las membranas fueron incubadas con un anticuerpo primario que reconocía la β-actina (dilución 1/10000 en tampón PBS con el 0.1% de Tween-20 y el 5% de leche en polvo no grasa) durante toda la noche a 4° C, y de igual manera se siguió el proceso anterior hasta obtener la señal (176).

Los anticuerpos primarios contra la HSP90 y la HSP 70 fueron obtenidos de la casa comercial BD Transduction Laboratories (San José, CA), los de la HO-1 y la β -actina a partir de Sigma Chemical (St Louis, MO) y la HSP25 a partir de la casa comercial StressGen (Vancouver, BC).

3.6.2. PCR A TIEMPO REAL PARA LA IL-1 α

La extracción de RNA total se realizó mediante el kit comercial UltraSpec RNA isolation system (Biotecx Laboratories, Houston, TX). Básicamente se homogenizó el tejido hepático, el homogenado se incubó con cloroformo, se centrifugó la muestra a 12000 g durante 15 minutos. Se recogió la fase acuosa, para añadirle isopropanol. Se centrifugó de nuevo a 12000 g durante 10 minutos y se recuperó el "pellet", donde se encuentra el RNA. Se lavó el RNA con etanol dos veces. Finalmente se resuspendió y se incubó 10 minutos a 55° C para guardarlo a -80° C. Se realizó la cuantificación del RNA por espectrofotometría y se calculó la relación $A_{260}/_{280}$ y se comprobó la calidad del RNA en un gel de agarosa.

La retrotranscripción del RNA se realizó mediante un Kit (Ready-To-go You-Prime First-Stand Veda, Amersham, Uppsala, Sweden). IL-1 α se amplificó mediante la PCR de tiempo real usando el probe/primer set (Rn00556700_ml) para la IL-1 α de rat (NM_017019) (Applied Biosystems, Foster City, CA). La cuantificación de la expresión génica de IL-1 α se relativizó con la expresión de la β -actina (probe/primer: Rn00667869_ml, Applied Biosystems) y se calculó mediante el método de $\Delta\Delta C_T$ (260).

3.7. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

3.7.1. IMMUNOHISTOQUÍMICA DE PCNA

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína multifuncional de 32 KDa que se expresa en grandes cantidades al final de la fase G1 y al principio de la fase S del ciclo celular y es esencial para la progresión a través del ciclo celular. Esta proteína forma parte de la maquinaria que se ocupa de la replicación del DNA, así funciona como proteína accesoria de la DNA polimerasa δ (implicada en la replicación del DNA cromosomal) y de la DNA polimerasa ϵ (implicada en la recombinación y reparación del DNA).

La determinación de esta proteína nos da una idea de la proporción de células que se están dividiendo. 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 μm de grosor. Los cortes se desparafinaron con xilol y se hidrataron con soluciones de etanol de concentraciones decrecientes.

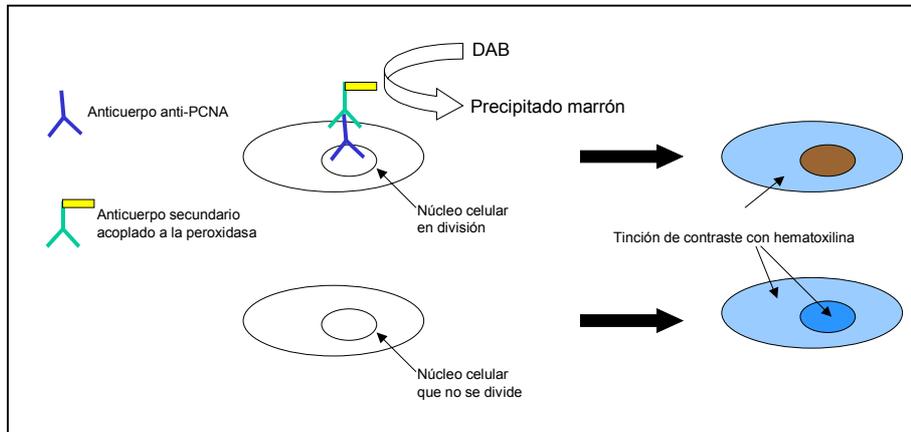


Figura 3.13. Inmunohistoquímica de PCNA.

La inmunohistoquímica se llevó a cabo mediante un kit comercial (DAKO Envision+System, preoxidase (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 PCNA (clone PC10; dilución 1:20; Dako, Alemania). Después de incubar con el anticuerpo secundario, las muestras fueron tratadas con DAB y el sustrato cromógeno que daría un precipitado marrón a las células en división (Figura 3.13). Se tiñen los cortes con hematoxilina para dar una tinción de contraste y se montan los portaobjetos.

El índice de marcaje de PCNA se determinó mediante el conteo de núcleos teñidos en 30 campos de gran aumento. Y los datos se expresaron como el porcentaje de células teñidas respecto al número total de hepatocitos (261,262).

3.7.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO CON H&E

Las muestras de hígado y pulmón se procesaron según el procedimiento estándar para su estudio mediante microscopía óptica. Inmediatamente después de la extracción, las muestras se fijaron por lo menos durante 24 horas en paraformaldehído tamponado al 4%. Tras la inclusión en parafina, las muestras se cortaron con un ultramicrotomo en secciones de 4-5 μm . Se realizó la tinción con hematoxilina eosina.

Para estudiar la lesión hepática, las secciones se evaluaron mediante un método de conteo utilizando la siguiente escala: grado 0, lesión mínima o sin evidencia

de lesión; grado 1, lesión leve que consiste en vacuolización citoplasmática y pignosis nuclear focal; grado 2, lesión de moderada a severa con pignosis nuclear extensa, hipereosinofilia citoplasmática; grado 3, necrosis severa con desintegración de los cordones de hepatocitos, hemorragias y infiltrado de neutrófilos. Para determinar el grado de necrosis se valoraron 40 campos de gran aumento por cada sección, de manera aleatoria (26333,264).

3.8. 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 T de Student, $p < 0.05$. Los datos están expresados con valor de la media \pm error estándar de la media.