



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Mecanismos de señalización en el trasplante hepático de donantes con criterio extendido

Marc Micó Carnero

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

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

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

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

Mecanismos de señalización en el trasplante hepático de donantes con criterio extendido

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

Mecanismos de señalización en el trasplante hepático de donantes con criterio extendido

Memoria presentada por Marc Micó Carnero para optar al título de doctor por la Universidad de Barcelona

Dra. Carmen Peralta Uroz

Directora

Dra. Araní Casillas Ramírez

Directora

Dra. Laura Baldomà Llavínés

Tutora

Marc Micó Carnero

Doctorando

Marc Micó Carnero, 2024

A mi familia y amigas

AGRADECIMIENTOS

El estar escribiendo estas páginas no sería posible sin la gente que va a aparecer en ellas, así que espero no olvidarme de nadie.

En primer lugar, como no podría ser de otra manera me gustaría agradecerle a la Dra. Carmen Peralta la oportunidad de haber realizado esta tesis doctoral. Gracias por su supervisión, por sus lecciones y por haberme enseñado tanto la capacidad de interpretar y discutir cualquier tipo de resultado como la de desarrollar todavía más la capacidad de pensamiento crítico. Muchísimas gracias por haberme dado la confianza que ha depositado en mí y haberme permitido enfrentarme a los retos a los que me he enfrentado en estos cuatro años. De igual manera, agradecerle toda la supervisión y ayuda a la Dra. Araní Casillas-Ramírez. No debe ser fácil dirigir una tesis doctoral a distancia, pero usted ha estado ahí siempre que he necesitado su ayuda. Gracias por las correcciones, por la guía que me ha dado y por enseñarme hasta por video si ha hecho falta. Gracias a ambas por la dirección de la tesis y por haberme guiado durante su realización. No me gustaría olvidarme de la Dra. Laura Baldomà, gracias por haberme tutorizado la tesis y por su amabilidad siempre que la he necesitado en su seguimiento. Por último, gracias también a la Dra. Josefa Badia, la coordinadora del programa de doctorado, por haber sido tan amable durante estos años y haber estado siempre dispuesta a ayudarnos y brindarnos apoyo en todos y cada uno de los trámites que hemos tenido que realizar durante esta etapa. Gracias por facilitarnos tanto todo.

Gracias también a todos los investigadores que han pasado por el laboratorio durante estos años. Gracias a la Dra. Mónica Jiménez por haberme ayudado tanto cuando empecé. Poca gente hubiese podido hacerlo como lo hiciste. Gracias a todos los compañeros que han estado gran parte de esta etapa conmigo en el CEK. Cris, gracias por haber estado siempre pendiente de todo y por haberme ayudado incluso cuando no te lo he pedido. Haber tenido a una persona como tú en el lab ha hecho que todo esto haya sido mucho más fácil. Paco y Albert, gracias por haber estado siempre dispuestos a ayudarme en cualquier cosa que he necesitado. Carlos, gracias por haber estado mano a mano durante todo este tiempo llevando nuestras tesis siempre a la par. Se podría decir que acabamos esta etapa cada uno con dos tesis. No me gustaría

olvidarme de todos los estudiantes de prácticas que han pasado también por el grupo durante estos años y como no, también de Marina y Marga por habernos ayudado tanto durante el tiempo que habéis estado trabajando aquí.

Gracias a todos los compañeros del CEK. Gracias a Esther y Loreto por habernos ayudado y guiado con todo lo que necesitábamos durante el inicio de nuestra etapa. Aprendimos muchísimo de vosotras. Gracias a todo el grupo del Dr. Clària. La verdad que fuisteis muy buenos vecinos. Gracias no solo por haber estado disponibles para ayudarnos cuando hemos necesitado, sino también por las risas, los desayunos y por hacer más divertidas las jornadas laborales. Gracias también a las investigadoras del grupo de la Dra. Affò por haber compartido esta última fase de esta etapa. Muchas gracias también a mi compañera de planta Agavni, mil gracias por toda la ayuda y por haber sido la mejor vecina. No me gustaría dejarme a Pepa, muchas gracias por ayudarnos tanto y por llevar la planta como la llevas. Gracias a todo el resto de personal científico y técnico, así como investigadores de otros grupos que me han prestado ayuda cuando la he necesitado (al grupo del Dr. Jordi Gracia, del Dr. Morales, personal del estabulario, del biobanco etc).

Me gustaría manifestar mi agradecimiento a la "*Societat Catalana de Trasplantament*" y las diferentes COST por el apoyo que me han otorgado con las becas concedidas.

Muchas gracias también a todo el mundo con el que he podido trabajar durante estos años: Silvina, la Dra. Gazouli, Alfredo y de más colaboradores del grupo.

Llegados a este punto, no me gustaría acabar sin agradecer el apoyo a las personas más importantes de mi vida: mi familia y mis amigas.

Silvia, Anna y Code gracias por todo, por todos estos años, y por al fin y al cabo haber sido mi primer círculo de confianza. Pocas cosas me alegran más que haber visto y seguir viendo cómo pese a crecer y cambiar, seguimos estando juntas y seguís siendo uno de mis mayores pilares. A parte de por haber estado durante esta etapa, gracias por haber hecho que nuestro mundo se vaya haciendo cada vez más y más grande con personas increíbles, cada una a su manera. Aarón, Nina, Nuria, Edu, Marta etc.

muchísimas gracias a vosotras también, habéis hecho esta etapa muchísimo más llevadera.

Y ahora os toca a vosotras. Bebi, Burgos, Nuria. No sé por dónde empezar, ni siquiera cuando parar. Bebs, no podría haber encontrado mejor persona para haber empezado el cambio que supone independizarse, no podría haber elegido a alguien mejor para vivir esta experiencia en esta etapa de mi vida. Nuria y Burgos gracias por todo: por estar ahí, por preocuparos, por ser como sois y por ser capaces de hacerme reír como y cuando sea. Esta tesis también es de vosotras tres, sin vosotras no sé cómo hubiese acabado esta etapa. Joan, Leire, Paloma y Sara, junto a ellas, habéis hecho que, pese a todo, estos años hayan sido una de las mejores etapas de mi vida. Solo os puedo dar las gracias a las 7 por ser y hacer de cualquier sitio en el que estéis, el espacio más seguro que alguien puede encontrar.

Y, por último, gracias a mi familia, no puedo tener una mejor. Gracias a mis abuelos por haber estado tanto conmigo, en parte gracias a vosotros somos como somos y llegamos donde llegamos. Gracias a mis padres por haber apoyado siempre las decisiones que he tomado durante todos mis estudios y por haber hecho todo lo posible e incluso más para que haya podido llegar donde estoy. Gracias también a mi hermano. Eres un ejemplo a seguir en muchas cosas, pero sobre todo en lo que se refiere a valentía para enfrentarte a cambios. Esta tesis doctoral es también vuestra.

RESUMEN

En la práctica clínica, el trasplante de hígado supone una de las pocas soluciones a enfermedades hepáticas en estado terminal. Multitud de personas fallecen esperando un injerto hepático debido a la escasez de órganos. Actualmente, entre el 70 y el 80% de los órganos disponibles para trasplante proceden de donantes con muerte cerebral (BD), lo que reduce la tolerancia de estos injertos a la lesión por isquemia-reperfusión (I/R), reduciendo la viabilidad de los mismos. La falta de órganos disponibles, ha derivado en la utilización de hígados denominados “injertos de criterio extendido” para el trasplante, como los que presentan esteatosis (50% de los injertos procedentes de donantes con BD). La presencia de esteatosis hepática se considera un factor de riesgo para el éxito en la cirugía de trasplante ya que estaría afectando a los resultados post-operatorios. Esta condición es cada vez más prevalente en la sociedad y puede ser debida a varios factores como la dieta o el consumo abusivo de alcohol. Este último factor, estaría también causando un gran número de patologías hepáticas que se engloban dentro de las ALD (enfermedad hepática relacionada con el consumo de alcohol), lo que estaría también afectando a la viabilidad de los injertos según los datos de la ONT (Organización Nacional de Trasplantes). En la presente tesis hemos establecido que: (a) el tratamiento con emulsiones lipídicas protege a los injertos esteatósicos de donantes con BD frente a la lesión por isquemia-reperfusión e inflamación; (b) la neuregulina-1 endógena estaría ejerciendo efectos beneficiosos frente al daño inducido por I/R en el TH con injertos procedentes de donantes con BD mediante las vías NRG1-PAK1-VEGFA (injertos no esteatósicos) y NRG1-PAK1-IGF1 (injertos esteatósicos); y (c) la GH protege a los injertos con ALD procedentes de DBDs antes de su extracción mediante el aumento en la expresión de VEGFB y de VEGFA en el intestino. Los resultados derivados de la presente tesis son de interés científico y clínico y son de vital importancia para contribuir al desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas para en última instancia mejorar la viabilidad de los injertos hepáticos sometidos a trasplante, mejorar los resultados post-operatorios y evitar el problema socioeconómico que representa la escasez de órganos disponibles para el trasplante. En la presente Tesis Doctoral se presentan estrategias que pueden ser útiles en el trasplante hepático con injertos procedentes de donantes con BD con injertos con

criterio extendido, los cuales son rechazados para trasplante por sus condiciones patológicas, lo cual no hace más que agravar la problemática clínica de las listas de espera.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN.....	11
1. TRASPLANTE HEPÁTICO.....	11
2. INJERTOS HEPÁTICOS CON CRITERIO EXTENDIDO PROCEDENTES DE DONANTES CON MUERTE ENCEFÁLICA	12
2.1. Esteatosis hepática	14
2.2. Enfermedad hepática relacionada con el consumo de alcohol (ALD).....	15
3. LESIÓN POR ISQUÉMIA/REPERFUSIÓN	17
3.1. Lesión por I/R en injertos procedentes de donantes con criterio extendido..	21
4. EJE INTESTINO-HÍGADO.....	22
5. PAPEL DE LA NUTRICIÓN EN LA LESIÓN HEPÁTICA POR I/R	25
6. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA REDUCIR LA LESIÓN POR I/R EN EL TH	26
7. FACTORES DE CRECIMIENTO Y SU PAPEL EN LA LESIÓN HEPÁTICA POR I/R.....	31
7.1. Factor de crecimiento insulínico (IGF-1).....	31
7.2. Factor de crecimiento vascular-endotelial A y B (VEGFA/B)	32
8. RELEVANCIA DE NRG-1 EN EL TH Y LA LESIÓN HEPÁTICA POR I/R	34
9. LA HORMONA DEL CRECIMIENTO EN EL TH Y LA LESIÓN POR I/R.....	36
OBJETIVOS	41
MATERIAL Y MÉTODOS.....	47

1.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	47
1.1.	Modelo experimental de esteatosis inducida genéticamente	47
1.2.	Modelo de esteatosis inducida nutricionalmente.....	48
1.3.	Modelo de ALD	48
2.	MODELO EXPERIMENTAL	49
2.1.	Anestesia.....	49
2.2.	Inducción de la muerte cerebral.....	49
2.3.	Trasplante hepático ortotópico	51
2.3.1.	Cirugía del donante	52
2.3.2.	Cirugía del banco	53
2.3.3.	Cirugía del receptor	53
3.	DISEÑO EXPERIMENTAL	55
3.1.	Diseño experimental del estudio 1	55
3.2.	Diseño experimental del estudio 2	57
3.3.	Diseño experimental del estudio 3	60
4.	DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	62
4.1.	Transaminasas	62
4.2.	Ensayo de malondialdehído.....	63
4.3.	Actividad de la mieloperoxidasa	63
4.4.	Proteínas totales	64
4.5.	Ensayos inmunoenzimáticos y colorimétricos.....	64
4.5.1.	Ensayos de marcadores inflamatorios	64
4.5.2.	Determinación de marcadores de daño celular	65
4.5.3.	Marcadores de regeneración	67
4.5.4.	Marcadores de actividad metabólica	67
4.5.5.	Ensayo inmunoenzimático de las vías de señalización estudiadas	68

5. EXTRACCIÓN DE ARN, RETROTRANSCRIPCIÓN Y qPCR.....	68
6. PERMEABILIDAD VASCULAR.....	69
7. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	69
7.1. Técnicas de inmunohistoquímica	69
7.2. Daño hepático.....	70
7.3. Grado de esteatosis hepática	70
7.4. Grado de fibrosis hepática.....	71
7.5. Daño de la mucosa intestinal.....	71
7.6. Tinción de TUNEL.....	72
8. EDEMA.....	72
9. ESTUDIO ESTADÍSTICO	72

RESULTADOS..... 75

1. ESTUDIO 1: PAPEL DEL TRATAMIENTO NUTRICIONAL EN EL DAÑO HEPÁTICO E INTESTINAL EN EL TRASPLANTE CON INJERTOS HEPÁTICOS ESTEATÓSICOS Y NO ESTEATÓSICOS PROCEDENTES DE DONANTES CON MUERTE CEREBRAL	75
1.1. Efectos de la administración de lípidos y glucosa en el daño hepático en el TH con injertos esteatósicos y no esteatósicos en un modelo experimental de obesidad inducida genéticamente	75
1.2. Mecanismos de acción implicados en los efectos de la glucosa y los lípidos en hígados esteatósicos y no esteatósicos en un modelo experimental de obesidad inducida genéticamente	77
1.3. Relevancia del intestino en los efectos de la administración de lípidos y glucosa en el daño hepático en el TH con injertos esteatósicos y no esteatósicos en un modelo experimental de obesidad genéticamente	80
1.4. Daño hepático e inflamación intestinal en el TH procedente de DBDs en un modelo de obesidad inducido nutricionalmente	82

2. ESTUDIO 2: PAPEL DE LA NEUREGULINA-1 EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO DE INJERTOS ESTEATÓSICOS Y NO ESTEATÓSICOS DE DONANTES CON MUERTE CEREBRAL

87

2.1. Papel del NRG1 en el TH con hígados esteatósicos y no esteatósicos de DBDs en un modelo experimental de obesidad inducida genéticamente..... 87

2.2. Papel de NRG1 en injertos esteatósicos y no esteatósicos sometidos a TH procedentes de DBDs en un modelo de obesidad inducida nutricionalmente..... 100

3. ESTUDIO 3: RELEVANCIA DEL EJE GH-VEGFB/VEGFA EN INJERTOS HEPÁTICOS PROCEDENTES DE DONANTES CON MUERTE CEREBRAL CON ENFERMEDAD HEPÁTICA RELACIONADA CON EL CONSUMO DE ALCOHOL 103

3.1. Validación del modelo de ALD 103

3.2. La vía GH-VEGFB/VEGFA en DBDs con ALD 105

3.3. Relevancia de la vía GH-VEGFB/VEGFA en DBDs con ALD antes de la extracción del injerto del donante 107

DISCUSIÓN 115

CONCLUSIONES 133

BIBLIOGRAFÍA 137

ANEXOS 173

LISTADO DE ABREVIATURAS

AA: Aminoácido

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AKT: Proteína quinasa B

ALD: Enfermedad hepática relacionada con el consumo de alcohol

ALP: Fosfatasa alcalina

ALT: Alanina aminotransferasa

ARN: Ácido ribonucleico

AST: Aspartato aminotransferasa

BAs: Ácidos biliares

BCAA: Aminoácidos de cadena ramificada

BD: Muerte encefálica

BHB: β -hidroxibutirato

BSA: Albúmina de suero bovino

CI: Isquemia fría

CK: Células de Kupffer

DAB: Diaminobenzidina

DBD: Donantes con muerte encefálica

DCD: Donantes con muerte cardiocirculatoria

DMSO: Dimetilsulfóxido

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Receptor de EGF

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

ErbB3: Receptor tirosina proteína quinasa 3

FFA: Ácidos grasos libres

FFAA: Ácidos grasos

FGF15: Factor de crecimiento fibroblástico 15

FXR: Receptor farnesoide X

GH: Hormona del crecimiento

GHR: Receptor de la hormona del crecimiento

GHRH: Hormona reguladora de la liberación de GH

GLP-1: Glucagón-like peptide-1 (*Péptido-1 parecido al glucagón*)

GODT: Observatorio Global de Donación y Trasplantes

GSH: Glutatión

GSK3 β : Glicógeno-sintasa quinasa-3 β

HA: Ácido hialurónico

HCC: Carcinoma hepatocelular

HES: Almidón hidroxietílico

HGF: Factor de crecimiento hepatocitario

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HRP: Peroxidasa de rábano

HSC: Células estrelladas hepáticas

HTBA: Hexadeciltrimetilamonio

HTK: Histidina-triptófano-cetoglutarato

ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular

IGF1: Factor de crecimiento insulínico 1

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-10: Interleucina 10

I/R: Isquemia-reperfusión

IRI: Lesión por isquemia-reperfusión

K⁺: Ión extracelular potasio

KH₂PO₄: Fosfato monopotásico

KO: *Knockout*

LC-PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

Ln: *Lean*

LPS: Lipopolisacárido

LSEC: Célula endotelial sinusoidal hepática

MAFLD: Enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica

MDA: Malondialdehído

MPO: Mieloperoxidasa

Na⁺: Ión extracelular sodio

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducida

NAFLD: Hígado graso no-alcohólico

NASH: Esteatohepatitis no alcohólica

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

NK: Natural Killer (*asesinas naturales*)

NKT: Natural killer-T

NLR: Nod-like receptor (*Receptor de tipo Nod*)

NLRP3: Dominio de pirina de la familia NLR que contiene 3 (*NLR family pyrin domain containing 3*)

NO: Óxido nítrico.

NRG1: Neuregulina-1

Ob: Obeso

OCT: Temperatura óptima de corte

ONT: Organización Nacional de Trasplantes

PBS: Tampón fosfato salino

PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación

PEG: Polietilenglicol

PH: Hepatectomía parcial

PI: Precondicionamiento isquémico

pNP: p-nitrofenol

pNPP: p-nitrofenil fosfato

PO4: Ácido fosfórico

PPAR-γ: Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas

ROS: Radicales libres de oxígeno

SCFA: Ácidos grasos de cadena corta

S1P: Esfingosina-1-fosfato

SST: Somatostatina

T3: Triiodotironina

T4: Tiroxina

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TC: Colesterol total

TCA: Ácido tricloroacético

TG: Triglicéridos

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

TGR5: Receptor 5 acoplado a proteína Takeda G (*Takeda G protein-coupled receptor 5*)

TH: Trasplante hepático

TLR: Toll-like receptor (*Receptor de tipo Toll*)

TLR4: Toll-like receptor 4

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TUNEL: Marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa

UW: Universidad de Wisconsin

VEGFA: Factor de crecimiento endotelial-vascular A

VEGFB: Factor de crecimiento endotelial-vascular B

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento vascular-endotelial

VCAM: Molécula de adhesión celular vascular

vWF: Factor de von Willebrand

WI: Isquemia caliente

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. TRASPLANTE HEPÁTICO

El trasplante hepático (TH), continúa siendo la única terapia efectiva para las enfermedades hepáticas crónicas en fase terminal. Las indicaciones incluyen daño hepático irreversible causado por diversos factores, que pueden ser infecciones virales crónicas, consumo excesivo de alcohol, enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica (MAFLD por sus siglas en inglés), patologías biliares, cáncer hepático o incluso un fallo hepático agudo (Pollok et al. 2023). Se estima según la GODT (Observatorio Global de Donación y Trasplantes) que en 2022 hubo más de 37.000 trasplantes de hígado a nivel global (GODT 2023) y solo en España casi 1.200 según la ONT (Organización Nacional de Trasplantes) (ONT 2023). Estas cifras muestran la importancia clínica y socioeconómica que puede llegar a alcanzar dicho procedimiento. La alta demanda de requerimientos de esta cirugía, así como el incremento de las listas de espera y la escasez de órganos disponibles para ser trasplantados, ha llevado a los centros a utilizar para el trasplante, hígados considerados de criterio extendido (Lascaris et al. 2022). Estos injertos se consideraban no aptos para trasplantar ya que tenían un mayor riesgo de sufrir daño durante o después de la cirugía de trasplante debido a sus condiciones patológicas, entre los cuales encontramos injertos procedentes de donantes con esteatosis (especialmente severa), hígados con desórdenes debido al consumo excesivo de alcohol o procedentes de donantes con edad avanzada (Terrault et al. 2023). Se estima que entre el 70 y el 80% de los hígados disponibles para trasplante provienen de DBDs (Kwong et al. 2023; ONT 2023), de los cuales el 50% presenta esteatosis hepática (Reis-Júnior et al. 2019), siendo estos injertos con presencia de esteatosis más susceptibles a sufrir daño durante la cirugía debido al proceso inherente de isquemia-reperfusión -lo que conlleva además al desarrollo de un fallo regenerativo- (Xu et al. 2016). Este hecho acentúa aún más el problema de la escasez de órganos, ya que un porcentaje considerable de tales injertos se descarta para el trasplante (aprox.25%) debido al riesgo que conllevaría para el receptor (ONT 2023).

2. INJERTOS HEPÁTICOS CON CRITERIO EXTENDIDO PROCEDENTES DE DONANTES CON MUERTE ENCEFÁLICA

Los donantes cadavéricos se pueden clasificar principalmente en dos categorías: donantes con muerte cardiocirculatoria (DCD por sus siglas en inglés) y donantes con muerte encefálica (DBDs), siendo estos últimos los donantes cadavéricos más habituales (Jiménez-Castro et al. 2015). Con respecto a los injertos procedentes de DBDs, como se ha mencionado anteriormente, son más susceptibles al daño por isquemia-reperfusión y fallo en la regeneración inherente al TH. La muerte encefálica (BD por sus siglas en inglés), se caracteriza por una pérdida de función cerebral irreversible causada más comúnmente por una hemorragia, hipoxia o un traumatismo (Jiménez-Castro et al. 2015; Dziodzio et al. 2014).

La BD no es un proceso que afecte únicamente al sistema nervioso central o al hígado, ya que tiene efectos multisistémicos (alteraciones hormonales, inflamatorias, hemodinámicas etc.) que se desencadenan como consecuencia de un incremento de la presión intracraneal (Jiménez-Castro et al. 2015; Dziodzio et al. 2014). Se conoce que la afectación multiorgánica derivada de este proceso ocurre cuando ha habido una afectación del sistema nervioso autónomo que provoca la subsiguiente síntesis masiva de citoquinas pro-inflamatorias (Corps et al. 2015). Esta “tormenta” de citoquinas desencadena una activación del sistema inmunitario que conlleva infiltración neutrofílica y linfocitaria en los diferentes órganos, así como lo activación de diferentes mecanismos pro-inflamatorios (modulación de la actividad de las células NK, células de Kupffer, linfocitos T, NKT etc.), afectando la función del órgano (Jiménez-Castro et al. 2015; Dziodzio et al. 2014). Esta respuesta inflamatoria ocurre en el donante, antes de la extracción del injerto hepático del donante y de su implantación en el receptor, agravando la susceptibilidad de los injertos hepáticos a la consiguiente lesión producida por el proceso de isquemia-reperfusión (I/R) que ocurre durante el proceso de isquemia fría y cuando se implanta el injerto en el receptor (isquemia caliente), procedimiento previo a la perfusión del injerto en el receptor.

Un factor de vital importancia en el daño producido por la muerte cerebral es la liberación masiva de catecolaminas a nivel sistémico, que se da después del aumento

de presión intracraneal (Chiari et al. 2000). Esto provoca una desregulación de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático provocando alteraciones hemodinámicas que afectarán negativamente la viabilidad del injerto (Jiménez-Castro et al. 2015). Se producen fallos en la perfusión de los órganos y en consecuencia, una limitada oxigenación que no hace más que alterar el metabolismo derivándolo a un estado anaeróbico (J. A.B. Van Der Hoeven et al. 2001; Lazzeri et al. 2023; Joost A.B. Van Der Hoeven et al. 2000; Jiménez-Castro et al. 2015), resultando en acidosis metabólica por la generación de lactato (Novitzky D et. al 1988).

Se conoce que la BD causa disfunciones en el eje hipotalámico-pituitario, provocando cambios drásticos en los niveles hormonales en el torrente sanguíneo, como pueden ser los niveles de GH (hormona del crecimiento por sus siglas en inglés), que es segregada por la glándula pituitaria anterior (Tan et al. 2017; Nair-Collins et al. 2021). Estas alteraciones endocrinas estarían afectando también a la respuesta inflamatoria, ya que se ha reportado en diversos estudios que los bajos niveles de GH estarían relacionados con patologías que cursan con procesos inflamatorios (Boccanegra et al. 2023; Caicedo et al. 2018; Jiménez-Castro et al. 2015).

Según los datos anuales presentados por la ONT, la esteatosis es la primera causa de rechazo de un injerto para ser trasplantado, debido a la alta probabilidad que tienen estos órganos de sufrir un daño irreversible durante la cirugía (ONT 2023) (Tabla 1). Esta puede estar causada o no por el consumo de alcohol y como se ha descrito anteriormente, cerca del 50% de los injertos hepáticos disponibles para trasplante presentan cierto grado de esteatosis (Reis-Júnior et al. 2019). Es por este motivo que el estudio de los mecanismos moleculares que provocan una mayor disposición de estos órganos a sufrir daño durante la cirugía es de relevancia científica y clínica.

Tabla 1. Causa de no implante de hígados extraídos (n=524). (ONT 2023)

	N	%
Aspecto Macroscópico	384	73.3
Sin Especificar	121	31.5
Esteatosis	113	29.4
Ateromatosis	31	8.1
Mala perfusión	49	12.7
Fibrosis	36	9.4
Isquémico/necrosis	34	8.9
Cirrosis / hepatopatía	24	4.6
Biopsia	15	2.9
Tumor fuera del órgano valorado	13	2.5
Problemas anatómicos	8	1.5
Problema quirúrgico durante la extracción	8	1.5
Tumor en el órgano valorado	4	0.8
Otras	68	12.9

A continuación, se detallarán dos de las condiciones patológicas que pueden incrementar el daño por I/R cuando los injertos se someten a cirugía del TH: esteatosis hepática y ALD (enfermedad hepática relacionada con el consumo de alcohol).

2.1. Esteatosis hepática

La esteatosis hepática es la patología del hígado más prevalente en la sociedad, y se estima que alrededor del 50% de los DBDs la padecen (Reis-Júnior et al. 2019). Se ha reportado en diversos estudios clínicos y preclínicos que los injertos esteatóticos tienen un mayor riesgo de sufrir un fallo primario o disfunción después de la cirugía de TH (Álvarez-Mercado et al. 2019; Jiménez-Castro et al. 2015). Las dietas hipercalóricas, así como el sedentarismo en los últimos años han contribuido a que el porcentaje de personas que padecen esta condición esté incrementando y se estima una mayor prevalencia de tal desorden hepático en los próximos años (Younossi et al. 2018).

La esteatosis se define como la acumulación de grasa en los hepatocitos y puede estar causada por diversos factores. Esta se puede deber a la dieta, al síndrome

metabólico, diabetes, hiperlipidemia o consumo excesivo de alcohol entre otros factores (Powell et al. 2021). Podemos clasificar la esteatosis en macrovesicular y microvesicular, según si los hepatocitos contienen una sola vacuola lipídica o varias (S. Han et al. 2015). No obstante, se pueden presentar ambos tipos de esteatosis a la vez. Según el grado de esteatosis, se puede clasificar en: leve (<30% de infiltración grasa), moderada (30-60% de infiltración grasa) y severa (>60% de infiltración grasa) (S. Han et al. 2015).

Los trastornos del hígado graso los podemos clasificar en función de si son o no causados por el consumo de alcohol (Powell et al. 2021). El más común es el MAFLD. Esta condición puede ir o no acompañada de inflamación, pasándose a llamar NASH (esteatohepatitis no-alcohólica por sus siglas en inglés) en los casos donde cursa con inflamación (Younossi et al. 2018). Se estima que 1 de cada 3 pacientes con MAFLD desarrollaran NASH y algunos de estos acabaran desarrollando cirrosis y en último término HCC (Carcinoma hepatocelular), la forma más severa de enfermedad hepática crónica terminal (Hardy et al. 2016).

2.2. Enfermedad hepática relacionada con el consumo de alcohol (ALD)

La ALD es una de las principales causas de enfermedad hepática crónica a nivel mundial. Engloba un amplio espectro de patologías hepáticas que van desde la esteatosis causada por el consumo de alcohol, a la fibrosis, esteatohepatitis, cirrosis o en último término HCC. Su progresión provoca no solamente un daño hepático, sino la afectación de diferentes tejidos como puede ser el intestino entre otros (Wu et al. 2023). A más a más, se conoce que el consumo excesivo de alcohol, puede modular el sistema inmunitario incrementando o reduciendo su actividad (Wu et al. 2023; Lewis et al. 2023; Barr et al. 2016). A nivel global, los datos indican que el alcohol produce 3 millones de muertes anuales y es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad relacionadas con las patologías hepáticas (Wu et al. 2023). Otro dato que muestra la importancia socioeconómica y sanitaria que representa el consumo abusivo de dicha sustancia es que la ALD es actualmente una de las mayores causas de TH.

Los últimos datos de la ONT indican que casi el 25% de los injertos provinieron de donantes con algún tipo de problema relacionado con el consumo de alcohol.

Dichos informes reportan que durante los últimos 10 años muchos de estos injertos hepáticos fueron descartados en relación a aquellos que proceden de donantes sin ALD o sin problemas con el consumo de alcohol. Según la ONT, el nivel de alcohol consumido estuvo directamente correlacionado con el porcentaje de injertos hepáticos descartados para trasplante (ONT 2023). Se estima que el 40,6% de los hígados procedentes de donantes con un consumo importante de alcohol (más de 50 gr al día) son descartados, mientras que en los casos de injertos de donantes con un consumo moderado (menos de 50 gr de alcohol al día) el porcentaje disminuye a 35% y al 25% en los casos de donantes que no consumen alcohol (ONT 2023) (Figura 1). Hasta donde sabemos, no existen estudios encaminados a investigar las diferentes vías implicadas en el daño por I/R en injertos hepáticos de DBDs con ALD.

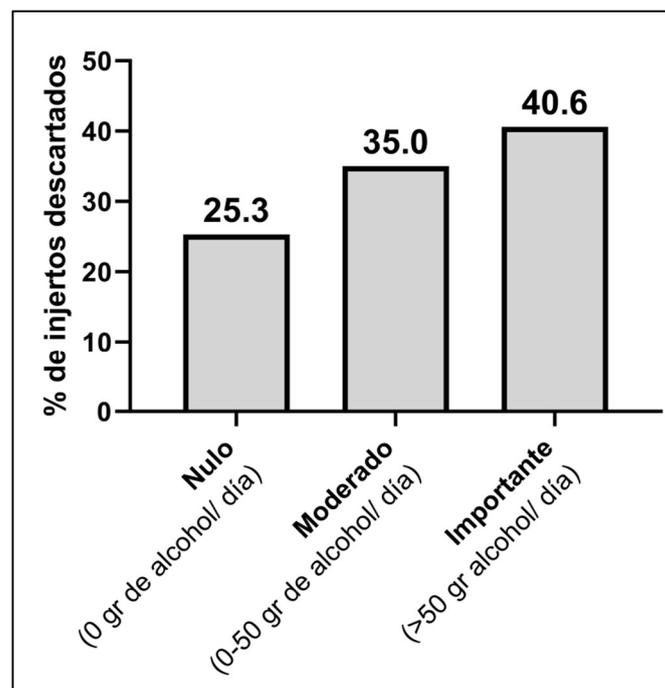


Figura 1. Porcentaje de injertos hepáticos descartados según el grado de consumo de alcohol del donante entre 2013 y 2022. (ONT 2023)

3. LESIÓN POR ISQUÉMIA/REPERFUSIÓN

La lesión inducida por isquemia-reperfusión (I/R) es un proceso que se da en las cirugías cuando se priva al órgano de flujo sanguíneo (isquemia) para restablecerlo posteriormente (reperfusión). Cada una de las fases de este proceso se asocia con mecanismos de daño diferentes. Mientras que durante la isquemia tiene lugar principalmente una falta de oxígeno y la producción de sustancias citotóxicas; la perfusión se asocia a la producción de mediadores pro-inflamatorios, fallos en la microcirculación hepática e infiltración neutrofílica en el parénquima hepático (Eltzschig et al. 2011).

La complejidad de los mecanismos celulares y líneas de señalización involucradas en la fisiopatología de la lesión por I/R hacen que sea una condición extensamente estudiada a lo largo de los años por un gran número de investigadores y que existan discrepancias en relación a dichos mecanismos (Gracia-Sancho et al. 2015).

En la práctica del TH, se presentan dos tipos de isquemia diferente: la isquemia fría (CI por sus siglas en inglés) y la isquemia caliente (WI por sus siglas en inglés). La lesión por CI se asocia a la preservación del injerto en una solución de preservación de órganos a 4°C, proceso que se inicia antes de la extracción del órgano del donante, cuando se perfunde con una solución de preservación a dicha temperatura (preservación hipotérmica estática). Después de su extracción, se conserva a esta misma temperatura hasta su implantación en el receptor. Los tiempos a los que se someten los injertos a periodos de CI son de entre 6 y 8 horas en la práctica clínica aun que se pueden dar tiempos de hasta más de 12 horas (Sibulesky et al. 2016; Kupiec-Weglinski et al. 2005). Cabe destacar que la duración de la CI es directamente proporcional al daño que sufre el órgano (Lozanovski et al. 2020). Después de este periodo, el órgano se ve sometido a un periodo de WI. Esta fase ocurre cuando este se coloca en la cavidad abdominal del receptor con tal de realizar las correspondientes anastomosis, y se le denomina también tiempo de implantación o anastomosis (Jochmans et al. 2018). Una vez realizadas, se restablece el flujo sanguíneo al órgano, lo que provocaría el daño por perfusión (Eltzschig et al. 2011) (Figura 2).

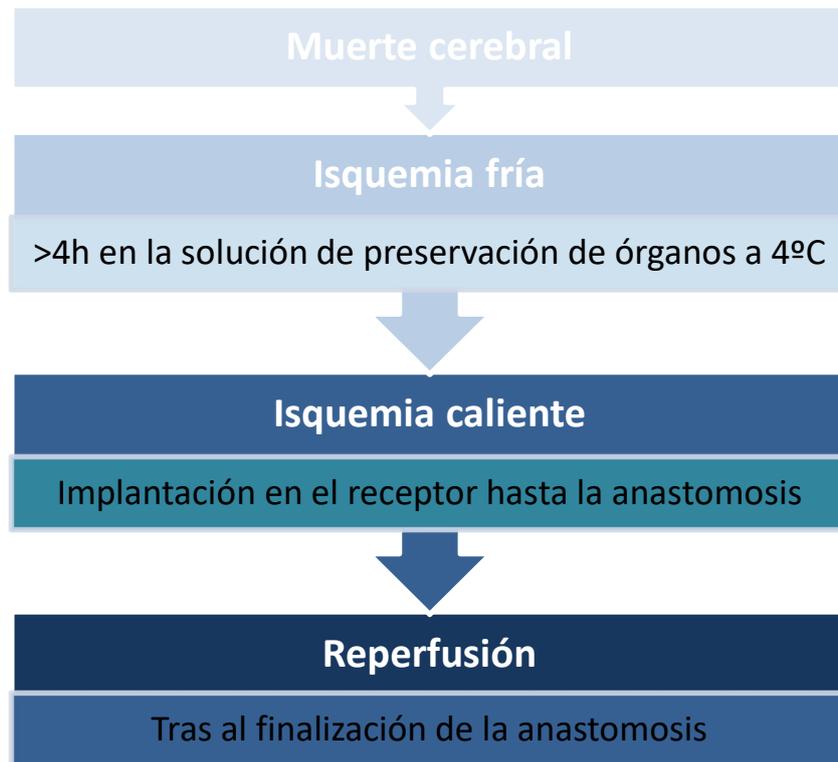


Figura 2. Fases del proceso de I/R en el TH con donantes con BD.

Como se ha mencionado anteriormente, son muchos los mecanismos celulares y tipos celulares implicados en la lesión hepática por I/R, algunos de los cuales se muestran en la siguiente imagen (Figura 3):

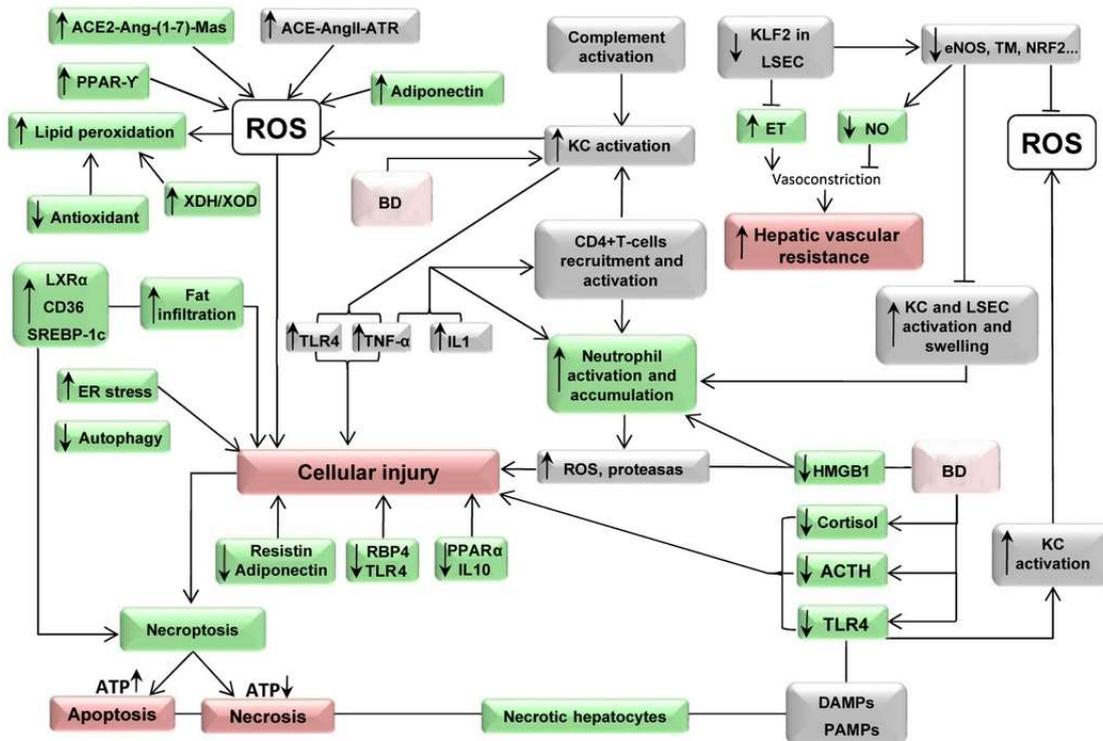


Figura 3. Mecanismos implicados en la lesión por I/R asociada al TH en injertos de hígado no esteatósicos (gris) y esteatósicos (verde). Extraído de (Álvarez-Mercado et al. 2019)

Durante la isquemia, las células hepáticas no reciben oxígeno por lo que los hígados estarían obteniendo la energía a través de vías anaeróbicas causando de esta forma un aumento en los niveles de lactato después de la inducción de la isquemia debido a la activación de la glicólisis anaeróbica (Jimenez-Castro et al. 2011). Es pues un punto a tener en cuenta debido a que los altos niveles de lactato se han relacionado con la disfunción primaria del injerto (Liu et al. 2023). Esto es debido a que se produce una acidosis metabólica que causa una afectación del gradiente de los iones provocando en última instancia edema y daño en los hepatocitos (Cannistrà et al. 2016).

En los hígados, existen otros muchos tipos celulares afectados e involucrados en la lesión por I/R como pueden ser las LSECs (células endoteliales sinusoidales hepáticas) o las KC (Células de Kupffer). Estas al igual que los hepatocitos producen una gran cantidad de ROS (especies reactivas de oxígeno), que estarían causando daño

hepatocitario a través de la peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, disfunción mitocondrial o daño en el ADN (ácido desoxirribonucleico). La producción de estas sustancias llevará a la activación de vías pro-inflamatorias que promoverán la acumulación de neutrófilos exacerbando la inflamación (G. Bardallo et al. 2022). Se ha descrito que la producción de ROS y la posterior peroxidación de lípidos, aumenta la infiltración de neutrófilos y la activación de las CK, contribuyendo aún más a la respuesta inflamatoria hepática (Tang et al. 2022). Los neutrófilos y las CK estarían provocando la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β , que promueven a su vez la activación y acumulación de más neutrófilos a través de la expresión de moléculas como ICAM-1 (molécula de adhesión intracelular 1), VCAM (molécula de adhesión celular vascular) o la P-selectina (Burne et al. 2001; Manandhar et al. 2024; Jiménez-Castro et al. 2013). Cabe destacar también el papel de las plaquetas en la lesión por I/R, que estarían secretando factores TGF- β (Factor de crecimiento transformante β) o el óxido nítrico (NO), que agravarían la lesión de las LSECs (Sindram et al. 2000), promoviendo la disfunción endotelial.

Al contrario de lo que podría parecer, el hecho de que al tejido vuelva a llegar oxígeno de nuevo durante la fase de reperfusión, no provoca una reversión del daño que se da durante la isquemia, sino que lo empeora. Al ser los hepatocitos células tan metabólicamente activas y contener un gran número de mitocondrias, tienen una alta capacidad de producción de ROS, así pues, cuando se restablece el flujo de oxígeno al tejido previamente isquémico, las mitocondrias incrementan la producción de ROS (Caraceni et al. 2005), agravando el daño tisular provocado en la fase de isquemia.

Una de las últimas consecuencias del daño por I/R en la cirugía de TH es el fallo regenerativo. Debido a la inflamación, el estrés oxidativo o los cambios metabólicos entre otros factores, se ve afectada la proliferación de los hepatocitos y del resto de células hepáticas después de la reperfusión (Kuboki et al. 2008; Barone et al. 2005). Todo ello, estaría afectando a los diferentes procesos de muerte celular entre los que encontramos la apoptosis y la necrosis (Lai et al. 2019; Gulfo et al. 2020).

3.1. Lesión por I/R en injertos procedentes de donantes con criterio extendido

En el TH, existen diversos factores que agravan la lesión inducida por I/R como la BD, la esteatosis o el tiempo de isquemia fría. Se ha descrito en diversos estudios que los injertos patológicos procedentes de donantes con BD tienen más susceptibilidad a sufrir un mayor daño durante el proceso quirúrgico. Los últimos datos de la ONT así como diferentes estudios científicos han remarcado la importancia de la presencia de esteatosis en el daño por I/R o el fallo primario del injerto (ONT 2023; Jadhav et al. 2020), o los largos periodos de isquemia fría, que estarían estrechamente relacionados con un mayor daño por I/R (Lozanovski et al. 2020).

Se ha descrito que en los hígados con infiltración grasa, el exceso de ácidos grasos libres en tejido hepático, conlleva un incremento de la actividad β -oxidativa lo que promueve una todavía mayor producción de ROS que lleva a un mayor nivel de estrés oxidativo (Fromenty et al. 2004; Tang et al. 2022; Serviddio et al. 2008). Todo esto conduciría a una disfunción mitocondrial que debido a la disminución en los niveles de ATP puede llevar al fallo primario o disfunción del injerto tras la cirugía hepática (Goikoetxea-Usandizaga et al. 2022; Tang et al. 2022).

Por otra parte, está también reportado en la literatura que tanto en pacientes con esteatosis como en hígados con ALD las CK tienen un papel importante en el desarrollo de la patología y estarían activadas, lo que daría pie a una mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias exacerbando aún más el daño hepático (Slevin et al. 2020; Dong et al. 2024).

Con respecto al proceso de regeneración del tejido, cabe mencionar que en el caso de tratarse de hígados patológicos, por ejemplo, con presencia de esteatosis, este proceso regenerativo necesario después de una cirugía se ve todavía más afectado debido a que la lesión inducida por la I/R afecta negativamente el proceso de regeneración hepática (Hsiao et al. 2010).

Así pues, teniendo en cuenta todo lo anteriormente descrito y especialmente los factores descritos en la Figura 3, son muchos los mecanismos y los diferentes tipos celulares implicados en esta lesión y más todavía en el contexto de los hígados

patológicos. No obstante, hay que dejar constancia que lo reflejado en la correspondiente figura es sólo una mínima parte de la fisiopatología del proceso de I/R hepática, la cual hemos resumido de forma breve en la presente Tesis. De hecho, son numerosas las revisiones (incluidas aquellas publicadas por nuestro grupo) que explican de forma más detallada toda la complejidad del proceso de I/R (Jiménez-Castro et al. 2015; Álvarez-Mercado et al. 2019; Gracia-Sancho et al. 2015). Y si ya es compleja la lesión por I/R, hay que tener en cuenta que los mecanismos implicados pueden ser diferentes dependiendo del tipo de isquemia (caliente o fría), del tipo de hígado y de las diferentes patologías hepáticas o del tiempo de isquemia fría entre otros muchos factores. De ahí que la lesión por I/R continúe siendo un problema sin resolver en la práctica clínica.

4. EJE INTESTINO-HÍGADO

Dada la estrecha relación anatómica y funcional bidireccional entre el tracto gastrointestinal y el hígado vía circulación portal, diversos estudios han reportado un papel importante del intestino en la lesión hepática por I/R (Micó-Carnero et al. 2021). Son muchos los estudios que indican una relación directa entre la disbiosis intestinal y diversas patologías que cursan con problemas hepáticos: cirrosis, ALD, MAFLD etc. (Trebicka et al. 2021; Aron-Wisnewsky et al. 2020; Dukić et al. 2023; Szabo 2015). Por otro lado, su papel en el pronóstico de la cirugía hepática del trasplante sigue sin estar claramente definido.

La microbiota intestinal desempeña un papel crucial en la salud del hígado al metabolizar las sales biliares, neutralizando su toxicidad y transformando los ácidos biliares primarios en secundarios. Los ácidos biliares (BAs) activan receptores nucleares como el receptor farnesoide X (FXR por sus siglas en inglés) y el receptor de membrana acoplado a proteínas G (TGR5) en el íleon. La disbiosis de la microbiota intestinal reduce la síntesis de estos receptores, lo que induce la translocación y el sobrecrecimiento bacteriano, afectando a la permeabilidad intestinal. Esto aumenta los niveles de lipopolisacáridos (LPS), que pueden activar el factor nuclear kappa B (NF-κB) (estrechamente relacionado con la lesión hepática por I/R) a través de los “*toll-like receptors*” (TLR) y los “*nod-like receptors*” (NLR), promoviendo la producción de

citocinas inflamatorias que a través de la circulación portal afectarán a la progresión de las enfermedades hepáticas que cursen con inflamación. Todo este proceso afectará a nivel hepático aumentando el daño en el hígado en el contexto de la lesión por I/R, debido a su vez a desregulaciones en los niveles de FGF15 (Factor de crecimiento fibroblástico 15) y GLP-1 (del inglés “*Glucagón-like peptide-1*”) (Figura 4) (Micó-Carnero et al. 2021).

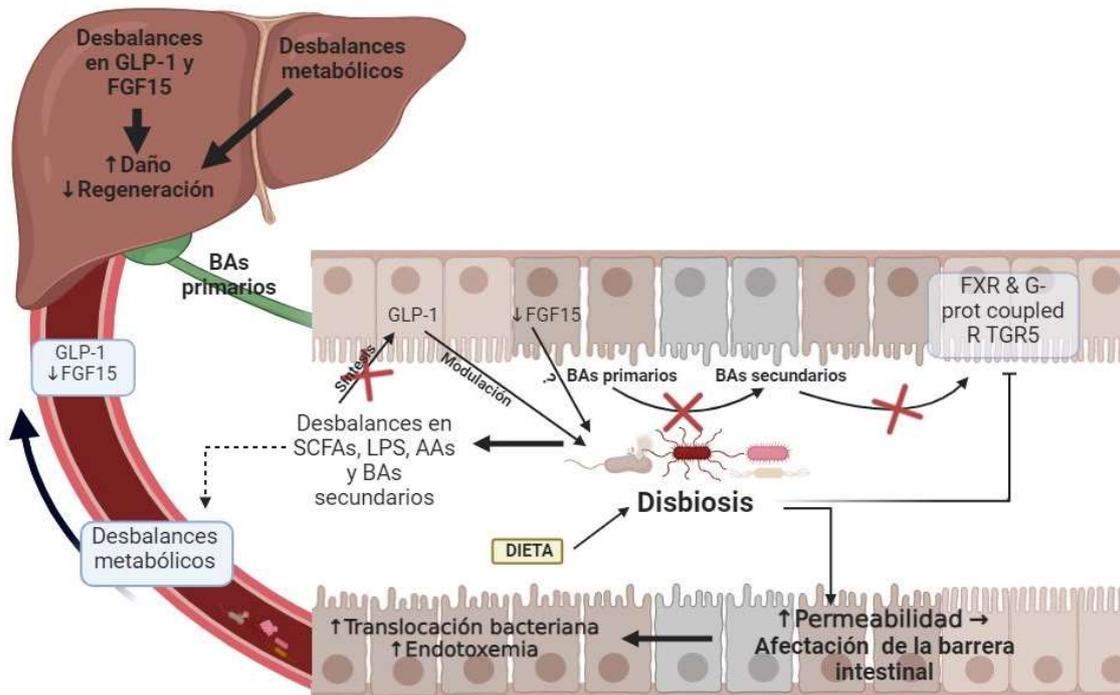


Figura 4. Relevancia del eje intestino hígado. ↑: Aumento; ↓: Disminución; AAs: Aminoácidos; BAs: Ácidos biliares; FXR: Receptor X de farnesoide; FGF15: Factor de crecimiento de fibroblastos 15; GLP-1: Péptido similar al glucagón 1; LPS: Lipopolisacáridos; TGR5: Receptor de Takeda acoplado a proteínas G 5; SCFAs: Ácidos grasos de cadena corta. Extraído y adaptado de (Micó-Carnero et al. 2021).

Cabe destacar también, no solo el papel de la microbiota en la relevancia del eje intestino-hígado en el contexto de la I/R, sino también de otros factores. Recientemente se ha identificado en estudios preclínicos que la activación de FXR a través del FGF15 tiene la capacidad de mejorar los resultados del TH en DBDs en injertos esteatósicos y no esteatósicos. Es bien conocido que la BD induce daño intestinal e induce una reducción de la expresión de FXR, con la consiguiente reducción de FGF15 intestinal que se asocia con niveles reducidos de FGF15 en hígado, lo cual causa a su vez daño hepático y fallo regenerativo (Gulfo et al. 2020). En este estudio se observó que la administración exógena de FGF15 a donantes con BD normalizó los niveles de BAs, protegiendo frente al daño intestinal y hepático inducido por la BD. Por otra parte, en injertos esteatósicos procedentes de DCDs, FGF15 no estaría involucrado en el daño hepático o la capacidad regenerativa, mientras que si tendría un papel relevante evitando el daño por I/R en injertos procedentes de DCDs no esteatósicos (Avalos-de León et al. 2019).

En modelos preclínicos de TH con injertos esteatósicos y no esteatósicos procedentes de DCDs, se ha observado que las alteraciones en los niveles GLP-1 hepático, que deriva del intestino, afectaron a los resultados postoperatorios. Dicho estudio indicó que el tratamiento con GLP-1 exógeno podría resultar beneficioso para evitar el daño por I/R en hígados con esteatosis procedentes de DCDs (Avalos-de León et al. 2019b). Se ha reportado también que GLP-1 puede modular la composición de la microbiota intestinal en individuos obesos y diabéticos (Zhao et al. 2018). Además, se sabe que ciertos ácidos grasos de cadena corta (SCFA) como el propionato inducen la síntesis de GLP-1 (Psichas et al. 2015). Dado que la microbiota metaboliza los SCFAs, que estarían a su vez regulando la síntesis de GLP-1, se espera que una desregulación del microbioma pueda afectar negativamente los SCFAs y, en consecuencia, al GLP-1 y en última instancia al TH.

Como se puede observar, son diversos los factores que pueden desencadenar una respuesta a nivel hepático procedente del intestino, por lo que el estudio de la lesión hepática por I/R en el contexto del TH debe ser estudiado también englobando la relevancia de este eje.

5. PAPEL DE LA NUTRICIÓN EN LA LESIÓN HEPÁTICA POR I/R

Todavía no se ha logrado definir un régimen nutricional óptimo para potenciar la regeneración en el contexto de la cirugía hepática de trasplante. No obstante, se ha observado que ciertos factores dietéticos así como la sobrealimentación y el tipo de dieta son claves para el desarrollo de ciertas enfermedades hepáticas como la esteatohepatitis tanto alcohólica como no alcohólica (Hammad et al. 2015). Como se ha comentado anteriormente, la microbiota intestinal presenta un papel clave en la función del eje intestino-hígado, y está ampliamente reportado que la dieta es un factor modulador de vital importancia del microbioma intestinal (Zmora et al. 2019), teniendo la capacidad de activar el sistema inmunitario innato y la respuesta inflamatoria que puede en última instancia agravar la lesión por I/R y la regeneración tisular (Micó-Carnero et al. 2021).

Diversos estudios han demostrado la capacidad del ayuno para influir en la lesión por I/R en el contexto de las cirugías hepáticas (Cornide-Petronio et al. 2020). Se ha observado que la restricción proteica así como la suplementación de la dieta con vitamina C y E pueden ejercer efectos protectores en modelos preclínicos, pese a que se desconocen los mecanismos subyacentes (Hine et al. 2015). El papel del ayuno en la lesión por I/R no está claramente definido y existen discrepancias en la literatura en relación a su efecto (Cornide-Petronio et al. 2020). Por una parte, estudios recientes indican que el ayuno de 12-24 horas podría ofrecer protección frente a la lesión por I/R, reduciendo la apoptosis y la necrosis. Este ayuno a corto plazo estaría potenciando la sobreexpresión de proteínas antioxidantes y de autofagia debido al aumento del β -hidroxibutirato (BHB). Todo esto a su vez, estaría inhibiendo la actividad del inflammasoma NLRP3 (del inglés "*NLR family pyrin domain containing 3*"), inhibiendo sus potenciales efectos negativos sobre la lesión por I/R (Miyachi et al. 2019). Sin embargo, otros estudios han mostrado resultados contradictorios, sugiriendo que el ayuno puede no proporcionar protección en todos los contextos experimentales (Papegay et al. 2017). Lo mismo ocurre con los efectos del ayuno a largo plazo (2-7 días) sobre la lesión hepática por I/R donde hay discrepancias acerca de su eficacia (Cornide-Petronio et al. 2020). Debido a la importancia del eje intestino-hígado mencionada anteriormente, son muchos los estudios que se centran en el papel de

componentes y suplementos nutricionales en el contexto de la I/R y enfermedades hepáticas. Se han llegado a evidenciar efectos protectores frente a la lesión hepática por I/R, el estrés oxidativo, inflamación o regeneración debido al consumo de suplementos derivados de plantas, aditivos, dietas suplementadas con aceites de pescado, LC-PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga), aminoácidos como la L-glutamina, el omega-3, probióticos o BCAAs (aminoácidos de cadena ramificada) entre muchos otros (Cornide-Petronio et al. 2020).

Se ha observado que una dieta rica en ácidos grasos induce la síntesis de esfingosina-1-fosfato (S1P), que tendría un papel clave en el daño hepático y en la proliferación de los hepatocitos (Zabielski et al. 2010). Es por este motivo que ciertos estudios preclínicos realizados con anterioridad se han centrado en el efecto de las dietas ricas en lípidos (sobretudo ácidos grasos) o glucosa en el contexto de la lesión hepática por I/R en cirugías de PH. Se observó, que mientras que la administración de emulsiones tanto ricas en lípidos como ricas en glucosa ejercían un efecto protector frente a la lesión hepática por I/R después de una PH en hígados no esteatósicos, sólo el tratamiento con lípidos reducía los efectos nocivos de la cirugía hepática en presencia de esteatosis (Mendes-Braz et al. 2014). El desarrollo de nuevas investigaciones dirigidas a investigar si los efectos de dichos componentes nutricionales son los mismos en el contexto del TH serían de interés clínico y científico debido a que algunos aspectos (como por ejemplo la necesidad de regeneración hepática y la presencia de oclusión vascular), se comparten entre ambos tipos de cirugías (PH+I/R y TH).

6. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA REDUCIR LA LESIÓN POR I/R EN EL TH

Son diversas las estrategias que se han intentado aplicar para reducir la lesión por I/R en el contexto de las cirugías de TH. Pese a que algunas de ellas se han aplicado en la práctica clínica (por ejemplo la adición de componentes a las soluciones de preservación o la aplicación del preconditionamiento isquémico), ninguna de ellas ha conseguido revertir o evitar el daño del injerto hepático, e incluso los resultados reportados de tales estrategias pueden ser totalmente opuestos (efectos perjudiciales o beneficios) según multitud de condiciones (tipo de injerto hepático, tiempos de

isquemia fría o tipos de donantes entre multitud de factores) que afectan a la calidad de los injertos hepáticos y los resultados pos-trasplante. A título de ejemplo, como hemos mencionado, algunas estrategias serían la aplicación de la técnica quirúrgica del preconditionamiento isquémico (PI), el desarrollo de nuevas soluciones de preservación de órganos y el uso de fármacos para disminuir o evitar el daño por I/R (Mao et al. 2022). Si nos fijamos en tales técnicas, los resultados son contradictorios porque en la clínica se aplican diferentes tiempos de preconditionamiento, sin saber que este hecho puede llevar a efectos totalmente opuestos. Se sabe además que los efectos nocivos derivados de la BD afectan negativamente a los efectos beneficiosos del preconditionamiento (Mónica B. Jiménez-Castro et al. 2015). Por consiguiente, en la clínica del TH se han de combinar estrategias farmacológicas junto con el preconditionamiento para que tales estrategias farmacológicas eviten los efectos nocivos derivados de la BD y la aplicación del preconditionamiento se ejecute con éxito en la práctica clínica (Mónica B. Jiménez-Castro et al. 2015). De la misma forma, hay multitud de estudios que describen controversias sobre los efectos de la gran cantidad de soluciones de preservación que existen en el mercado, lo cual obviamente se debe a que se están empleando las mismas soluciones de preservación en contextos quirúrgicos totalmente diferentes (Micó-Carnero et al. 2022). Con respecto a los fármacos, hay que destacar que no se pueden aplicar los mismos fármacos en todas las condiciones quirúrgicas porque los mecanismos implicados en la lesión por I/R y fallo en la regeneración son dependientes del tiempo y tipo de isquemia, del tipo de hígado y de los donantes, entre otras muchas causas, y por consiguiente, estrategias farmacológicas pueden tener efectos totalmente opuestos dependiendo de las condiciones quirúrgicas (Avalos-de León et al. 2019; Álvarez-Mercado et al. 2019; Gulfo et al. 2020).

Debido a la relevancia que tiene el tiempo de CI en la viabilidad del injerto, muchas estrategias han ido encaminadas a evitar el daño por I/R mejorando las soluciones de preservación para mantener a los injertos hepáticos en las mejores condiciones durante la isquemia fría antes de su implantación en el receptor. Pese a que algunas han derivado en efectos positivos en condiciones quirúrgicas específicas, ninguna de ellas ha mostrado la capacidad de revertir el daño por I/R que se da en los

injertos hepáticos, sobre todo en los esteatósicos (Micó-Carnero et al. 2022). El desarrollo de este tipo de soluciones se ha centrado especialmente en la adición de sustancias o fármacos con actividad moduladora de las vías de señalización afectadas por la I/R como por ejemplo el estrés oxidativo o los fallos en el metabolismo energético. El desarrollo de nuevas soluciones para preservar el órgano en frío sigue siendo una estrategia en fases de investigación para reducir el daño hepático desde la creación de la solución de la Universidad de Wisconsin (UW) por Belzer en los años 80, debió a los beneficios que tiene reducir la actividad metabólica del órgano por enfriamiento durante las fases de CI. Han entrado también al mercado otras soluciones como pueden ser la solución de Celsior o IGL-1 con diferentes componentes oncóticos, osmóticos o antioxidantes pero ninguna de ellas con una capacidad de inhibición completa del daño por I/R (Micó-Carnero et al. 2022). A continuación, se puede observar una tabla donde se incluyen las diferentes soluciones de preservación utilizadas en la práctica clínica para la preservación en frío de los órganos con los diferentes componentes de las mismas (Tabla 2). Por otro lado, tal y como hemos mencionado anteriormente, existen muchas controversias sobre los beneficios de tales soluciones de preservación ya que diferentes estudios indican que con el uso de soluciones como por ejemplo IGL-1 entre otras se obtienen prácticamente los mismos resultados que si utilizamos la solución de Belzer de los años 80 (Micó-Carnero et al. 2022).

<i>Component/ Function</i>	<i>Cold Storage Solutions (CSS)</i>			
	HTK	UW CSS	Celsior	IGL-1
<i>Osmotic</i>	Manitol/ Ketoglutarate	Raffinose/ Lactobionate	Manitol/ Lactobionate	Raffinose/ Lactobionate
<i>Buffer</i>	Histidine	PO4	Histidine	PO4
<i>Oncotic</i>	-	HES	-	PEG
<i>Na⁺</i>	Low	Low	High	High
<i>K⁺</i>	Low	High	Low	Low
<i>Antioxidant / IRI Protection</i>	Tryptophan	Adenosine/ Gluta- thione/ Allopuri- nol	Glutathione	Adenosine/ Gluta- thione/ Allopuri- nol

Tabla 2. Principales componentes de las soluciones de preservación de órganos en frío llevadas a la clínica. HES: almidón hidroxietílico; HTK: histidina-triptófano-cetoglutarato; IRI: lesión por isquemia/reperfusión; K+: ion intracelular de potasio; Na+: ion extracelular de sodio; PEG: polietilenglicol; PO4: ácido fosfórico; UW: Universidad de Wisconsin (Belzer). Adaptado de (Micó-Carnero et al. 2022).

En los últimos años, han sido diversos los estudios que han pretendido avanzar hacia una nueva generación de soluciones de preservación de órganos en frío con la adición de nuevos componentes con capacidad activa bajo condiciones de isquemia fría e isquemia caliente, como el caso de la adición de factores de crecimiento o fármacos como inhibidores de proteasas, el tacrolimus, la trimetazidina o el carvedilol (Micó-Carnero et al. 2022; Gracia-Sancho et al. 2015) entre muchos otros como se pueden observar de forma más detallada en los estudios previos del grupo ya mencionados anteriormente. Los efectos resultantes del uso de las citadas soluciones de preservación están en fase de estudio.

Son diversas las estrategias farmacológicas que se han intentado usar hasta la fecha para evitar el daño por I/R en injertos con criterio extendido y la respuesta inflamatoria asociada a este tipo de daño (Gracia-Sancho et al. 2015; Mao et al. 2022; Álvarez-Mercado et al. 2019). Hay diversos estudios preclínicos, pero las estrategias llevadas a la práctica clínica son escasas y existen discrepancias en la literatura científica a cerca de su efectividad. Pueden ser diversos los efectos que provocan que

dichas estrategias no sean completamente eficaces en la práctica clínica, des de los efectos nocivos de dichas drogas a nivel sistémico, a la biodistribución del fármaco en el organismo o los diferentes efectos que puede tener un mismo fármaco en hígados de diferentes tipos (esteatósicos vs no esteatósicos) así como los tipos de donantes, tipos de isquemia, entre multitud de factores (Casillas-Ramírez et al. 2006; Carmen Peralta et al. 2013; Carrasco-Chaumel et al. 2005).

Con respecto a las estrategias quirúrgicas empleadas para evitar el daño por I/R encontramos principalmente el PI. Es una estrategia quirúrgica que protege a los tejidos frente a la lesión por I/R, especialmente asociada a las resecciones hepáticas, y consiste en la aplicación de breves periodos de I/R antes de someter al órgano a un proceso de I/R prolongada. A pesar de que se ha reportado beneficiosa en la clínica en casos de resecciones hepáticas de tumores (Teo et al. 2020) existen discrepancias acerca de su efectividad como técnica quirúrgica eficiente en el TH (Qi et al. 2021) ya que existen diferentes factores que no se dan en las cirugías de resecciones (isquemia fría, muerte cerebral etc.) (Mao et al. 2022; Gracia-Sancho et al. 2015) que afectan negativamente los efectos protectores del preconditionamiento, tal y como se ha explicado anteriormente.

Otra vía terapéutica que se ha explorado para evitar el daño por I/R en el contexto del TH ha sido la terapia génica utilizando como vehículos adenovirus, liposomas o PEG entre otros. No obstante existen muchos problemas asociados al uso de este tipo de terapias, como la toxicidad asociada a los vectores, la dificultad de conseguir el mutante adecuado o la correcta expresión del gen deseado (Carmen Peralta et al. 2013; Casillas-Ramírez et al. 2006).

Son varios los estudios que han identificado cambios hormonales durante el proceso de BD. Es por este motivo que se ha intentado llevar a la práctica clínica el tratamiento farmacológico con ciertas hormonas con tal de modular el daño que se da en los órganos procedentes de donantes con BD. Por una parte, se ha intentado modular el daño causado por la I/R con terapia hormonal de T3/T4 (triiodotironina/tiroxina) en el donante, asociándose esta a un incremento de la supervivencia del receptor a 1 y 12 meses post-intervención (Novitzky et al. 2016). No obstante, el papel

positivo de la T3 no está claramente definido ya que existen estudios que niegan su efecto beneficioso en donantes cadavéricos de múltiples órganos con BD (Randell et al. 1993).

Podemos concluir, por consiguiente, que no existe un tratamiento efectivo para evitar el daño por I/R en injertos procedentes de DBDs con y sin esteatosis no alcohólica o ALD. Es de vital importancia profundizar en el descubrimiento de los mecanismos que se ven afectados en estos hígados a causa de los diferentes procesos con tal de que se puedan llevar a la práctica clínica estrategias protectoras que mejoren la calidad de los injertos, los resultados pos-trasplante y permitan la utilización de injertos hepáticos que actualmente son descartados para trasplante por sus condiciones patológicas, reduciendo así la problemáticas de la falta de órganos disponibles. En la práctica clínica, este hecho supondría una solución al problema de las listas de espera para el trasplante ya que permitiría aumentar el número de órganos disponibles en tanto en cuanto se aumentaría la tolerancia de los hígados procedentes de donantes con criterio extendido a la lesión por I/R y fallo en la regeneración hepática.

7. FACTORES DE CRECIMIENTO Y SU PAPEL EN LA LESIÓN HEPÁTICA POR I/R

Como se ha visto anteriormente, los factores de crecimiento pueden tener un papel muy relevante en el desarrollo del daño por I/R. Los factores de crecimiento son proteínas con la principal función de reparar tejidos entre los cuales encontramos el HGF, el TGF- β , el IGF-1, el VEGFA o el VEGFB.

7.1. Factor de crecimiento insulínico (IGF-1)

Los IGFs son un grupo de sustancias polipeptídicas con efectos promotores del crecimiento, y que juegan un papel imprescindible en el desarrollo celular y en múltiples patologías. El IGF-1 en concreto se sintetiza en el hígado y pasa a la circulación hasta llegar a sus tejidos diana. Este factor se ve regulado por acción de la GH, y se conoce que tiene una estrecha relación con el desarrollo de patologías que cursan con inflamación y obesidad (Zhong et al. 2023).

Diversos estudios han establecido importantes relaciones entre el IGF-1 y el desarrollo del MAFLD o el NASH (Kundu et al. 2023; Stanley et al. 2021) a través de diferentes vías que afectan a la resistencia a insulina o la glicólisis entre otras.

Por otra parte, se ha demostrado la capacidad neuroreparadora de dicho factor después de un daño cerebral traumático (Madathil et al. 2015). Así pues, se podría hipotetizar que las vías de señalización moduladas por dicho factor podrían tener un papel relevante en la lesión por I/R en hígados con esteatosis procedentes de donantes con BD.

En el contexto del daño por I/R en el TH, estudios previos del grupo han demostrado beneficios del presente factor de crecimiento tras su utilización como aditivo en la solución de preservación de órganos UW (Universidad de Wisconsin) con injertos esteatósicos y no esteatósicos. Este hecho se asoció a un aumento en la expresión de AKT (Proteína quinasa B), la cual causó una inhibición de GSK3 β (Glicógeno-sintasa quinasa-3 β) en hígados no esteatósicos y una sobreexpresión de PPAR- γ (Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas) en hígados esteatósicos (Zaouali et al. 2010). Ambos mecanismos modulados por IGF-1 se han identificado en otros estudios como potenciales moduladores de la lesión hepática por I/R (H. Zhang et al. 2023; Linares et al. 2018; Casillas-Ramírez et al. 2009).

Teniendo en cuenta estos datos y el papel relevante que puede llegar a tener el IGF-1 en el contexto de la patología estudiada, sería de interés científico profundizar en los mecanismos de regulación de dicho factor de crecimiento en la lesión hepática por I/R.

7.2. Factor de crecimiento vascular-endotelial A y B (VEGFA/B)

La familia de los VEGF está formada por varios factores de crecimiento, entre los cuales encontramos el VEGFA y el VEGFB. Estos factores de crecimiento tienen la capacidad de unirse a los VEGFR (Receptor del factor de crecimiento vascular-endotelial), que son receptores con actividad tirosina quinasa. Por una parte VEGFA tiene afinidad por VEGFR1 y VEGFR2, mientras que VEGFB tiene afinidad por VEGFR1 (Lal et al. 2018). Se conoce que los diferentes miembros de la familia de los VEGF están involucrados en diferentes funciones entre las que incluimos angiogénesis, inhibición

de las vías apoptóticas o modulación de la respuesta inflamatoria (Muniyandi et al. 2023; Ahmad et al. 2022; W. Zhang et al. 2023).

Con respecto al papel de estos factores en el contexto de patologías hepáticas, en relación al VEGFA, se ha descrito recientemente que tendría un papel importante en la evolución de MAFLD hacia HCC (Shen et al. 2022). Destacar, que poco se sabe acerca de una potencial relación entre el consumo de alcohol y el VEGFA, simplemente que se incrementan sus niveles en tejido hepático tras el consumo de alcohol (Ceccanti et al. 2012). Al contrario de lo que ocurre con el VEGFB, tal y como veremos a continuación, existen resultados previos que describen un papel especialmente relevante del VEGFA en la lesión hepática inducida por I/R, indicando que el VEGFA podría estar exacerbando el daño causado cuando los hígados se someten a una cirugía de PH+I/R (Bujaldon et al. 2019).

Por otra parte, en un estudio reciente en un modelo de ratones diabéticos con MAFLD, la inhibición de VEGFB durante períodos prolongados (2 meses) previno el desarrollo de la patología mediante el bloqueo de la lipólisis en el tejido adiposo. Por el contrario, en un modelo preclínico de ratones VEGFB-KO (VEGFB- *knockout*) con obesidad inducida se reportó que VEGFB estaría potenciando el desarrollo de la MAFLD. Al igual que con el VEGFA, se ha observado que el consumo de alcohol en animales de experimentación estaría incrementando los niveles de VEGFB en el parénquima hepático (Costa et al. 2017). Se ha descrito también en dos recientes estudios que el VEGFB podría estar implicado en la lesión por I/R en tejido cardíaco, no obstante no se han reportado estudios sobre el papel de VEGFB en condiciones de daño por I/R hepática (Kivelä et al. 2014; Raissadati et al. 2017).

Hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio que describa un papel relevante del VEGFA o el VEGFB en el contexto del daño por I/R en el TH con hígados esteatósicos o procedentes de donantes con ALD y/o BD.

8. RELEVANCIA DE NRG-1 EN EL TH Y LA LESIÓN HEPÁTICA POR I/R

La neuregulina-1 (NRG1) es un factor neurotrófico que se expresa abundantemente en el sistema nervioso. Es una proteína de 44 kDa de la familia de los EGF (factor de crecimiento epidérmico) y tiene como receptores los EGFR (Receptor de EGF) (Adashek et al. 2024; Werr et al. 2022). Debido a las múltiples isoformas de este factor, se conoce que puede tener diferentes funciones de proliferación y diferenciación glial, neuronal y otras células nerviosas, de expresión de los receptores de acetilcolina, desarrollo tumoral, crecimiento de algunos tipos celulares etc. (Adashek et al. 2024). Se ha reportado en diversos estudios que los niveles de NRG1 se ven alterados en sujetos que padecen patologías relacionadas con el sistema nervioso como esquizofrenia o Parkinson (Wang et al. 2015; Hama et al. 2015), por lo que pese a no haber estudios que lo demuestren, podríamos hipotetizar que la BD podría estar también afectando a sus niveles o función.

Con respecto al papel del NRG1 en el hígado, se ha descrito en diversos estudios que puede ejercer efectos metabólicos importantes a nivel hepático, ya que tendría la capacidad de mejorar la resistencia a insulina en modelos preclínicos al activar ErbB3 (Receptor tirosina proteína quinasa 3) y promover la fosforilación de AKT en los hepatocitos (Meng et al. 2021). Todo esto conduce a la expresión de genes gluconeogénicos y a la producción de glucosa hepática en modelos con y sin obesidad (P. Zhang et al. 2018). Recientemente se ha demostrado también un papel protector de NRG1 en el hígado graso no alcohólico a través de la vía que estaría modulando la resistencia a insulina ErbB3-AKT. Este estudio, estaría demostrando que el papel del NRG1 estaría basado en la reducción en los niveles de TG (triglicéridos) e inhibición de la esteatosis en un modelo *in vitro* de MAFLD (Meng et al. 2021). Se ha descrito también su capacidad protectora *in vitro* frente a factores hepatotóxicos en líneas celulares hepáticas atenuando la respuesta inflamatoria y frente al daño, disminuyendo la apoptosis y modulando el ciclo celular (Dorsey et al. 2006).

Se ha podido observar una regulación de PAK1 (quinasa activada por p21) por parte de NRG1 (Bourguignon et al. 2007). Se conoce que PAK1 se expresa en tejido hepático y que su activación tendría la capacidad de inhibir la muerte celular (Cao et al.

2020) y de proteger en enfermedades que cursen con procesos inflamatorios intestinales (Khare et al. 2015). PAK1 es una quinasa, familia de las serina/treonina-quinasa involucrada en diversas funciones celulares y fisiológicas como la angiogénesis y el crecimiento o la motilidad celular (Hammer et al. 2016; Gonzalez-Villasana et al. 2015).

No solo se han descrito relaciones entre NRG1 y PAK1, sino también entre estos mediadores y algunos factores de crecimiento como VEGFA e IGF-1. En el caso de VEGFA, se ha demostrado que en diferentes tipos celulares tanto PAK1 como NRG1 tendrían capacidad de modularlo (Seo et al. 2017; Bagheri-Yarmand et al. 2000). También se ha descrito la interacción entre NRG1 y el factor IGF-1 en cultivos celulares de cardiomiocitos (Rupert et al. 2017) así como una relación entre PAK1 e IGF1 en cultivos de células endoteliales (Qiao et al. 2004).

Estudios previos han reportado que tanto PAK1 como NRG1 podrían jugar un papel importante en la en la lesión por I/R en el corazón o el cerebro (Garbayo et al. 2016; Huang et al. 2023; Egom et al. 2010; Hu et al. 2024), por lo que su estudio y su potencial en el contexto de la I/R hepática no debe de ser descartado.

Destacar como ya se ha mencionado anteriormente el papel beneficioso del factor VEGFA en el contexto de la cirugía hepática de PH con I/R (Bujaldon et al. 2019). Y por otra, el papel del IGF1 en el contexto también del daño por I/R tanto administrado vía sistémica o añadido como aditivo a las a las soluciones de preservación con la finalidad de proteger a los injertos hepáticos durante la isquemia fría, antes de ser implantados en el receptor (Casillas-Ramírez et al. 2009; Zaouali et al. 2010).

Dadas las relaciones ya conocidas entre NRG-1 y PAK-1 con IGF-1 y VEGFA (Figura 5) y sus respectivos papeles en diferentes patologías hepáticas y en la I/R puede resultar de utilidad e interés clínico el estudio de su relevancia en el contexto de la I/R con hígados grasos procedentes de DBDs.

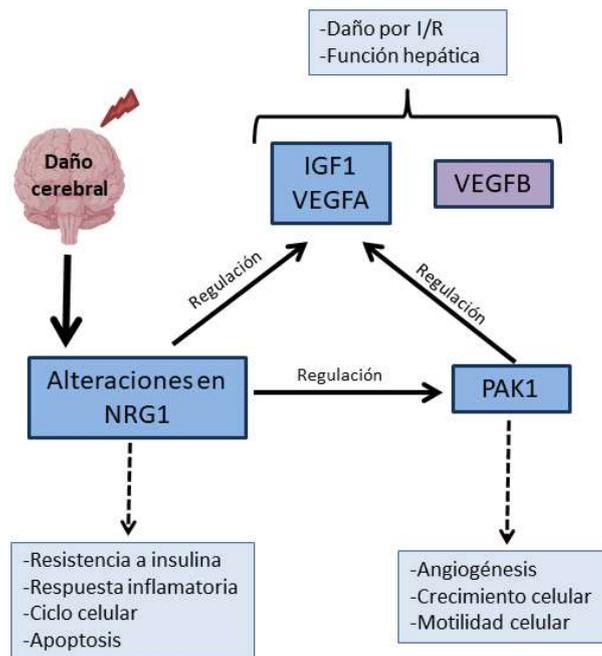


Figura 5. Relación de NRG1 con el daño cerebral y sus potenciales vías de señalización.

9. LA HORMONA DEL CRECIMIENTO EN EL TH Y LA LESIÓN POR I/R

La GH es una proteína de 191 aminoácidos que contiene dos puentes disulfuro en su estructura. Es una hormona secretada por las células somatotrópas, localizadas principalmente en la glándula pituitaria anterior. La síntesis de la GH por la glándula pituitaria ocurre por la estimulación episódica de hormonas hipotalámicas. Por una parte, la GHRH (hormona liberadora de la hormona del crecimiento) estimula su secreción, mientras que la somatostatina (SST) la inhibe. La GH a su vez estaría estimulando la producción de IGF-I y este último a su vez, estaría inhibiendo la secreción de GH a nivel hipotalámico y de la glándula pituitaria. Se conoce también que el péptido intestinal grelina es un potente secretagogo de la GH, que actúa amplificando la secreción hipotalámica de GHRH (Olarescu NC et al. 2019). Pese a que estos son los principales mecanismos reguladores de la GH se han descritos otras vías y factores que podrían estar modulando su síntesis, secreción o acción, como pueden ser los estrógenos, andrógenos (Ocaranza et al. 2021; Fernández-Pérez et al. 2016), el EGF (Álvarez-Mercado et al. 2019), los ácidos grasos libres (FFA) (N. Møller et al. 2009)

o la insulina (Leung et al. 2000) entre muchos otros. Se sabe pues que la GH tiene un complejo mecanismo de regulación, afectado por diversos factores que estarían en última instancia regulando no sólo la GH sino sus funciones y los diferentes mecanismos celulares que se ven modulados por esta.

Son diversos los tejidos que pueden considerarse diana de la GH, y son todos aquellos que expresan su receptor, el GHR (receptor de la hormona del crecimiento). Está ampliamente descrito en la literatura científica que los hepatocitos expresan su receptor (Q. Han et al. 2021), lo que podría explicar el amplio abanico de efectos que la GH podría tener sobre el hígado y su función así como sobre diferentes patologías que cursan con problemas hepáticos. Por una parte, la GH podría regular la lipogénesis a nivel hepatocitario, teniendo un papel destacable en la acumulación de grasa en el hígado y por lo tanto en el desarrollo de patologías como el MAFLD (Takahashi 2017). Debido a que la GH es una reguladora esencial del metabolismo lipídico intrahepático estaría ejerciendo efectos positivos en la acumulación de grasa debida al consumo de alcohol (Qin et al. 2010). Se ha descrito también en algunos estudios que la GH podría estar ejerciendo efectos beneficiosos en pacientes cirróticos (Kumari et al. 2024), aun así sus efectos no se han descrito claramente y existen discrepancias respecto a sus propiedades beneficiosas en el contexto de esta patología (Donaghy et al. 1997; S. Møller et al. 1994). Además de enfermedades hepáticas, la GH según diversos estudios también podría utilizarse como posible terapia en enfermedades cardiovasculares entre otras que cursan con procesos inflamatorios (Boccanegra et al. 2023; Caicedo et al. 2018), ya que tiene un papel importante en el funcionamiento y la modulación del sistema inmunitario (Olarescu NC et al. 2019).

Se sabe también por otra parte que la BD causa bajos niveles de GH debido a disfunciones en el eje hipotalámico-pituitario (Kinoshita et al. 1992) lo que podría estar afectando a las posibles funciones antiinflamatorias de la GH exacerbando incluso efectos nocivos de la BD en los injertos hepáticos.

Todo lo mencionado hace pensar que la GH podría ejercer un papel relevante en procesos de daño por I/R asociado al TH. Un reciente estudio preclínico del grupo realizado en TH procedente de DBDs con y sin esteatosis reportó alteraciones en los

niveles de GH en los injertos esteatósicos así como una exacerbación del daño inducido por la BD y por el proceso de I/R en este tipo de hígados cuando se administró GH (Álvarez-Mercado et al. 2019).

Así pues, se puede observar que los efectos de la GH son muy diferentes dependiendo del tipo de patología del hígado y sus potenciales beneficios no están establecidos, por lo que la propuesta de nuevas investigaciones que permitan identificar los mecanismos subyacentes a la acción y regulación de esta hormona en el contexto de patologías como la esteatosis, la ALD, o la lesión por I/R hepática y en diferentes condiciones quirúrgicas puede resultar de interés científico y clínico.

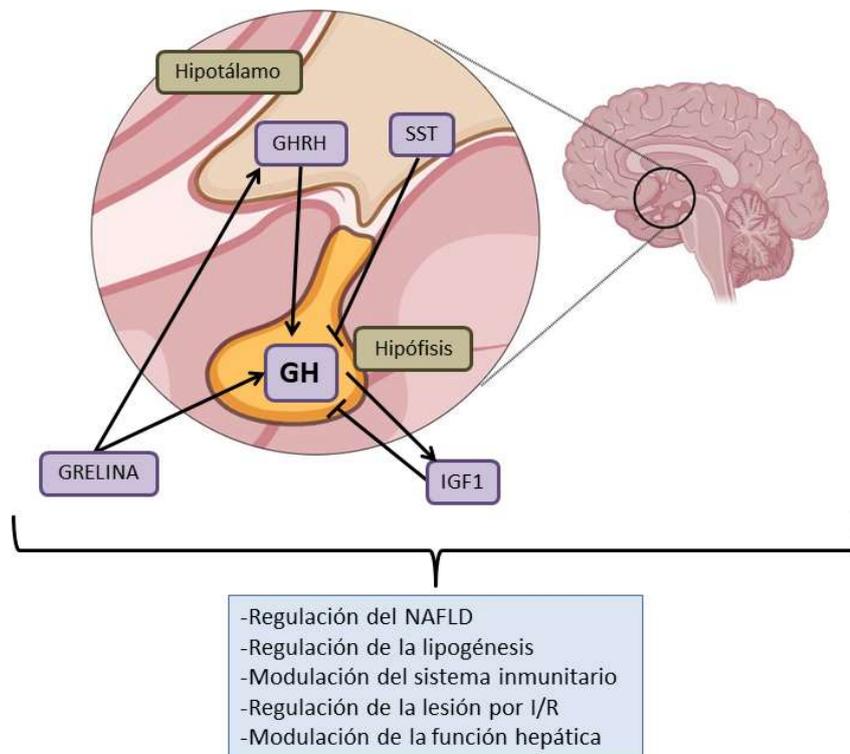


Figura 6. Regulación de la hormona del crecimiento y procesos fisiológicos y patológicos afectados por la misma.

Objetivos

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo siguiente: 1) La BD así como la presencia de esteatosis o ALD en el donante afecta negativamente al éxito de la cirugía de TH y por consiguiente son factores de riesgo que en última instancia afectan a la calidad del injerto a trasplantar y al número de órganos disponibles para trasplante; y 2) la necesidad de resolver este problema de trascendencia científica, social y clínica en el TH; los objetivos de los Estudios 1, 2 y 3 planteados en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

ESTUDIO 1

Considerando los resultados previos del grupo que demuestran los efectos moduladores sobre la lesión por I/R en el contexto de la PH que tiene la dieta basada en glucosa o en la administración de emulsiones lipídicas, las hipótesis de partida se definen a continuación. Tales estrategias podrían ejercer efectos protectores en injertos hepáticos sanos y esteatósicos procedentes de DBDs y el intestino podría contribuir a dichos efectos. Por consiguiente, los objetivos del Estudio 1 son los siguientes:

- Evaluar los posibles beneficios resultantes de estrategias basadas en la administración de glucosa o de emulsiones lipídicas en el contexto del TH con hígados esteatósicos y no esteatósicos procedentes de donantes con BD.
- Evaluar si los posibles efectos beneficiosos de tales estrategias se podrían explicar por posibles mejoras en la inflamación y el daño intestinal, y en caso afirmativo evaluar si éstas son causadas por una disbiosis intestinal.
- Identificar si los efectos de los tipos de nutrición evaluados (llámese administración de glucosa o de emulsiones lipídicas) son dependientes del origen de la obesidad (nutricional o genética).

ESTUDIO 2

Dada la relevancia de la molécula NRG1 en diferentes patologías hepáticas y del sistema nervioso se podría hipotetizar que NRG1 podría tener un papel relevante en el desarrollo del daño por I/R en el TH de DBDs con injertos esteatósicos. Además, no se puede descartar la posibilidad de que el NRG1 pudiera ejercer una función moduladora sobre PAK1 y este a su vez, sobre los factores VEGFA e IGF1, los cuales regulan la lesión por I/R. Teniendo en cuenta tales hipótesis los objetivos del Estudio 2 son los siguientes:

- Evaluar el papel de NRG1 en el TH con hígados esteatósicos y no esteatósicos procedentes de DBDs.
- Investigar si PAK1 está implicada en los potenciales efectos de NRG1 en el daño por I/R en las condiciones experimentales quirúrgicas descritas.
- Evaluar si la vía de señalización NRG1-PAK1 puede regular VEGFA y/o IGF1 en injertos esteatósicos y no esteatósicos sometidos a TH procedentes de DBDs.

ESTUDIO 3

Considerando lo siguiente: a) el papel destacable de la GH en patologías como la esteatosis y las ALD, así como en el daño inducido por I/R en injertos procedentes de DBDs con esteatosis, b) que la GH es capaz de regular factores de crecimiento como el VEGFA, y c) que el intestino es clave en la síntesis de ciertos factores de crecimiento, los objetivos del Estudio 3 son los siguientes:

- Investigar los efectos de los factores GH, VEGFB y VEGFA en injertos hepáticos con ALD sometidos a trasplante y procedentes de DBDs.
- Evaluar si los efectos de la GH se pueden explicar por cambios en los niveles de los factores de crecimiento VEGFA y VEGFB.
- Evaluar la importancia del eje intestino-hígado en los posibles efectos de dichos factores de crecimiento en injertos hepáticos con ALD sometidos a trasplante y procedentes de DBDs.

Material y Métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales fueron mantenidos en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona durante al menos dos semanas antes de realizar la intervención quirúrgica. Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes: temperatura de 21-22°C, humedad relativa del 70% y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

Todos los estudios se llevaron a cabo de acuerdo con las normativas reguladoras de la Unión Europea para modelos de experimentación animal (Directiva 2010/63/UE).

Para la realización de los estudios que forman parte de la presente Tesis Doctoral se utilizaron diferentes modelos experimentales.

1.1. Modelo experimental de esteatosis inducida genéticamente

Se utilizaron ratas macho de la cepa Zucker (Charles River, París, Francia). Las ratas Zucker presentan dos fenotipos diferentes. Por una parte, las ratas heterocigotas (fa/-) de fenotipo delgado (Lean, Ln). Estas ratas poseen receptores cerebrales de leptina y siempre mantienen un fenotipo Ln, debido a que tienen una capacidad normal de saciedad. Por otra parte, encontramos las ratas Zucker homocigotas (fa/fa) de fenotipo obeso (Obese, Ob), que carecen de estos receptores cerebrales de leptina y desarrollan obesidad a partir de las 8 semanas de edad debido al incremento en la ingesta de alimento y a la disminución del gasto energético. Se emplearon:

- Animales homocigotos (Ob) con infiltración severa de grasa hepática macro- y microvesicular (400–450 g, 60–70% de esteatosis).
- Animales heterocigotos (Ln) sin infiltración de grasa en el tejido hepático (350–400 g).

El pienso para las ratas Zucker estaba compuesto por un 66% de polisacáridos (Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, ENVIGO).

1.2. Modelo de esteatosis inducida nutricionalmente

Se utilizaron ratas Wistar macho (200-220 g) (Charles River, París, Francia) alimentadas con una dieta deficiente en colina o una dieta estándar durante 10 días (Mendes-Braz et al. 2014), como modelo experimental de obesidad nutricional. Tras los 10 días de una dieta deficitaria en colina, se observó que al igual que las Zucker Ob las ratas Wistar Ob tenían infiltración severa de grasa hepática macro- y microvesicular (60–70% de esteatosis).

Las ratas Wistar Ln fueron alimentadas con la misma dieta que las Zucker, mientras que las ratas Wistar Ob fueron alimentadas con una dieta deficitaria en Colina compuesta por 5% de polisacáridos (Dyets, Inc. Bethlem, PA, EE.UU.).

Está ampliamente reportado que tanto el modelo de dieta deficitaria en colina como el modelo explicado con anterioridad de esteatosis inducida genéticamente no presentan una inflamación asociada (Selzner et al. 2000; Jiménez-Castro et al. 2012; Mendes-Braz et al. 2014; Koteish and Diehl 2001).

1.3. Modelo de ALD

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley (SD) macho con un peso de 200-250 g. Las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar (Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, ENVIGO). Se indujo ALD de forma *ad libitum* diluyendo etanol (12% v/v) en el agua de la bebida durante 6 semanas para inducir una toxicidad crónica (Nevzorova et al. 2020; Radic et al. 2019). Se evaluó la esteatosis (mediante tinción con Red Oil) y la fibrosis (mediante tinción con Sirius Red y niveles de colágeno-I y α -SMA (alfa-actina del músculo liso)). Se detectó un nivel leve de esteatosis (<30% de esteatosis) y un aumento en los marcadores de fibrosis hepática.

2. MODELO EXPERIMENTAL

2.1. Anestesia

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo los efectos de anestesia inhalatoria de isoflurano (Piramal Critical Care B.V., Voorschoten, Holanda) mediante un vaporizador de uso veterinario (Mckinley Anesthetic Machines, Everest Veterinary Technology, Barcelona, España). En primer lugar, se realizó la inducción anestésica con isoflurano al 4% y un flujo de oxígeno de 2.5-3 L/min. Posteriormente, las ratas se mantuvieron anestesiadas con una concentración de isoflurano al 1.5-2%, bajando el flujo de oxígeno a 1.5-2 L/min. Al inicio de la fase anhepática en el receptor se interrumpió la anestesia y se volvió a reiniciar tras acabar esta fase, manteniéndose con un 0.5-1% de isoflurano hasta finalizar la intervención. Atendiendo al estado anestésico en el que se observó al animal y comprobando parámetros como la respiración o actos reflejos, se pudieron modificar estos parámetros.

2.2. Inducción de la muerte cerebral

Tras la anestesia, lo primero que se realizó fue localizar la tráquea con tal de facilitar la posterior traqueostomía. Posteriormente, en las ratas donantes se realizó una trepanación frontolateral (11mm) y se introdujo un catéter con balón de tipo Fogarty (Fogarty 14G, Baxter HealthCare Corporation, CA, USA) en el espacio extradural con la punta en dirección caudal. La BD se indujo por el incremento de la presión intracraneal al inflar el balón durante 1 minuto, lo cual indujo una rápida lesión cerebral que condujo inmediatamente a la BD, simulando una condición comparable a un trauma cerebral agudo aislado en el humano. Una vez confirmada la BD mediante la ausencia del reflejo corneal y mediante el test de apnea, las ratas se mantuvieron con respiración asistida hasta comenzar la cirugía del donante. Con tal de mantener a la rata en un proceso de respiración asistida, se sometió a los donantes a una traqueotomía y se les conectó a un ventilador mecánico para roedores (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) con una frecuencia respiratoria de 60/min y una mezcla de óxido nitroso y oxígeno durante los 30 primeros minutos. Posteriormente se cambió a una ventilación con oxígeno al 30% hasta el final del procedimiento (Hoeven et al. 2000; Hoeven et al. 2001). Tras la BD se produce un marcado aumento de la

presión sanguínea seguido de una reducción de la misma, al igual que se observa con la frecuencia cardíaca. La normotensión (presión arterial media superior a 80mm Hg) se mantuvo mediante la infusión salina al 0.9%, hidroxietilalmidón al 5% y norepinefrina a una concentración de 0.01 mg/ml por vía vena pénica con un flujo máximo de 0.5 mL/min, iniciando este proceso 15 minutos después de la inducción de la BD (Hoeven et al. 2001). Durante la BD se monitorizó y mantuvo la temperatura corporal durante un periodo de 3-6 horas dependiendo del estudio antes de extraer a los injertos hepáticos de los donantes, con la finalidad de mimetizar las condiciones que se dan en la práctica clínica. Durante este periodo es cuando se dan las alteraciones fisiopatológicas propias de la BD que afectan de forma negativa al injerto que se va a someter a un periodo de isquemia fría seguido de su implante en el receptor (Hoeven et al. 2001) (Figura 7).

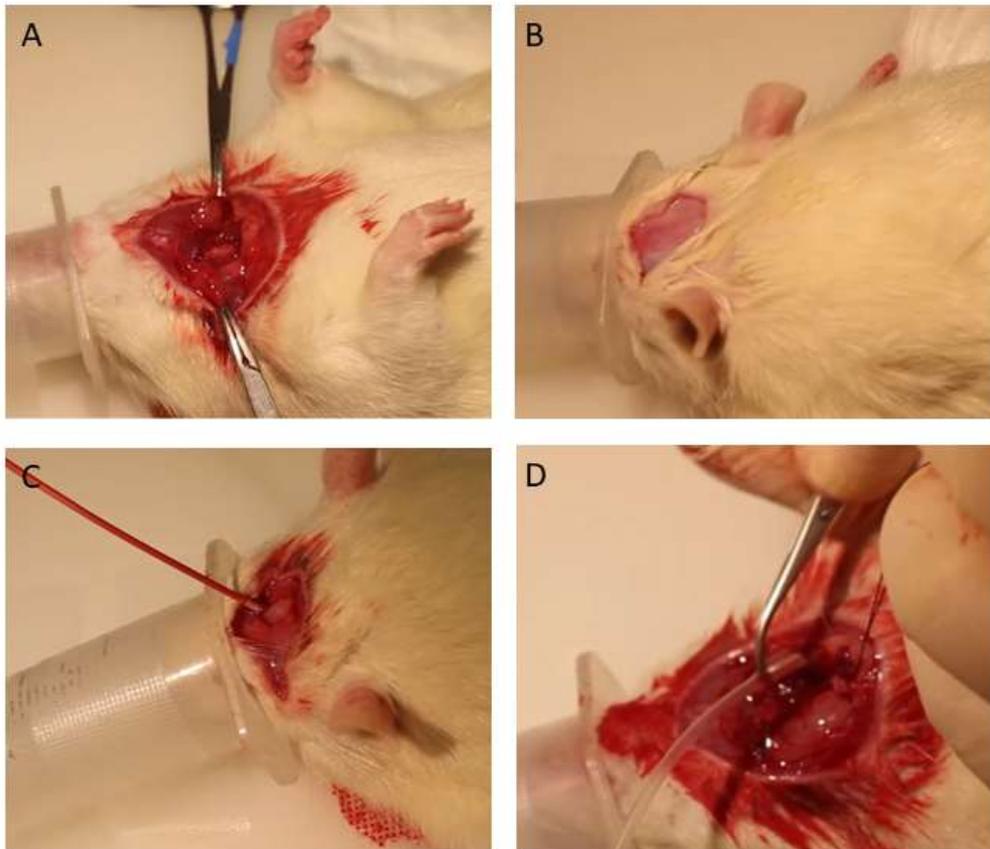


Figura 7. Inducción de la muerte cerebral. A) Localización de la traquea. B) Realización de la trepanación frontotemporal. C) Introducción de un catéter con balón de tipo Fogarty en el espacio extradural en posición caudal con tal de incrementar la presión intracraneal. D) Traqueostomía con el objetivo de iniciar la ventilación mecánica.

2.3. Trasplante hepático ortotópico

El trasplante ortotópico de hígado se realizó según la técnica del doble "cuff" descrita por Kamada sin reconstrucción de la arteria hepática. La técnica quirúrgica consta de 3 fases: cirugía del donante, cirugía del banco y cirugía del receptor (Kamada et al. 1979).

2.3.1. Cirugía del donante

Una vez anestesiada la rata con isoflurano, bajo el efecto de la anestesia inhalatoria, se realizó una laparotomía transversal a 1 cm por debajo del apéndice xifoides y se expuso el hígado. Previamente se rasuró el abdomen de la rata y se colocó en posición decubito supino limpiando el campo quirúrgico con povidona iodada. A continuación, se seccionaron los ligamentos hepáticos y se liberó la vena cava inferior. Posteriormente, se diseccionó el pedículo renal derecho y se ligó la arteria y la vena renal derecha, así como también las venas suprarrenal y lumbar derechas. En el hilio hepático se separó la vena porta de la arteria hepática y del conducto biliar común. Se ligaron las ramas esplénica y pilórica de la vena porta y se canuló el conducto biliar que se fijó con una doble ligadura de seda 6/0 (Suturas Aragón, Barcelona, España). Seguidamente se liberó y ligó la vena diafragmática derecha y se separó la arteria aorta de la vena cava inferior. Una vez preparado el órgano para su extracción se canuló la aorta y se comenzó el proceso de perfusión del injerto. Se ocluyó la aorta torácica, abriendo previamente el diafragma, se seccionó la vena cava inferior suprahepática por encima del diafragma y se comenzó la perfusión del injerto con solución UW a 4°C (Figura 8). Una vez perfundido el hígado, se procedió a su extracción del donante y se colocó en un baño con solución UW a 4°C durante 4-24 horas dependiendo del estudio.



Figura 8. Cirugía del donante. A) Ligadura de la vena renal derecha y las venas suprarrenal y lumbar derechas . B) Canulación del conducto biliar. C) Canulación de la aorta e inicio del proceso de perfusión.

2.3.2. Cirugía del banco

Se realizó con el fin de preparar el injerto para el implante en el animal receptor (Figura 9). Se preparó la vena cava suprahepática para su posterior anastomosis en el receptor. Para realizar las anastomosis de las venas porta y vena cava inferior infrahepática se colocaron en ambas venas unos *cuffs* (estructuras tubulares de polietileno) (Kamada et al. 1979) que evitaron realizar la anastomosis mediante sutura continua y disminuyeron, por lo tanto, la duración de la intervención. Estas estructuras permitieron que en el momento de implantar el injerto en el receptor se pudiese introducir cada *cuff* dentro de la vena porta y la cava inferior infrahepática.

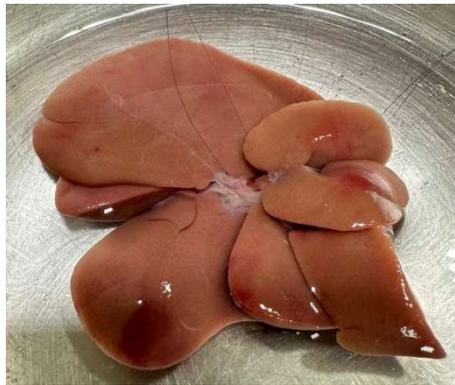


Figura 9. Cirugía del banco. Inicio de la preparación del injerto aislado con tal de posteriormente implantarlo en el receptor.

2.3.3. Cirugía del receptor

A todos los animales receptores se les administró 0.05 mg/kg de Buprenorfina 30 minutos antes de la cirugía y a las 12 horas posteriores. Una vez anestesiada la rata con isoflurano (tal y como se describió anteriormente), se realizó la laparatomía y la disección del hígado de igual forma que la cirugía realizada en el donante. En el hilio hepático se seccionó el conducto biliar. Posteriormente se ocluyó mediante la utilización de *clamps* microvasculares, la vena porta en su confluencia con la vena esplénica y la vena cava inferior infrahepática justo por encima de la vena renal derecha. También se ocluyó la vena cava inferior suprahepática con una pinza *Satinsky*.

Tras estos procedimientos, se dió inicio a la fase anhepática. La hepatectomía del receptor se completó al seccionar las venas porta y cava inferior supra e infrahepáticas en la parte más proximal al órgano del receptor. El implante del injerto comenzó con la sutura continua de la vena cava inferior suprahepática del donante con la del receptor (Figura 10). Previamente se perfundió el hígado a trasplantar con la solución de Lactato de Ringer Hartmann (B. Braun Medical, Barcelona, España) con tal de eliminar el exceso de potasio de la solución de preservación UW. La siguiente anastomosis que se realizó fue la de la vena porta, introduciendo el *cuff* colocado en la vena porta del injerto donante durante la cirugía del banco dentro de la vena porta del receptor (Figura 10). Tras estas dos primeras anastomosis se procedió a la reperfusión del injerto, liberando el *clamp* microvascular que ocluía la vena porta e inmediatamente después liberando la pinza *Satinsky* que estaba ocluyendo la vena cava inferior suprahepática. A continuación, se realizó la anastomosis de la vena cava inferior infrahepática y se liberó el *clamp* microvascular que ocluía la vena, reconstituyendo de esta forma el flujo sanguíneo. Posteriormente se realizó la anastomosis del conducto biliar. Por último se cerró el plano muscular y la piel abdominal con sutura continua. Para terminar la intervención se cerró el plano muscular y después la piel, ambos con una sutura continua (Suturas Aragón, Barcelona, España).

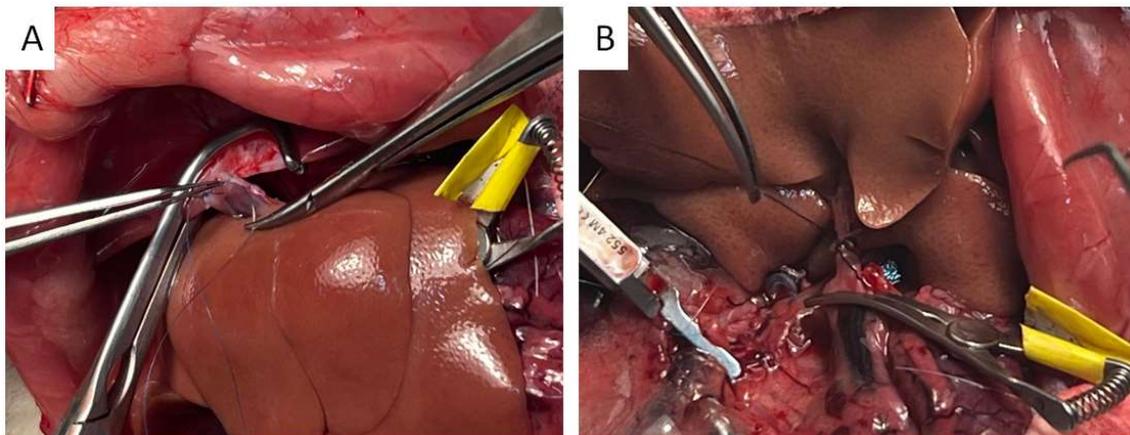


Figura 10. Cirugía del recetor. A) Sutura de la vena cava suprahepática. B) Anastomosis con la técnica del *cuff*.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1. Diseño experimental del estudio 1

“Papel del tratamiento nutricional en el daño hepático e intestinal en el trasplante con injertos hepáticos esteatósicos y no esteatósicos procedentes de donantes con muerte cerebral”

Grupo 1. Sham (n = 12, 6 Ln y 6 Ob). Las ratas Zucker Ob y Ln fueron anestesiadas, ventiladas y mantenidas en normotensión durante 6 horas.

Grupo 2. TH (n = 24, 12 trasplantes: 6 con injertos no esteatósicos y 6 con injertos esteatósicos). Las ratas Zucker Ob y Ln fueron anestesiadas, ventiladas y mantenidas en normotensión durante 6 horas. Posteriormente, los hígados fueron lavados con solución UW, aislados, preservados en solución UW a 4°C durante 4 horas e implantados en ratas Zucker Ln.

Grupo 3. BD + TH (n = 24, 12 trasplantes: 6 con injertos no esteatósicos y 6 con injertos esteatósicos). Las ratas Zucker Ob y Ln fueron anestesiadas y ventiladas. Se les indujo la BD de la forma detallada en las secciones anteriores. Posteriormente, las ratas se mantuvieron en normotensión durante 6 horas. Por último, los hígados se lavaron con solución UW, aislados, preservados en solución UW a 4°C durante 4 horas e implantados en ratas Zucker Ln.

Grupo 4. BD + TH + Glucosa (n = 24, 12 trasplantes: 6 con injertos no esteatósicos y 6 con injertos esteatósicos). Igual que el grupo 3, excepto que en los receptores se administró intravenosamente 5 mL de una solución de glucosa (28%, contenido energético 4.6 MJ/1000 mL, Sigma Aldrich, España) durante 4 horas e inmediatamente después de la implantación del injerto hepático en el receptor

Grupo 5. BD + TH + Lípidos (n = 24, 12 trasplantes: 6 con injertos no esteatósicos y 6 con injertos esteatósicos). Igual que el grupo 3, excepto que en los receptores se administró intravenosamente 5 mL de una solución lipídica (10% Intralipid; 4.6

MJ/1000 mL, Fresenius Kabi, Barcelona, España) durante 4 horas e inmediatamente después de la implantación del injerto hepático en el receptor. La emulsión estaba compuesta de 52% ácido linoleico, 22% ácido oleico, 13% ácido palmítico, 8% ácido linolénico, 4% ácido esteárico, 1% otros ácidos grasos, 8.184 g/L fosfolípidos de huevo y 15 g/L glicerina.

Para evaluar los efectos de la administración de lípidos y glucosa en el daño hepático e intestinal en TH procedentes de DBDs en el modelo experimental de obesidad nutricional, realizamos los mismos procedimientos quirúrgicos bajo las mismas condiciones que las descritas para los grupos 1-5, pero utilizando ratas Wistar alimentadas con una dieta deficitaria en colina (ratas Ob Wistar) en lugar de ratas Ob Zucker, y ratas Wistar alimentadas con una dieta estándar (ratas Ln Wistar) en lugar de ratas Ln Zucker.

Se recogieron muestras a las 4 horas después del TH. Las condiciones de este estudio fueron seleccionadas en base a estudios previos reportados anteriormente por diferentes autores y estudios preliminares realizados por nuestro grupo (Holecek et al. 1988; Goetze et al. 2007; Álvarez-Mercado et al. 2019). Un período de CI de 4 horas es lo suficientemente prolongado para inducir daño hepático después del TH en injertos hepáticos y permitir una alta tasa de supervivencia a las 4 horas después del TH, condición necesaria para evaluar los mecanismos fisiopatológicos responsables de la lesión inducida por I/R asociada al TH y posibles dianas de acción terapéutica

3.2. Diseño experimental del estudio 2

“El papel de la neuregulina-1 en el trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos procedentes de donantes con muerte cerebral”

Grupo 1. TH (n = 24 ratas): En el subgrupo **1.1** (n = 12 ratas, 6 trasplantes con injertos esteatósicos, 6 ratas donantes Ob Zucker y 6 ratas receptoras Ln Zucker), las ratas Ob Zucker fueron anestesiadas, ventiladas y mantenidas en normotensión durante 6 horas. Los hígados fueron posteriormente lavados con solución de UW, aislados, preservados en solución UW a 4°C durante 4 horas e implantados en ratas Ln Zucker. En el subgrupo **1.2** (n = 12 ratas, 6 trasplantes con injertos no esteatósicos, 6 ratas donantes Ln y 6 ratas receptoras Ln), se repitió el mismo procedimiento quirúrgico, pero con ratas Ln Zucker como donantes y receptoras.

Grupo 2. BD + TH (n = 24 ratas): En el subgrupo **2.1** (n = 12 ratas, 6 trasplantes con injertos esteatósicos, 6 ratas donantes Ob Zucker y 6 ratas receptoras Ln Zucker), las ratas Ob Zucker fueron anestesiadas y ventiladas. Se les indujo la BD de la forma detallada en las secciones anteriores. Las ratas se mantuvieron en normotensión durante 6 horas. Posteriormente, los hígados fueron lavados con solución UW, aislados, preservados en solución UW a 4°C durante 4 horas e implantados en ratas Ln Zucker. En el subgrupo **2.2** (n = 12 ratas, 6 trasplantes con injertos no esteatósicos, 6 ratas donantes Ln y 6 ratas receptoras Ln), se repitió el mismo procedimiento quirúrgico de BD y TH, pero con ratas Ln Zucker como donantes y receptoras.

Grupo 3. BD + anti-NRG1 + TH (n = 24 ratas): Igual que en el grupo 2, pero con la administración de un anticuerpo frente a NRG1 (10 mg/kg, i.v.) (Dominguez et al. 2018; Petrinovic et al. 2010) inmediatamente después de la inducción de la BD.

Grupo 4. BD + inhibidor de PAK1 + TH (n = 24 ratas): Igual que en el grupo 2, pero con la administración de un inhibidor altamente específico de PAK1 (IPA-3 (4 mg/kg, i.v.) (Jagadeeshan et al. 2016)) inmediatamente después de la inducción de la BD.

Grupo 5. BD + anti-NRG1 + IGF1 + TH (n = 24 ratas): Igual que en el grupo 2, pero con la administración de un anticuerpo frente a NRG1 (10 mg/kg, i.v.) (Dominguez et al. 2018;

Petrinovic et al. 2010) y con IGF1 (400 µg/kg i.v.) (Casillas-Ramírez et al. 2009), inmediatamente después de la inducción de la BD.

Grupo 6. BD + inhibidor de PAK1 + IGF1 + TH (n = 12 ratas): Igual que en el subgrupo 2.1 pero con la administración de un inhibidor altamente específico de PAK1 (IPA-3 (4 mg/kg, i.v.) (Jagadeeshan et al. 2016)) y con IGF1 (400 µg/kg i.v.) (Casillas-Ramírez et al. 2009), inmediatamente después de la inducción de la BD.

Grupo 7. BD + anti-NRG1 + VEGFA + TH (n = 24 ratas): Igual que en el grupo 2, pero con la administración de un anticuerpo frente a NRG1 (10 mg/kg, i.v.) y con VEGFA (10 µg/kg, i.v.) (Bockhorn et al. 2007; Gu et al. 2013), inmediatamente después de la inducción de la BD.

Grupo 8. BD + inhibidor de PAK1 + VEGFA + TH (n = 12 ratas): Igual que en el subgrupo 2.2 pero con la administración de un inhibidor altamente específico de PAK1 (IPA-3 (4 mg/kg, i.v.) (Jagadeeshan et al. 2016)) y con VEGFA (10 µg/kg, i.v.) (Bockhorn et al. 2007; Gu et al. 2013), inmediatamente después de la inducción de la BD.

Grupo 9. BD + NRG1 + LT. Este grupo se divide en dos subgrupos. Subgrupo **9.1** BD + NRG1(a) + TH (n = 24 ratas): Igual que en el grupo 2 pero tratadas con NRG1 a una dosis de 200 µg/kg, i.v. (Ennequin et al. 2015) inmediatamente después de la inducción de la BD. Subgrupo **9.2** BD + NRG1(b) + TH (n = 24 ratas): Igual que en el grupo 2 pero tratadas con NRG1 a una dosis de 400 µg/kg, i.v. (Ennequin et al. 2015) inmediatamente después de la inducción de la BD.

Se recogieron muestras 4 horas después del TH. Las condiciones del estudio, incluidas las dosis y los tiempos de pre-tratamiento utilizados para los diferentes fármacos, se seleccionaron en base a los estudios previos mencionados anteriormente y estudios preliminares de nuestro grupo. Un período de CI de 4 horas es lo suficientemente prolongado para inducir daño hepático después del TH en injertos hepáticos y permite una alta tasa de supervivencia a las 4 horas después de LT. Así, las condiciones experimentales utilizadas en este estudio fueron las más apropiadas para evaluar el efecto de NRG1 en la lesión y proliferación celular, así como las vías de

señalización de NRG1 en TH de injertos esteatóxicos y no esteatóxicos procedentes de DBDs.

Para investigar el origen de NRG1, se realizaron los siguientes grupos experimentales y se recogieron muestras tras la realización de los siguientes procedimientos:

Grupo 10. Sham (n = 12 ratas, 6 Ob y 6 Ln Zucker): Los animales fueron sometidos sólo a anestesia y laparotomía.

Grupo 11. Pre-TH (n = 12 ratas, 6 Ob y 6 Ln Zucker): Los animales fueron anestesiados, y los hígados se lavaron con la solución de UW, aislados y mantenidos en CI en la solución UW a 4°C durante 4 horas.

Grupo 12. BD (n = 12 ratas, 6 Ob y 6 Ln Zucker): Los animales fueron sometidos a anestesia y ventilación mecánica. Después de la inducción de la BD, las ratas se mantuvieron en normotensión durante 6 horas. En este grupo experimental, las muestras se recogieron a los 10 minutos, 1, 2 y 6 horas después de la inducción de BD.

Grupo 13. BD + CI (n = 12 ratas, 6 Ob y 6 Ln Zucker): Los animales se mantuvieron en anestesia y ventilación mecánica. Después de la inducción de la BD, las ratas se mantuvieron en normotensión durante 6 horas. Luego, los hígados se lavaron con la solución de UW, se aislaron y se mantuvieron en CI en la solución UW durante 4 horas.

Para evaluar los efectos de NRG1 en el TH procedente de DBDs en el modelo experimental de obesidad inducida nutricionalmente, realizamos los mismos procedimientos quirúrgicos en las mismas condiciones que los descritos para los grupos 1-9, pero utilizando ratas Wistar alimentadas con una dieta deficiente en colina (ratas Ob Wistar) en lugar de ratas Ob Zucker, y ratas Wistar alimentadas con la dieta estándar (ratas Ln Wistar) en lugar de ratas Ln Zucker. Al igual que para el resto de grupos, se recogieron muestras 4 horas después del TH.

3.3. Diseño experimental del estudio 3

“Relevancia del eje GH-VEGFB/VEGFA en injertos hepáticos procedentes de donantes con muerte cerebral con enfermedad hepática relacionada con el consumo de alcohol”

Grupo 1. Cont. 1 (n=6): Ratas con ALD.

Grupo 2. BD (n=6): Se les indujo laBD de la forma detallada en las secciones anteriores. Las ratas se mantuvieron normotensas durante 6 horas.

Grupo 3. BD + GH (n=6): Igual que el grupo 2, pero se administró GH recombinante (100-40, Thermo Fisher Scientific de Waltham, Massachusetts, USA) vía intravenosa justo después de BD (0.1 mg/kg).

Grupo 4. BD + VEGFB (n=6): Igual que el grupo 2, pero se administró VEGFB recombinante (100-20B-100UG, Thermo Fisher Scientific de Waltham, Massachusetts, USA) vía intravenosa justo después de BD (5 µg/kg).

Grupo 5. BD + VEGFA (n=6): Igual que el grupo 2, pero se administró VEGFA recombinante (100-20-100UG, Thermo Fisher Scientific de Waltham, Massachusetts, USA) vía intravenosa justo después de BD (5 µg/kg).

Grupo 6. BD + GH + Anti-VEGFR1 (n=6): Igual que el grupo 3, pero se administró un anticuerpo contra VEGFR1 (BS-0170R-100UL, Bioss Inc., de Woburn, Massachusetts, USA) vía intravenosa justo después de BD (10 mg/kg).

Grupo 7. ALD + BD + GH + Anti-VEGFR1 + Anti-VEGFR2 (n=6): Igual que el grupo 6, pero se administró un antagonista contra VEGFR2 (orb61120, Biorbyt de Cambridge, UK) vía intravenosa (2.5 mg/kg)

Se recolectaron muestras de tejido y plasma 3 horas después de la inducción de BD y se congelaron inmediatamente a -80°C. Las muestras de hígado se fijaron en una solución de formaldehído tamponado al 4% durante la noche a 4°C y en OCT para realizar determinaciones histológicas e inmunohistoquímicas pertinentes.

Todas las dosis de los diferentes compuestos administrados en este estudio se determinaron en base a estudios previos y datos preliminares obtenidos por nuestro grupo.

4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

4.1. Transaminasas

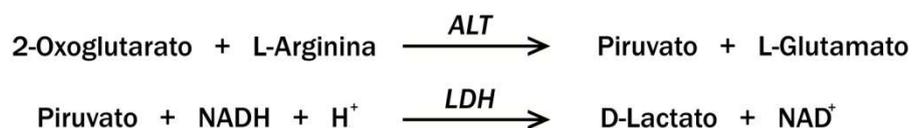
Las transaminasas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) son enzimas citoplasmáticas que encontramos en abundancia en las células hepáticas con una función de metabolismo de los aminoácidos, las cuales realizan la conversión de un aminoácido en un ácido carboxílico. En condiciones normales, estas enzimas se encuentran en el citoplasma, pero en el contexto de una lesión hepática estas enzimas que se encuentran en el citoplasma son liberadas a la circulación. De este modo, la determinación de los niveles de estas enzimas resulta útil como parámetro de la lesión hepática midiendo los niveles en plasma.

Su actividad enzimática se determinó mediante un kit comercial (Gernon, Sant Joan Despí, España) basado en un ensayo enzimático que mide la conversión de la nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida (NADH) mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 365 nm atendiendo a las siguientes reacciones bioquímicas:

Para la AST:



Para la ALT:



Dónde el NAD⁺ corresponde a la nicotinamida adenina dinucleótido oxidada.

Su actividad enzimática se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Gernon, Sant Joan Despí, España).

4.2. Ensayo de malondialdehído

El malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica y se utilizó como parámetro indirecto para determinar los niveles de estrés oxidativo. Los niveles de MDA se determinaron en muestras de tejido mediante el método del ácido tiobarbitúrico (TBA). Para esto, se homogeneizaron muestras de tejido congelado en 2 ml de tampón Tris a pH 7. Para la precipitación de proteínas, se añadieron 0.25 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 40% a 0.25 ml del homogeneizado. Después de mezclar y centrifugar a 3,000 g durante 15 minutos a 4°C, se añadieron 0.25 ml de solución de TBA al 0.67% al sobrenadante, y esta mezcla se hirvió durante 15 minutos ya que en condiciones ácidas y a altas temperaturas el MDA reacciona con el TBA para formar el complejo MDA-TBA, cuantificable por espectrofotometría. Seguidamente, se realizó la lectura de la densidad óptica a 530 nm (Casillas-Ramírez et al. 2023).

Para la elaboración de la recta patrón, se preparó un estándar de MDA disolviendo 120 µl de 1,1,3,3-tetrahidroxipropano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en 50ml de HCl 0.1M. Esta solución se calentó durante una hora a 50°C y se mantuvo a 4°C durante 24 horas. Los estándares y el blanco fueron sometidos al mismo procedimiento que las muestras a partir del tratamiento con TCA, hasta que se realizaron las lecturas pertinentes a 530 nm.

4.3. Actividad de la mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima presente en los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos, y se emplea como indicador de la infiltración y actividad neutrofílica en el tejido hepático inflamado. Esta enzima cataliza la producción de ácido hipocloroso a partir del peróxido de hidrógeno.

Se determinaron los niveles tisulares de mieloperoxidasa (MPO) mediante fotometría utilizando un sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Con tal fin, se homogeneizaron los tejidos en tampón fosfato (0.05 M KH_2PO_4 , pH 6) con 0.5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTBA). Posteriormente se sonicaron durante 30 segundos al 20% de potencia. Después de pasar por tres ciclos de congelación/descongelación en hielo seco, las muestras se incubaron durante 2 horas

a 60°C para eliminar la actividad de las peroxidasas no específicas e inhibidores de MPO que pudieran afectar tal determinación. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron durante 12 minutos a 4,000 g a 4°C, y posteriormente se recuperó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 10 µl de reactivo de TMB disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (5 mg/ml) a 10 µl del sobrenadante. A tiempo cero (t:0), se añadieron 70 µl de tampón fosfato (8 mM KH₂PO₄, pH 5.4) con 0.05% de H₂O₂, y se determinaron las actividades enzimáticas de MPO, mediante la lectura de la absorbancia durante 10 minutos a una longitud de onda de 630 nm (Casillas-Ramírez et al. 2023).

4.4. Proteínas totales

La concentración de proteínas totales en tejido se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford, utilizando un reactivo comercial de BioRad (Richmon, CA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Este ensayo se basa en la reacción de las proteínas totales presentes en la muestra a analizar con una solución ácida del colorante azul de Coomassie. La concentración de proteínas es directamente proporcional a la absorbancia medida a una longitud de onda de 595 nm. Se utilizó una solución de albúmina de suero bovino (BSA) como curva estándar.

4.5. Ensayos inmunoenzimáticos y colorimétricos

4.5.1. Ensayos de marcadores inflamatorios

Las muestras de tejido fueron homogeneizadas en una solución tampón fosfato salino (PBS) 1X, pH 7 durante 60 segundos, utilizando un homogeneizador denominado Polytron. Posteriormente, se centrifugaron a 5000 g a una temperatura de 4°C durante 15 minutos. Se recogió el sobrenadante, se determinó la concentración de proteínas según el procedimiento descrito en la sección anterior, y se almacenaron las muestras a -80°C para las determinaciones correspondientes.

Para evaluar la respuesta inflamatoria en los diferentes estudios se evaluaron los niveles de diversos marcadores pro y antiinflamatorios mediante kits ELISA (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas). En esta técnica, los pocillos de la placa están recubiertos con anticuerpos específicos para el marcador que se desea cuantificar. Se

añaden las muestras o los estándares a los pocillos, por lo que de esta forma los antígenos se unen al anticuerpo específico. Posteriormente, se agrega una solución de anticuerpo biotinilado específico el cual se unirá a la proteína de la muestra ya unido al anticuerpo inmovilizado en el pocillo, formando un "sándwich". Seguidamente, se añade el conjugado avidina-HRP (peroxidasa de rábano), que se une al anticuerpo biotinilado mediante la interacción avidina-biotina, y se incorpora la solución sustrato, que dará una coloración azul directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Para detener la reacción, se usa una solución de parada que produce una coloración amarilla y permite leer espectrofotométricamente la densidad óptica a 450 nm.

Por una parte, se evaluaron según el objetivo de estudio los niveles de IL-1 β e IL-10 en tejido. Se utilizaron kits ELISA (E-EL-R0016 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EE.UU. para la IL-10 y ab100768 de Abcam, Cambridge, UK para la IL-1 β), los cuales se realizaron según las instrucciones del fabricante. Como ya se ha descrito en secciones anteriores, la IL-1 β es una citoquina altamente pro-inflamatoria e IL-10 una IL con capacidades anti-inflamatorias.

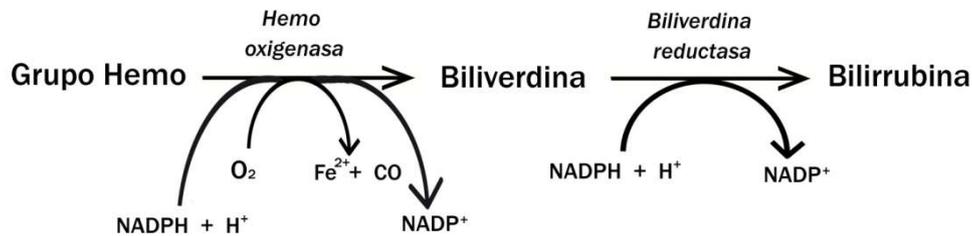
En tejido se evaluaron los niveles de TNF- α , LPS y TLR4 (Toll-like receptor 4), que como ya se describió con anterioridad, son sustancias que causan el desarrollo de procesos inflamatorios. Se utilizaron kits ELISA para la determinación de los niveles de las 3 sustancias siguiendo las instrucciones del fabricante (ab100785 de Abcam, Cambridge, UK para TNF- α y MBS268498 y MBS705486 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EE.UU. para LPS y TLR4 respectivamente).

4.5.2. Determinación de marcadores de daño celular

Se evaluaron diferentes marcadores de daño celular incluyendo marcadores de daño endotelial, apoptosis y fibrosis.

Se determinaron los niveles de bilirrubina. La bilirrubina es un producto formado por la degradación del grupo hemo en tejido hepático, donde se conjuga con el ácido glucurónico y es segregada a la bilis. Sus altos niveles en plasma son indicativos de lesión hepática y/o obstrucción de los conductos biliares. En el torrente

sanguíneo, la bilirrubina puede circular en forma no conjugada insoluble (forma indirecta) o conjugada con ácido glucurónico soluble (forma directa).



La detección de bilirrubina total en muestras de plasma se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante mediante un kit comercial (MBS730053 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

La fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima que facilita la hidrólisis de ésteres de fosfato en condiciones alcalinas, produciendo fosfato orgánico e inorgánico. Las variaciones de sus niveles así como de su actividad enzimática se han relacionado con diversas enfermedades hepáticas y trastornos biliares (Rafaqat et al. 2023). La actividad de la ALP se midió utilizando un kit colorimétrico comercial (ab287823 de Abcam, Cambridge, UK), el cual se basa en el cambio de color del p-nitrofenil fosfato (pNPP) al ser desfosforilado a p-nitrofenol (pNP) por la ALP que se mide a una longitud de onda de 405 nm. El proceso se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

La LDH es una enzima que cataliza la formación de lactato por el piruvato y viceversa y sus niveles se ven incrementados debido a daño tisular. Los niveles plasmáticos de esta enzima se determinaron mediante un kit ELISA siguiendo las instrucciones del proveedor (MBS2018912 MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

Se cuantificaron los niveles en plasma del factor de Von Willebrand (vWF) (MBS703460 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EE.UU.) y del HA (ácido hialurónico) (MBS162865 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EE.UU.). El vWF es una glicoproteína con funciones homeostáticas cuyos niveles aumentan en el torrente sanguíneo como indicativo de daño endotelial. Por otra parte, el HA es un glucosaminoglicano no

sulfatado que se encuentra en la matriz extracelular importante en procesos de migración y adhesión celular, así como en el establecimiento de interacciones con sustancias extracelulares. Niveles aumentados en el torrente sanguíneo son también indicativos de daño endotelial y/o disfunción vascular. Se evaluaron sus niveles mediante kits ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los niveles de colágeno-I, α -sma y TGF- β se midieron en tejido hepático también mediante kits ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (ab285314 de Abcam, Cambridge, UK para el colágeno-I, MBS266620 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EE.UU. para el α -sma y MBS260302 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EE.UU. para TGF- β). Dichos marcadores se ven aumentados en tejido hepático en presencia de procesos que cursan con fibrosis.

Por último, para evaluar la muerte celular por apoptosis, se evaluó en tejido la actividad caspasa-3. Se trata de una proteína efectora de las vías apoptóticas, cuya actividad se ve incrementada en tejidos que sufren este tipo de muerte celular. Este ensayo se realizó mediante un kit colorimétrico siguiendo las instrucciones del fabricante (ab39401 de Abcam, Cambridge, UK).

4.5.3. Marcadores de regeneración

Como potenciales marcadores regenerativos se analizaron los niveles de HGF y Ki-67. Sus niveles se cuantificaron en tejido mediante kits ELISA atendiendo a las instrucciones del fabricante (MBS177216 y MBS705024 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EE.UU. para HGF y Ki-67 respectivamente). Dichos marcadores se ven aumentados en tejido hepático con una alta capacidad regenerativa.

4.5.4. Marcadores de actividad metabólica

Los niveles tisulares de ATP y lactato fueron analizados con tal de identificar y definir la actividad metabólica. Por una parte, la cuantificación de los niveles de lactato se realizó mediante un kit colorimétrico siguiendo las instrucciones del fabricante (E-BB-K044-S de Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Wuhan, China). Por otra parte, los niveles tisulares de ATP se midieron mediante kit ELISA atendiendo también a las instrucciones del fabricante (MBS166244 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

Se evaluaron también mediante kit ELISA los niveles tisulares de glicógeno según las instrucciones del fabricante (MBS729293 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

Se evaluó en tejido hepático el perfil lipídico, cuantificando los niveles de FFAA (ácidos grasos), TGs y TC (colesterol total) mediante kits ELISA atendiendo a las instrucciones del fabricante (FFAA: MBS266907; TGs: MBS2515791; TC: MBS2600008 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EE.UU.). Los niveles de fosfolípidos en tejido hepático se cuantificaron mediante un ensayo colorimétrico (MAK122-1KT de Sigma Aldrich, Sant Louis, MO, EE.UU.).

4.5.5. Ensayo inmunoenzimático de las vías de señalización estudiadas

Para evaluar el papel de las vías implicadas en los diferentes estudios de la presente tesis se han evaluado los niveles de GH, VEGFA, VEGFB, NRG1, PAK1 e IGF-1 en tejido y plasma. Todos sus niveles fueron cuantificados mediante kit ELISA atendiendo a las instrucciones del fabricante (E-EL-R3003 de Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Wuhan, China para GH, E-EL-R2603 de Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Wuhan, China para VEGFA, MBS269676 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EE.UU. para VEGFB, E-EL-R0790 de Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Wuhan, China para NRG1, MBS2887909 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EE.UU. para PAK1 y E-EL-R3001 de Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Wuhan, China para IGF-1).

5. EXTRACCIÓN DE ARN, RETROTRANSCRIPCIÓN Y qPCR

El ARN (ácido ribonucleico) total se aisló del tejido congelado utilizando el reactivo TRIzol (15596026 de Invitrogen, Madrid, España), se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 y se retrotranscribió a ADNc (ADN complementario) utilizando el kit *“High Capacity cDNA Reverse Transcription”* (4374966 de ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se realizó la qPCR con la mezcla *“TaqMan Universal PCR Master Mix”* (4304437 de ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) en un sistema de detección ABI PRISM 7900 HT, utilizando sondas TaqMan preconfiguradas *Assays-on-Demand* (Rn01511602_m1 para VEGFA, Rn01454585_g1 para VEGFB y

Rn00667869_m1 para β -actina como control endógeno, de ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) según el protocolo del fabricante. Para evaluar los resultados finalmente se aplicó el método de $2\text{-}\Delta\Delta\text{CT}$ (Livak et al. 2001).

6. PERMEABILIDAD VASCULAR

La permeabilidad vascular se midió mediante el uso del método de Evans Blue. Se administró por vía i.v. a las ratas tinción de Evans Blue diluido en un 0.9% - NaCl. Tres horas después de la administración los animales fueron sacrificados con tal de evaluar la integridad de la barrera intestinal (Schäfer et al. 2019). La integridad de la barrera se evaluó mediante métodos establecidos utilizando el test de Miles modificado, el cual reveló cambios en la acumulación del Azul de Evans en el tejido (Dahlborg et al. 1998; Schäfer et al. 2019).

7. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

7.1. Técnicas de inmunohistoquímica

Las muestras de tejido se fijaron en paraformaldehído tamponado al 4% (Panreac, Barcelona, España) durante 24 horas y posteriormente se mantuvieron en PBS 1X, hasta su inclusión en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 3 μm de grosor, que posteriormente se desparafinaron con xilol y se hidrataron con soluciones de etanol a concentraciones decrecientes para ser sometidos a la posterior inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica de PCNA (Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.) se llevó a cabo mediante un kit comercial (DAKO Envision + System, peroxidase (DAB); Dako, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Inicialmente, se bloquearon las peroxidasas endógenas de la muestra con una dilución 1:10 de H_2O_2 al 30% en metanol. Se incubó con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche. Al día siguiente, tras diversos lavados con tampón Tris y la posterior incubación de las muestras con el anticuerpo secundario, se trataron los cortes con DAB (diaminobenzidina), el sustrato cromógeno que tiñe de marrón las células positivas. Finalmente, los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina para realizar una tinción de contraste antes de realizar el montaje de las muestras.

El índice de proliferación de las biopsias teñidas con PCNA se determinó en 30 campos de gran aumento. Los datos se expresaron como el porcentaje de células teñidas con PCNA respecto al número total de células.

7.2. Daño hepático

Las muestras de tejido se fijaron en paraformaldehído tamponado al 4% (Panreac, Barcelona, España) durante 24 horas y posteriormente se mantuvieron en PBS 1X, hasta su inclusión en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 3 µm de grosor y se realizó una tinción por hematoxilina-eosina siguiendo los procedimientos convencionales (Cardiff et al. 2014).

Como parámetro de lesión hepática para el estudio 1 y 2 se realizó una puntuación histológica a ciegas utilizando una escala del 1 al 4: grado 0, evidencia mínima o nula de lesión; grado 1, lesión leve consistente en vacuolización citoplasmática y focos de picnosis nuclear; grado 2, lesión moderada a severa con picnosis nuclear extensa, hipereosinofilia citoplasmática y pérdida de los bordes intercelulares; grado 3, necrosis severa con desintegración de los cordones hepáticos, hemorragia e infiltración de neutrófilos; y grado 4, necrosis muy severa con desintegración de los cordones hepáticos, hemorragia e infiltración de neutrófilos (Serafín et al. 2002).

Como parámetro de evaluación de la lesión hepática para el último estudio, se examinó el estado de los sinusoides según lo descrito por Behrends et al. (Behrends et al. 2010). Las secciones fueron evaluadas en una escala del 0 al 4 para los siguientes factores a tener en cuenta: dilatación sinusoidal, congestión sinusoidal, atrofia, fibrosis perisinusoidal, fibrosis portal e inflamación portal. Se contaron al menos 30 campos de gran aumento y al menos cuatro secciones por muestra de hígado.

7.3. Grado de esteatosis hepática

La esteatosis hepática se evaluó mediante tinción con Oil Red en tejido hepático en secciones de OCT (Temperatura óptima de corte). Tras la realización de cortes histológicos de 5 µm de grosor se realizó la tinción por Oil Red siguiendo los métodos establecidos (Du et al. 2023). Las secciones se fijaron en formalina al 10%.

Posteriormente, las muestras se colocaron en propilenglicol al 100% y se tiñeron en una solución de Oil Red al 0.5% en propilenglicol durante 30 minutos. Finalmente, las láminas se trasladaron a una solución de propilenglicol al 85% durante 1 minuto antes de ser teñidas con hematoxilina. Se contaron al menos 30 campos de gran aumento y al menos cuatro secciones por muestra de hígado. El grado de severidad de la esteatosis se evaluó según tres categorías diferentes: leve (<30% de los hepatocitos con gotas lipídicas), moderada (30-60% de los hepatocitos con gotas lipídicas) y grave (>60% de los hepatocitos con gotas lipídicas) (Mónica B. Jiménez-Castro et al. 2017).

7.4. Grado de fibrosis hepática

Para estudiar el grado de fibrosis hepática se realizó la tinción de Sirius Red, que marca las fibras de colágeno-I. Al igual que para la inmunohistoquímica y la tinción por hematoxilina-eosina, el tejido se fijó en paraformaldehído tamponado al 4% (Panreac, Barcelona, España) durante 24 horas y posteriormente se mantuvo en PBS 1X, hasta su inclusión en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 3 µm de grosor y se realizó la tinción de Sirius Red mediante los procedimientos convencionales establecidos (Segnani et al. 2015). Se contaron al menos 30 campos de gran aumento y al menos cuatro secciones por muestra de hígado.

7.5. Daño de la mucosa intestinal

Las muestras de tejido se fijaron en paraformaldehído tamponado al 4% (Panreac, Barcelona, España) durante 24 horas y posteriormente se mantuvieron en PBS 1X, hasta su inclusión en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 3 µm de grosor y se realizó una tinción por hematoxilina-eosina siguiendo los procedimientos convencionales (Cardiff et al. 2014).

El daño de la mucosa intestinal se evaluó utilizando el Score de Chiu (Chiu et al. 1970), atendiendo a la siguiente escala: grado 0, vellosidades de la mucosa normales; grado 1, desarrollo de espacios subepiteliales de Gruenhagen en la punta de las vellosidades, con congestión capilar; grado 2, extensión del espacio subepitelial con elevación moderada del epitelio; grado 3, elevación masiva del epitelio, posiblemente con algunas vellosidades desnudadas; grado 4, vellosidades desnudadas con la lámina propia y capilares dilatados expuestos; grado 5, digestión y desintegración de la lámina

propia, con ulceración y hemorragia. Se contaron al menos 30 campos de gran aumento y al menos cuatro secciones por muestra de intestino.

7.6. Tinción de TUNEL

Se utilizó un kit de ensayo TUNEL para identificar células apoptóticas (núcleos o cuerpos apoptóticos) mediante un kit de detección de fragmentación del ADN (ab206386 de Abcam, Cambridge, Reino Unido) usando secciones desparafinadas de unos 3 μm de grosor de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se contaron al menos 30 campos de gran aumento y al menos cuatro secciones por muestra de hígado.

8. EDEMA

Las muestras de tejido se pesaron y se colocaron en un horno de secado a una temperatura de 55°C, donde fueron pesadas periódicamente hasta que se obtuvo un peso constante. El edema hepático se representa como el incremento en la relación peso húmedo/peso seco (Peralta et al. 1999).

9. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron con Prism 10.0.2 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.). Todos los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media. Los resultados se compararon mediante ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey. Para las comparaciones entre solo dos grupos se realizó la prueba t de Student. Se consideraron significativas las diferencias con valores de $p < 0.05$.

Resultados

RESULTADOS

1. ESTUDIO 1: PAPEL DEL TRATAMIENTO NUTRICIONAL EN EL DAÑO HEPÁTICO E INTESTINAL EN EL TRASPLANTE CON INJERTOS HEPÁTICOS ESTEATÓSICOS Y NO ESTEATÓSICOS PROCEDENTES DE DONANTES CON MUERTE CEREBRAL

1.1. Efectos de la administración de lípidos y glucosa en el daño hepático en el TH con injertos esteatósicos y no esteatósicos en un modelo experimental de obesidad inducida genéticamente

Se observó un daño hepático exacerbado en el grupo BD + TH (transaminasas, ALP y bilirrubina) así como en las células endoteliales, evaluado por los niveles de vWF y HA, tanto en injertos esteatósicos como no esteatósicos, en comparación con los resultados del grupo TH. Se estudió la relevancia del tratamiento con lípidos o glucosa en el daño hepático asociado al TH con hígados no esteatósicos y esteatósicos procedentes de DBDs. Se observó que la administración de glucosa (grupo BD + TH + Glucosa) no indujo ningún cambio en la lesión en ninguno de los tipos de injertos, ya que no modificó los niveles de transaminasas, ALP, bilirrubina, vWF o HA, en comparación con el grupo BD + TH (Figura 11). No obstante, la administración de lípidos (grupo BD + TH + Lípidos) sí protegió frente al daño hepático, pero solo en presencia de esteatosis. Este hallazgo se reflejó en la reducción significativa de los niveles de los diferentes marcadores de daño hepático y endotelial, en comparación con los resultados del grupo BD + TH. En los grupos BD + TH, BD + TH + Glucosa y BD + TH + Lípidos, tras la evaluación histológica de hígados sin esteatosis, se observaron áreas de necrosis coagulativa moderada e infiltración de neutrófilos. Por otra parte, en los injertos esteatósicos de los grupos BD + TH y BD + TH + Glucosa, se observaron áreas extensas y confluentes de necrosis coagulativa severa. En las muestras del grupo BD + TH + Lípidos, se observó una reducción en la extensión y en el número de áreas necróticas tanto en hígados esteatósicos como no esteatósicos. Estos resultados se evidenciaron por la puntuación obtenida en el grado de lesión hepática (Figura 11).

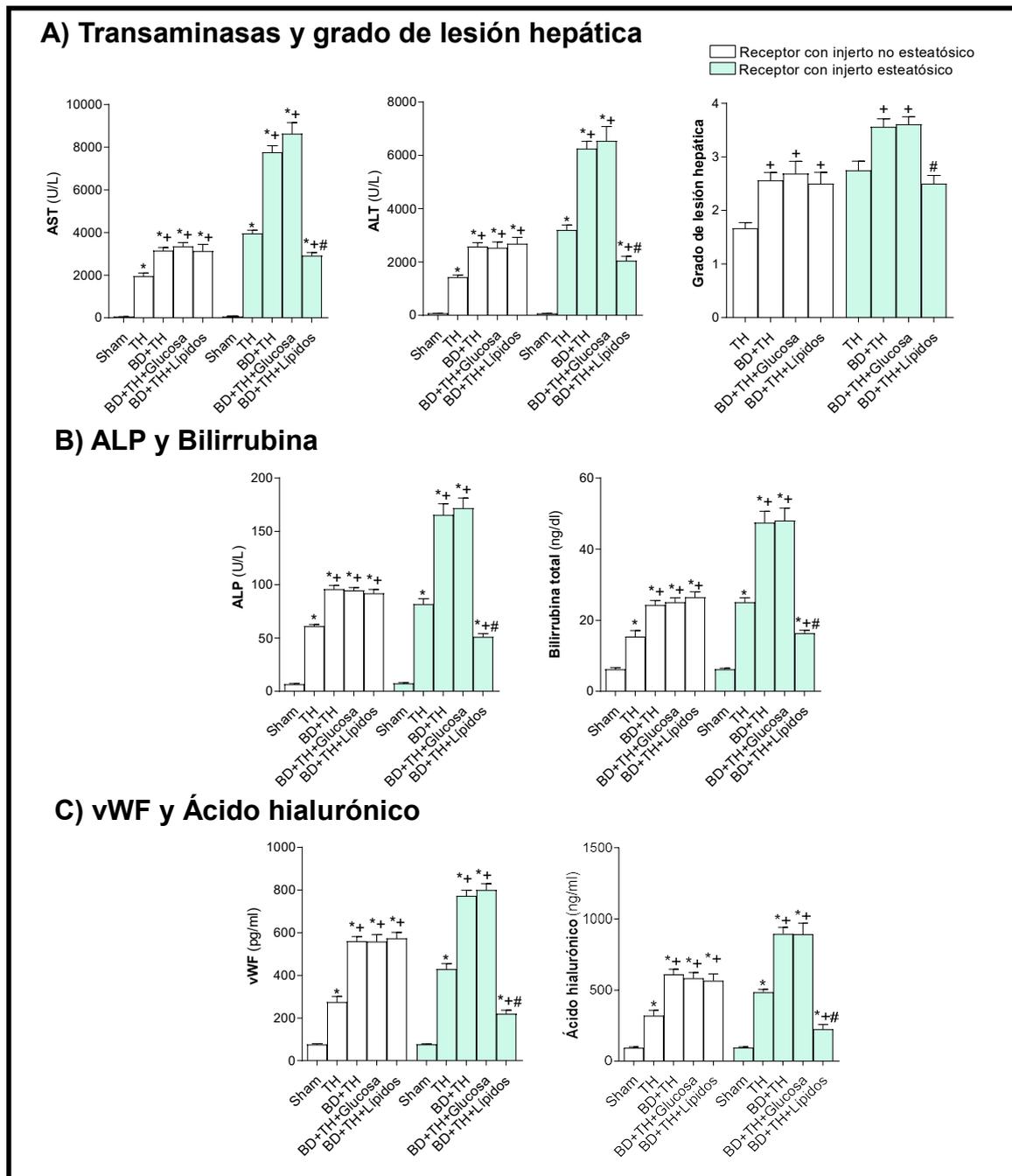


Figura 11. Efectos de la glucosa y los lípidos en el daño hepático en trasplante hepático (TH) con injertos esteatósicos y no esteatósicos en un modelo experimental de obesidad inducida genéticamente. (A) AST y ALT en plasma, y grado de lesión hepática en tejido hepático. (B) Fosfatasa alcalina (ALP) y bilirrubina en plasma. (C) Factor von Willebrand (vWF) y ácido hialurónico (HA) en plasma. * $p < 0.05$ vs. Sham. + $p < 0.05$ vs. TH. # $p < 0.05$ vs. Muerte cerebral + Trasplante hepático (BD + TH). DBD, Donantes después de muerte cerebral.

1.2. Mecanismos de acción implicados en los efectos de la glucosa y los lípidos en hígados esteatósicos y no esteatósicos en un modelo experimental de obesidad inducida genéticamente

Se observó que en los grupos BD + TH+ Glucosa y BD + TH+ Lípidos los niveles de ATP y glucógeno en los injertos no esteatósicos fueron similares al grupo BD + TH. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los niveles de ATP y glucógeno hepáticos en hígados esteatósicos, entre los grupos BD + TH + Glucosa y BD + TH. No obstante, los niveles de ATP y glucógeno en los hígados esteatósicos del grupo BD + TH + Lípidos fueron mayores que los del grupo BD + TH (Figura 12). Por último, mientras que los niveles de FFA, TGs y TC fueron similares en todos los grupos, se evidenció un aumento en los niveles de fosfolípidos en los injertos del grupo BD + TH + Lípidos en comparación con el grupo BD + TH (Figura 12).

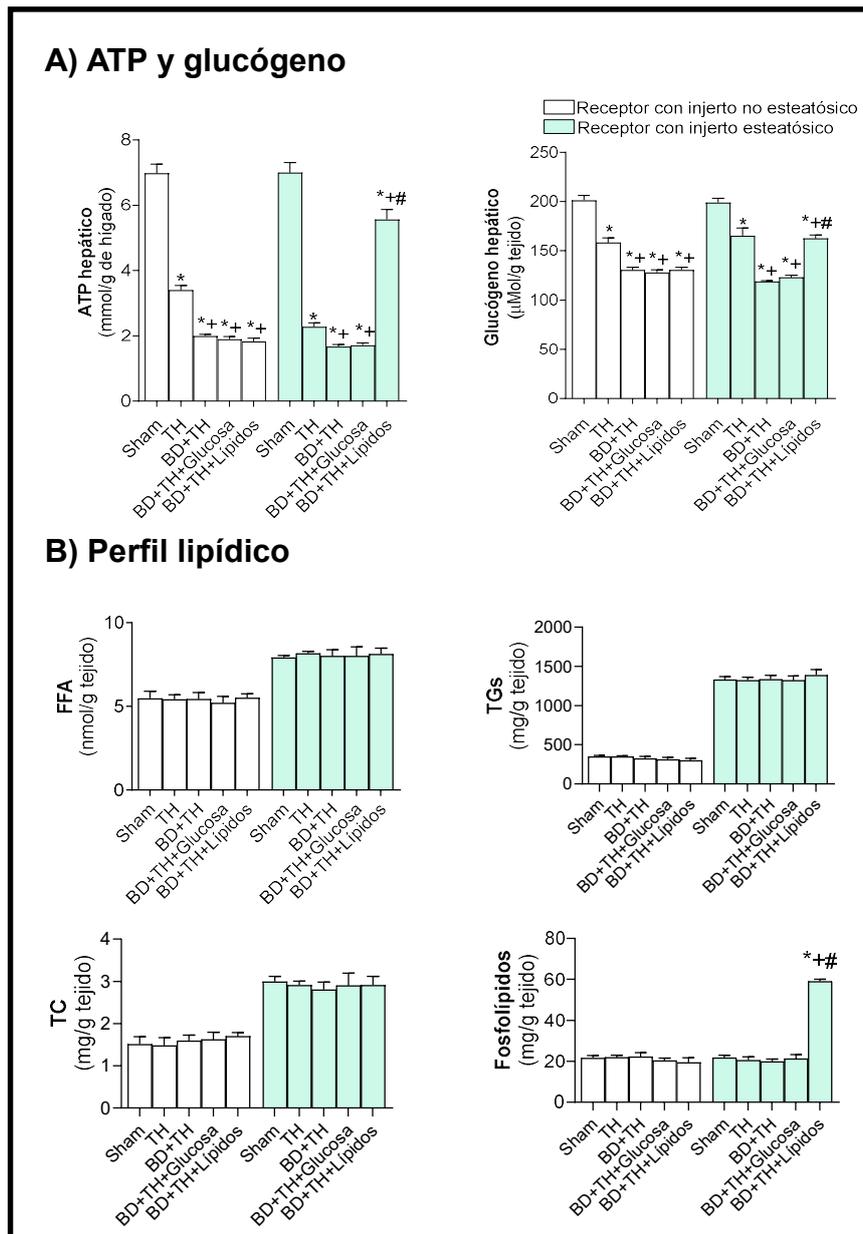


Figura 12. Efectos de la glucosa y los lípidos en el ATP, glucógeno y perfil lipídico en trasplante hepático (TH) con injertos esteatóticos y no esteatóticos en un modelo experimental de obesidad inducida genéticamente. (A) Contenido de ATP y glucógeno en tejido hepático. (B) FFA, triglicéridos, colesterol total y fosfolípidos en tejido hepático. * $p < 0.05$ vs. Sham. + $p < 0.05$ vs. Trasplante hepático (TH). # $p < 0.05$ vs. Muerte cerebral + Trasplante hepático (BD + TH). DBD, Donantes después de muerte cerebral.

A continuación, se evaluó si, además de los beneficios observados en términos de marcadores de metabolismo energético (ATP, glucógeno y fosfolípidos) inducidos por el tratamiento con lípidos en injertos esteatóticos, los cambios en los factores de crecimiento (HGF y VEGFA) podrían explicar también los beneficios ofrecidos por dicho tratamiento en presencia de esteatosis. Observamos que los niveles de los 3 factores de crecimiento estudiados en tejido hepático no esteatótico fueron similares en los grupos BD + TH, BD + TH + Glucosa y BD + TH + Lípidos (Figura 13). De igual manera, en los hígados esteatóticos del grupo BD + TH + Glucosa los niveles de HGF y VEGFA fueron similares a los del grupo BD + TH. Sin embargo, los hígados esteatóticos del grupo BD + TH + Lípidos tenían niveles más altos de HGF y VEGFA, indicando un mayor índice de regeneración (Figura 13).

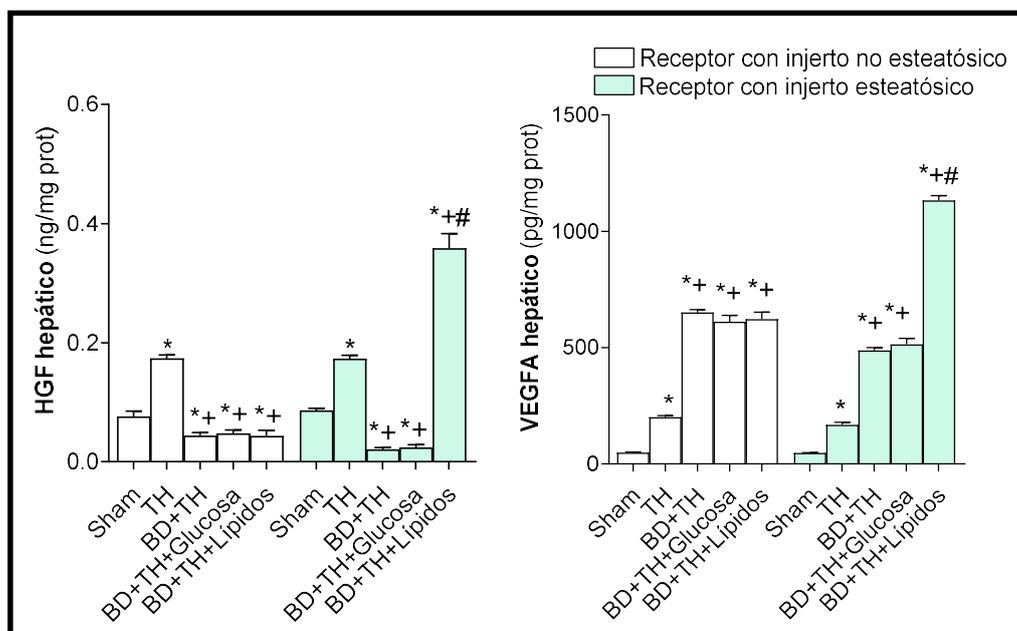


Figura 13. Efectos de la glucosa y los lípidos sobre HGF y VEGFA en trasplante hepático (TH) con hígados esteatóticos y no esteatóticos en un modelo experimental de obesidad inducida genéticamente en tejido hepático. * $p < 0.05$ vs. Sham. + $p < 0.05$ vs. Trasplante hepático (TH). # $p < 0.05$ vs. Muerte cerebral + Trasplante hepático (BD + TH). DBD, Donantes después de muerte cerebral.

1.3. Relevancia del intestino en los efectos de la administración de lípidos y glucosa en el daño hepático en el TH con injertos esteatósicos y no esteatósicos en un modelo experimental de obesidad genéticamente

Debido a la importancia del eje intestino-hígado, consideramos la posibilidad de que los efectos beneficiosos de los lípidos en el daño hepático pudieran ser debidos a la mejora en los parámetros inflamatorios en intestino. Esta hipótesis fue descartada ya que todos los parámetros indicadores de inflamación y daño intestinal (LPS, permeabilidad vascular, LDH, daño en la mucosa, TLR4, TNF α , IL1 β , IL10, MPO, MDA y formación de edema) en el grupo BD + TH + Lípidos fueron similares a los del grupo BD + TH (Figura 14). De hecho, no se observaron diferencias significativas en los parámetros de inflamación intestinal y daño al comparar el control sham, TH y BD + TH, descartando de esta forma una especial relevancia de este eje en los efectos de la glucosa y de las emulsiones lipídicas sobre los injertos hepáticos esteatósicos y no esteatósicos

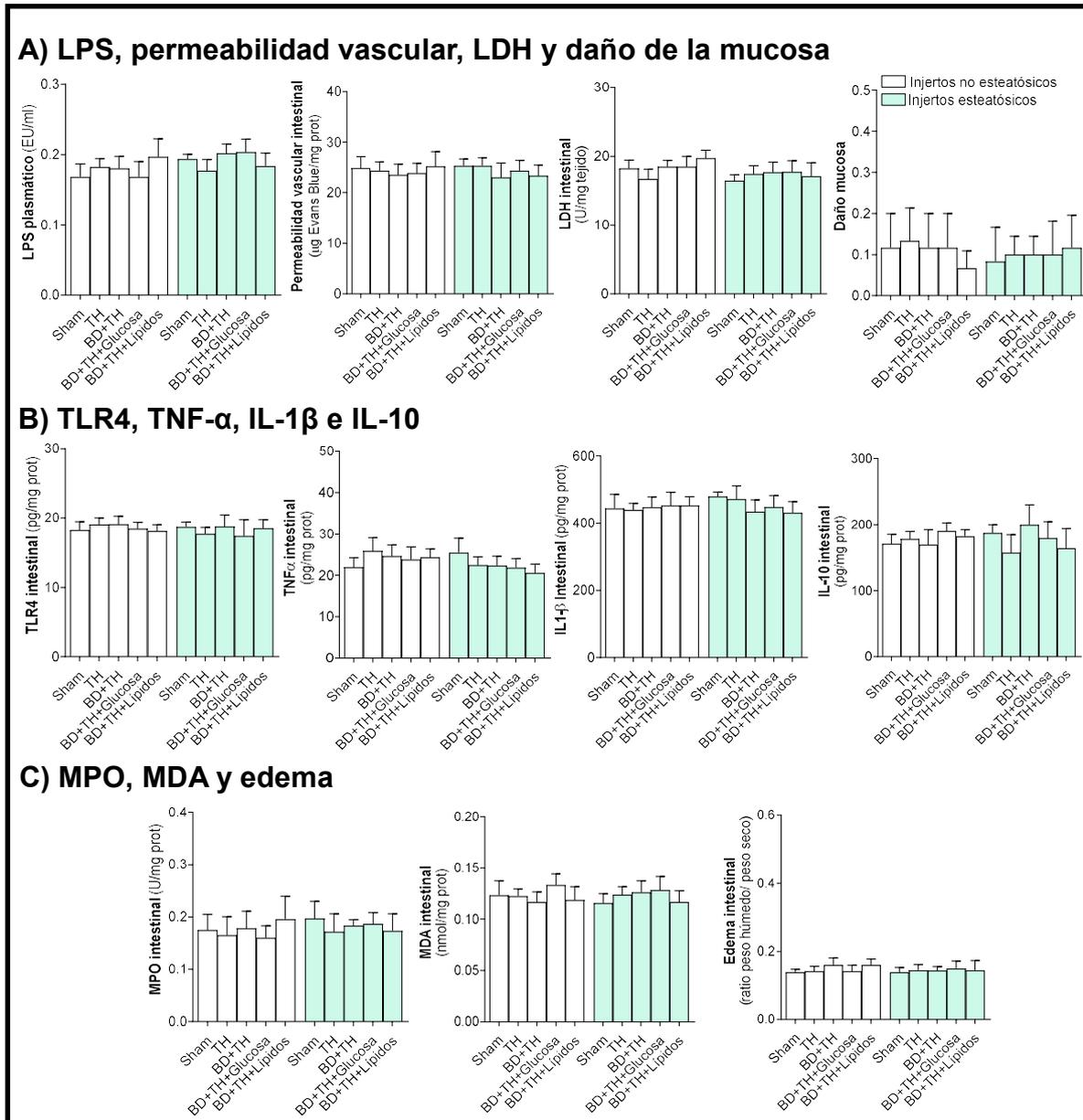


Figura 14. Efectos de la glucosa y los lípidos en la inflamación y daño intestinal en trasplante hepático (TH) con hígados esteatóticos y no esteatóticos en un modelo experimental de obesidad genéticamente. **(A)** LPS en plasma, permeabilidad vascular, LDH y daño en la mucosa intestinal. **(B)** Receptor tipo Toll 4 (TLR4), factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-10 (IL-10) en el intestino. **(C)** Mieloperoxidasa (MPO), malondialdehído (MDA) y formación de edema en el intestino. $p =$ no significativo. DBD, Donantes después de muerte cerebral.

1.4. Daño hepático e inflamación intestinal en el TH procedente de DBDs en un modelo de obesidad inducido nutricionalmente

Los resultados reportados en relación a todos los parámetros analizados, indicaron un patrón similar al descrito en el modelo de obesidad inducida genéticamente (ratas Zucker) (Figura 11, Figura 12, Figura 13 y Figura 14). De esta forma, en el modelo de obesidad nutricional, los resultados revelaron un aumento en las transaminasas, bilirrubina, grado de lesión hepática, ALP, vWF y HA en injertos esteatósicos y no esteatósicos del grupo BD + TH en comparación con los resultados del grupo TH (Figura 15). La administración de glucosa o emulsión lipídica (grupos BD + TH + Glucosa y BD + TH + Lípido) no indujo cambios significativos en la lesión hepática en hígados no esteatósicos, ya que los parámetros de lesión en comparación con el grupo BD + TH no se vieron alterados. La administración de glucosa (grupo BD + TH + Glucosa) resultó en valores de transaminasas, bilirrubina, grado de lesión hepática, ALP, vWF y ácido hialurónico en hígados esteatósicos similares a los del grupo BD + TH. Sin embargo, la administración de lípidos (grupo BD + TH + Lípido) protegió frente al daño hepático en hígados esteatósicos, reduciendo significativamente los niveles de transaminasas, bilirrubina, grado de lesión hepática, ALP, vWF y ácido hialurónico en comparación con los resultados del grupo BD + TH. En este modelo, la emulsión de lípidos, pero no la glucosa, promovió un aumento en los niveles hepáticos de ATP y glucógeno solo en el grupo BD + TH con esteatosis. Los niveles de FFA, triglicéridos y colesterol total fueron similares en todos los grupos. El grupo BD + TH + Lípidos presentó niveles aumentados de fosfolípidos solo en hígados esteatósicos en comparación con el grupo BD + TH (Figura 16). Los niveles de HGF y VEGFA en hígados no esteatósicos fueron similares en los grupos BD + TH, BD + TH + Glucosa y BD + TH + Lípidos. Los niveles de HGF y VEGFA en hígados esteatósicos del grupo BD + TH + Glucosa fueron similares a los del grupo BD + TH. No obstante, en los hígados de donantes esteatósicos del grupo BD + TH + Lípidos se observó un aumento significativo de los niveles de dichos factores de crecimiento (Figura 17).

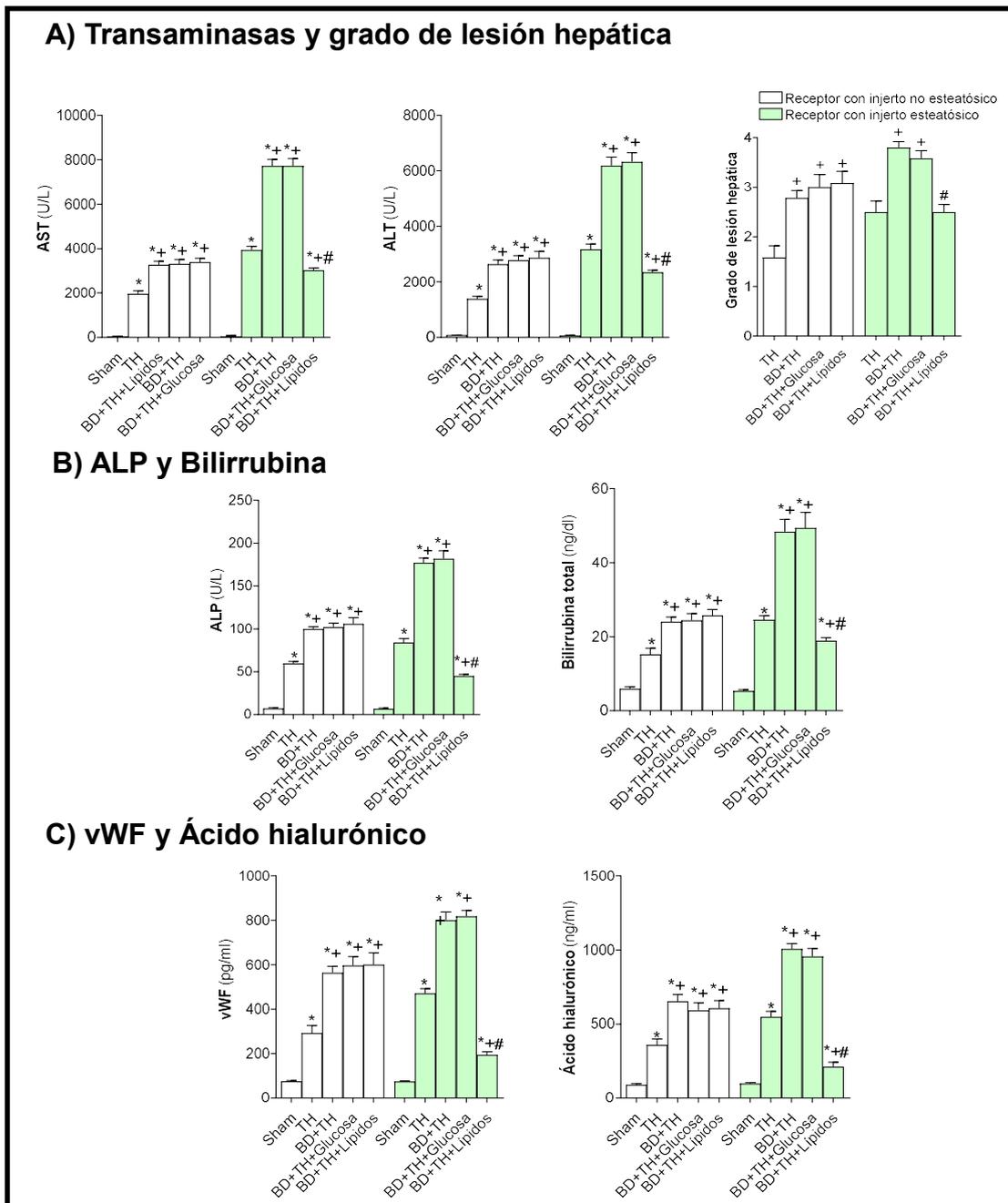


Figura 15. Efectos de la glucosa y los lípidos en el daño hepático en trasplante hepático (TH) con injertos esteatósicos y no esteatósicos en un modelo experimental de obesidad inducida nutricionalmente. (A) AST y ALT en plasma, y grado de lesión hepática en tejido hepático. (B) Fosfatasa alcalina (ALP) y bilirrubina en plasma. (C) Factor von Willebrand (vWF) y ácido hialurónico (HA) en plasma. * $p < 0.05$ vs. Sham. + $p < 0.05$ vs. TH. # $p < 0.05$ vs. Muerte cerebral + Trasplante hepático (BD + TH). DBD, Donantes después de muerte cerebral.

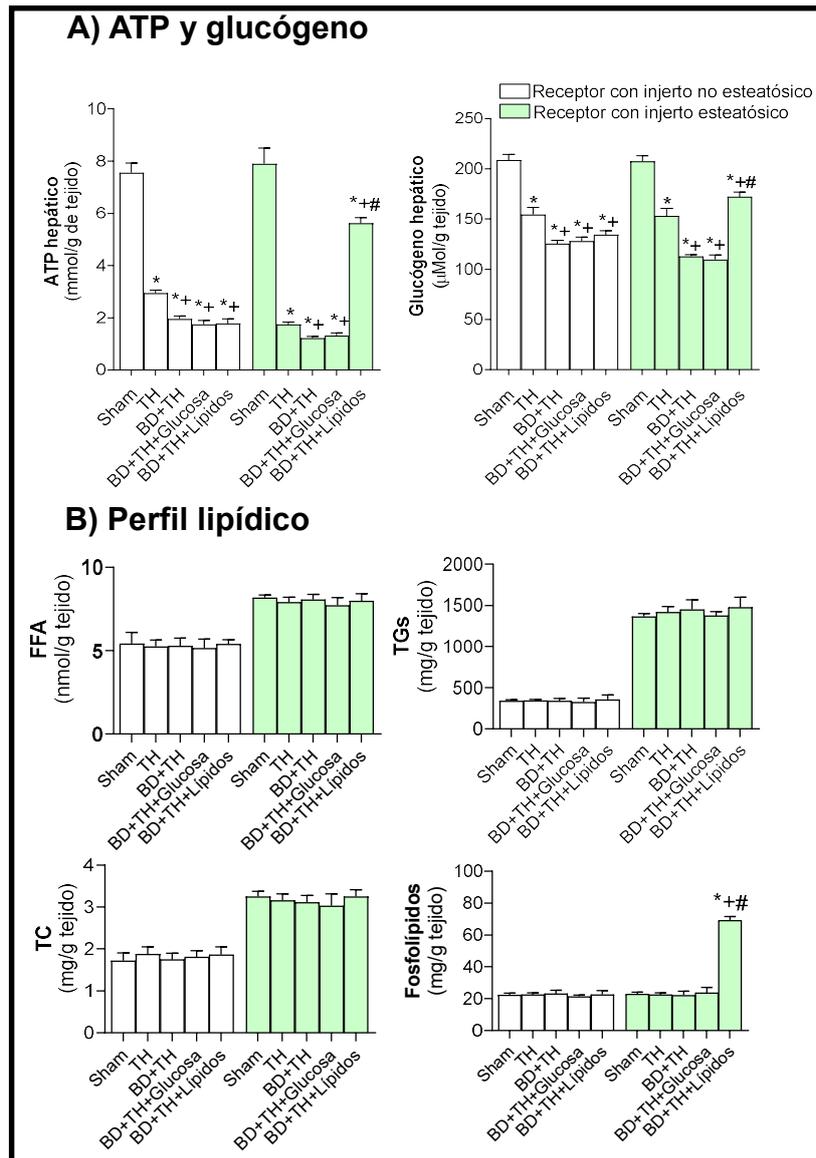


Figura 16. Efectos de la glucosa y los lípidos en el ATP, glucógeno y perfil lipídico en trasplante hepático (TH) con injertos esteatóticos y no esteatóticos en un modelo experimental de obesidad inducida nutricionalmente. (A) Contenido de ATP y glucógeno en tejido hepático. (B) FFA, triglicéridos, colesterol total y fosfolípidos en tejido hepático. * $p < 0.05$ vs. Sham. + $p < 0.05$ vs. Trasplante hepático (TH). # $p < 0.05$ vs. Muerte cerebral + Trasplante hepático (BD + TH). DBD, Donantes después de muerte cerebral.

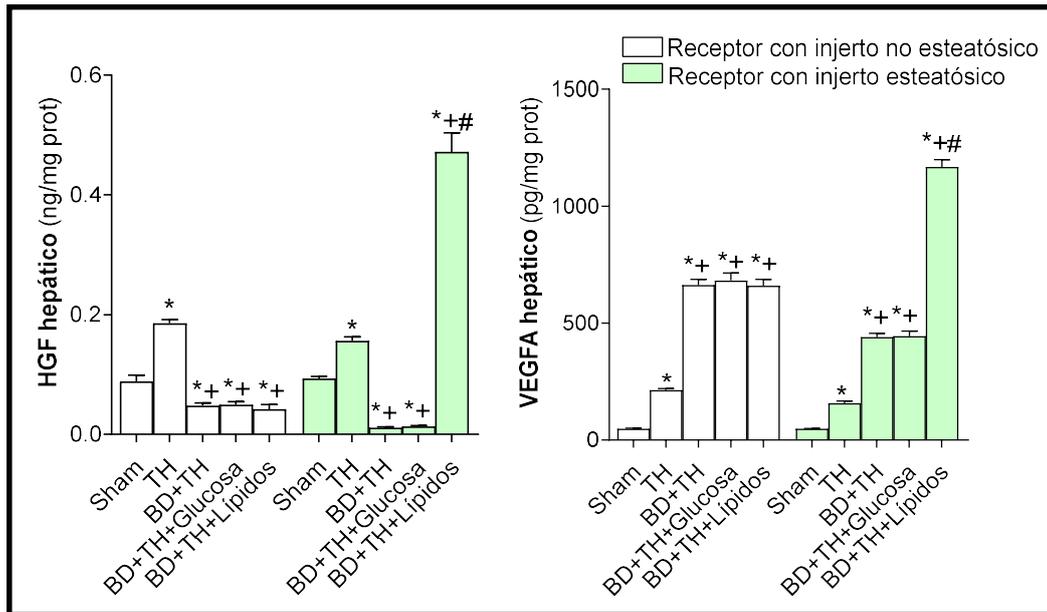


Figura 17. Efectos de la glucosa y los lípidos sobre HGF y VEGFA en trasplante hepático (TH) con hígados esteatósicos y no esteatósicos en un modelo experimental de obesidad inducida nutricionalmente en tejido hepático. * $p < 0.05$ vs. Sham. + $p < 0.05$ vs. Trasplante hepático (TH). # $p < 0.05$ vs. Muerte cerebral + Trasplante hepático (BD + TH). DBD, Donantes después de muerte cerebral.

El daño e inflamación intestinal (LPS, permeabilidad vascular, LDH, daño en la mucosa intestinal TLR4, TNF- α , IL-1 β , IL-10, MPO, MDA y formación de edema) fueron similares en los grupos Sham, THy BD +TH. La administración tanto de glucosa como de lípidos (grupos BD + TH+ Glucosa y BD + TH+ Lípidos) resultó en parámetros de daño e inflamación intestinal similares a los del grupo Sham o BD + TH (Figura 18).

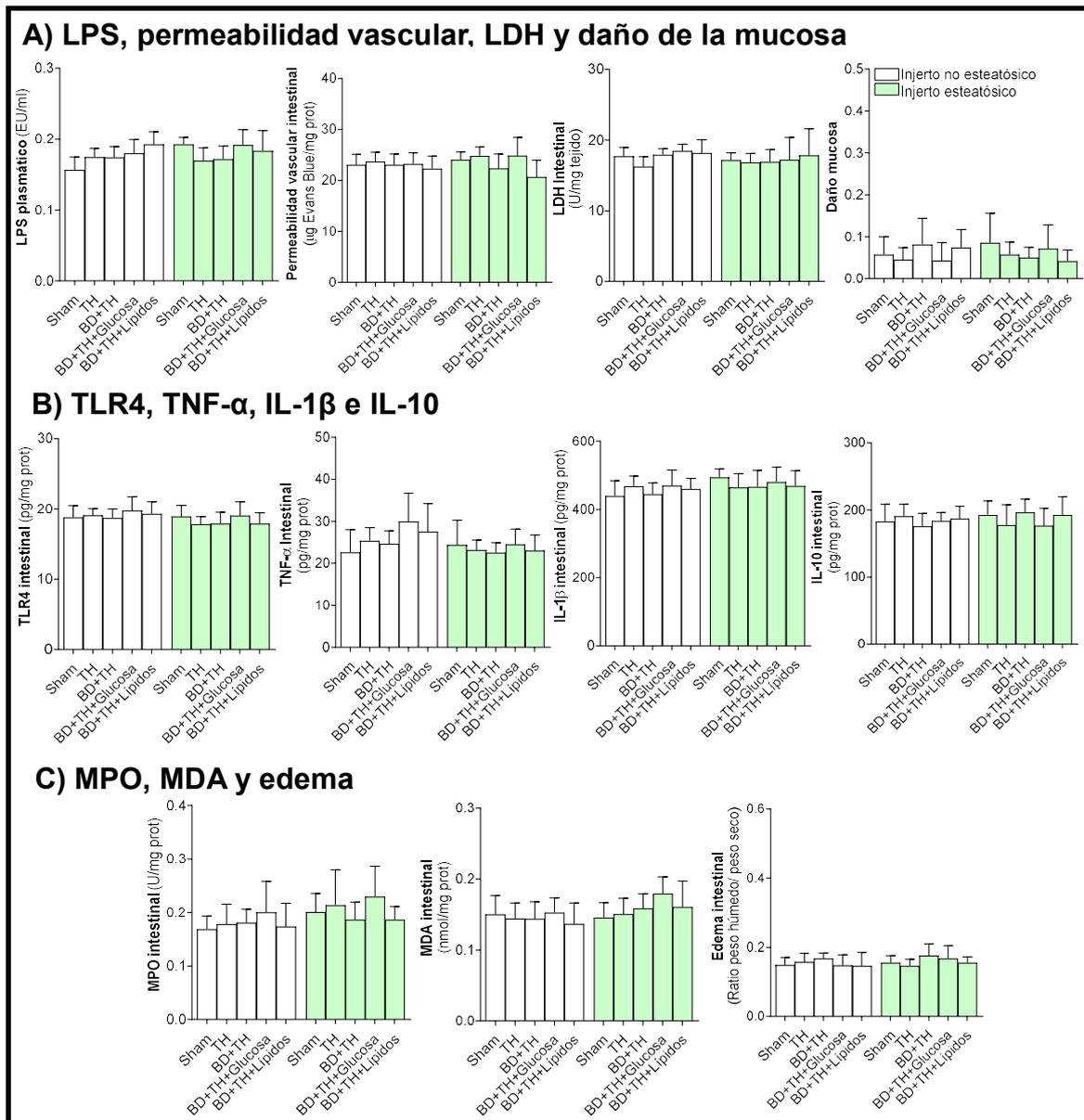


Figura 18. Efectos de la glucosa y los lípidos en la inflamación y daño intestinal en trasplante hepático (TH) con hígados esteatósicos y no esteatósicos en un modelo experimental de obesidad inducida nutricionalmente. **(A)** LPS en plasma, permeabilidad vascular, LDH y daño de la mucosa en el intestino. **(B)** Receptor tipo Toll 4 (TLR4), factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-10 (IL-10) en el intestino. **(C)** Mieloperoxidasa (MPO), malondialdehído (MDA) y formación de edema en el intestino. p = no significativo. DBD, Donantes después de muerte cerebral.

2. ESTUDIO 2: PAPEL DE LA NEUREGULINA-1 EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO DE INJERTOS ESTEATÓSICOS Y NO ESTEATÓSICOS DE DONANTES CON MUERTE CEREBRAL

2.1. Papel del NRG1 en el TH con hígados esteatósicos y no esteatósicos de DBDs en un modelo experimental de obesidad inducida genéticamente

Como se ha detallado en la sección de Introducción, los niveles plasmáticos de NRG1 se ven alterados en algunas patologías del sistema nervioso central. A más a más, se han descrito efectos de NRG1 en diferentes patologías hepáticas. Teniendo en cuenta tales observaciones, se evaluó si los niveles plasmáticos de NRG1 estaban asociados con los niveles hepáticos de NRG1 en el TH con injertos procedentes de DBDs. Nuestros resultados indicaron un aumento en los niveles proteicos de NRG1 en plasma en injertos hepáticos en el grupo BD+TH en comparación con los resultados en los grupos TH (Figura 19A).

Como se ha comentado en la sección de Introducción de la presente Tesis Doctoral, ya está reportado que NRG1 participa en la regulación de PAK1 en células y tejidos distintos del hígado. No obstante, hasta el momento, ningún estudio ha evaluado aún la posible relación entre NRG1 y PAK1 en el contexto del TH con hígados procedentes de DBDs. Tal y como se observó en el caso de NRG1 en hígado, como se muestra en la Figura 19A, los resultados indicaron un aumento en los niveles de PAK1 en los injertos hepáticos en el grupo BD + TH en comparación con los resultados en los grupos de TH de donantes sin BD (grupo TH).

Por lo tanto, tanto NRG1 como PAK1 mostraron niveles aumentados en los TH con hígados procedentes de DBDs (BD+TH) cuando los comparamos con los resultados obtenidos en el grupo TH

Para determinar una posible relación entre PAK1 y NRG1 se administró un anticuerpo frente a NRG1 para inhibir la acción de este mediador (grupo BD + anti-NRG1 + TH). Se observaron niveles bajos de PAK1 en ambos tipos de injertos hepáticos (Figura 19A). Esto nos llevó a concluir que la inhibición de NRG1 estaba alterando los

niveles de PAK1 y que ambos mediadores están relacionados, demostrando así que PAK1 está regulado positivamente por NRG1.

Seguidamente, se investigó si la vía NRG1-PAK1 afectaba los niveles de IGF1 y VEGFA en trasplantes de hígado esteatósicos y no esteatósicos procedentes de DBDs. La inhibición de NRG1 o PAK1 (grupos BD + anti-NRG1 + TH y BD + anti-PAK1 + TH) disminuyó los niveles de VEGFA en hígados no esteatósicos, mientras que no se observaron cambios en presencia de esteatosis en comparación con los resultados obtenidos en el grupo BD + TH. Por otro lado, en presencia de esteatosis, la inhibición de los efectos de NRG1 o PAK1 afectó a IGF1 disminuyendo sus niveles (grupos BD + anti-NRG1 + TH y BD + anti-PAK1 + TH), con respecto al grupo BD + TH. En hígados no esteatósicos, los niveles de IGF1 fueron similares en los grupos BD + anti-NRG1 + TH, BD + anti-PAK1 + TH y BD + TH (Figura 19B).

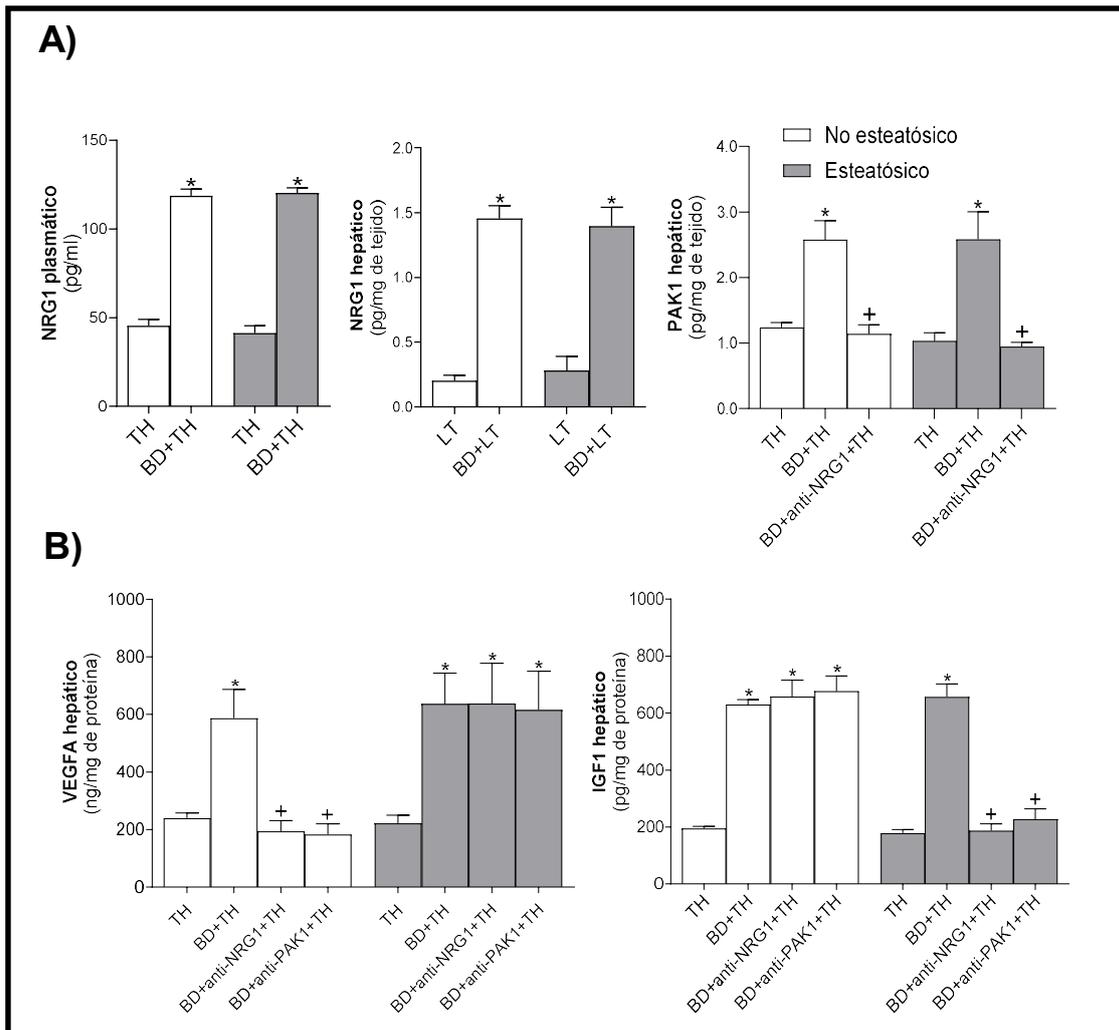


Figura 19. Efecto de NRG1 en los niveles de PAK1, IGF1 y VEGFA en TH con hígados esteatósicos y no esteatósicos de DBDs en un modelo de obesidad inducida genéticamente. (A) Niveles de NRG1 en plasma y niveles de NRG1 y PAK1 en tejido hepático. (B) Niveles de IGF1 y VEGFA en tejido hepático. * $p < 0.05$ vs. LT; + $p < 0.05$ vs. BD+LT.

Posteriormente, se analizó el papel de NRG1-PAK1-VEGFA y NRG1-PAK1-IGF1 en el daño hepático y la proliferación en el TH de hígados esteatósicos y no esteatósicos de DBDs. La inhibición de la actividad de NRG1 o PAK1 (grupos BD + anti-NRG1 + TH y BD + anti-PAK1 + TH) exacerbó el daño hepático, aumentando los valores de transaminasas, grado de lesión hepática (Figura 20), ALP, bilirrubina total, y daño endotelial evaluado por los niveles de vWF y ácido hialurónico (Figura 21), en comparación con el grupo BD + TH, en ambos tipos de hígados. Este hecho fue asociado con una respuesta inflamatoria exacerbada, como se muestra por el aumento MDA, MPO y formación de edema en injertos esteatósicos y no esteatósicos de los grupos BD + anti-NRG1 + TH y BD + anti-PAK1 + TH en comparación con el grupo BD + TH (Figura 22). En el grupo BD + TH, la evaluación histológica de hígados no esteatósicos mostró áreas multifocales moderadas de necrosis coagulativa e infiltración de neutrófilos con una distribución dispersa en todo el parénquima, mientras que en el grupo BD + anti-NRG1 + TH se observaron áreas severas, extensas y confluentes de necrosis coagulativa (Figura 23). En los injertos esteatósicos del grupo BD + TH, se observaron también áreas confluentes y extensas con necrosis coagulativa severa, mientras que la extensión y el número de áreas necróticas incrementó en el grupo BD + anti-NRG1 + TH (Figura 23). En cuanto a la regeneración hepática, los grupos BD + anti-NRG1 + TH y BD + anti-PAK1 + TH mostraron valores más bajos de hepatocitos positivos para PCNA en injertos no esteatósicos y esteatósicos en comparación con el grupo BD + TH (Figura 24 y Figura 25). Esta reducción en el porcentaje de células positivas para PCNA también se asoció con niveles más bajos de HGF y niveles más altos de TGF- β en los grupos BD + anti-NRG1+ TH y BD + anti-PAK1 + TH en comparación con el grupo BD + TH, en ambos tipos de hígados (Figura 25).

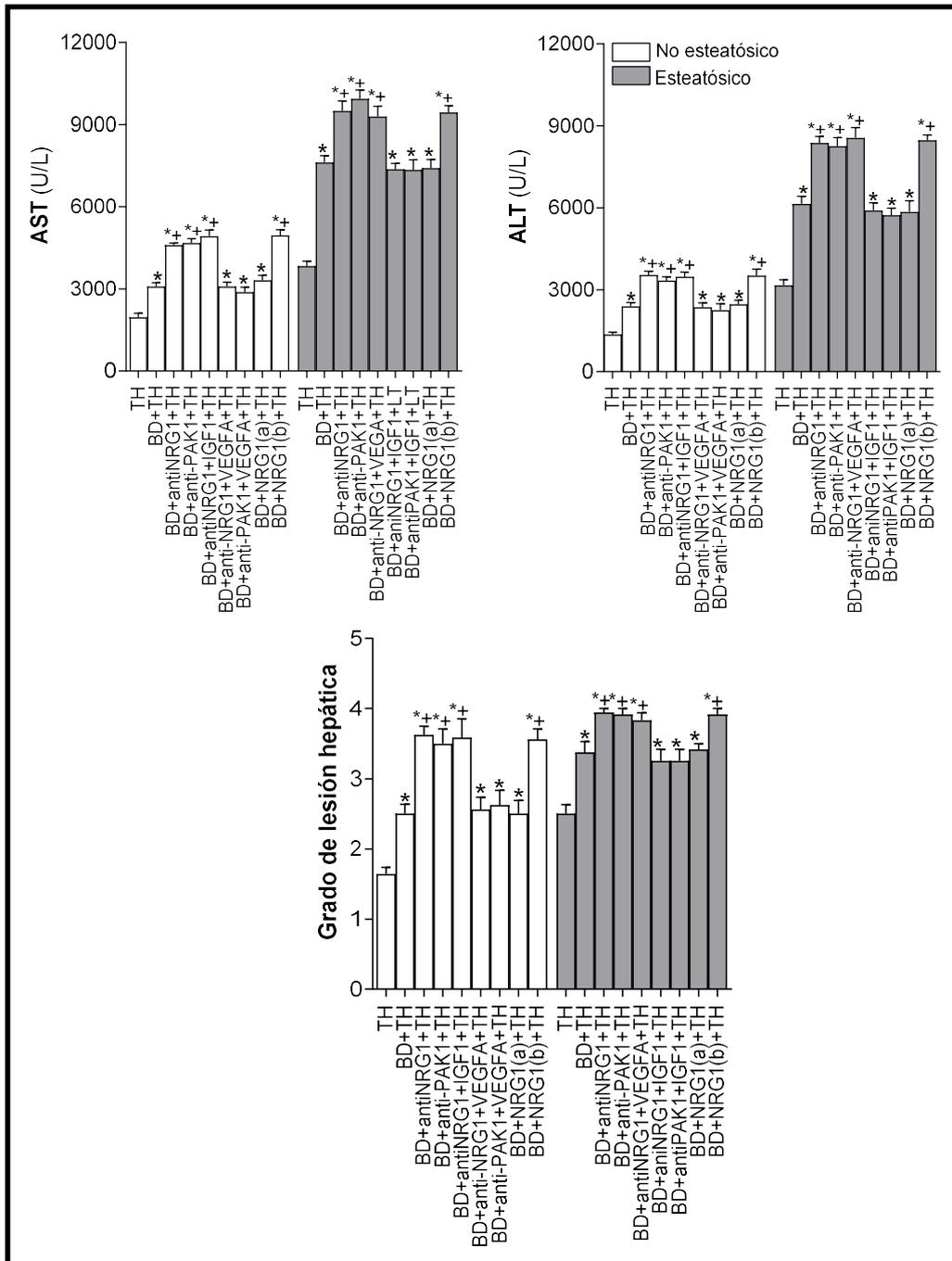


Figura 20. La relevancia de NRG1 en el daño hepático en TH con injertos esteatósicos y no esteatósicos de DBDs en un modelo de obesidad inducida genéticamente. Niveles de ALT y AST en plasma, y grado de lesión hepática en el hígado. * $p < 0.05$ vs. TH; + $p < 0.05$ vs. BD+TH.

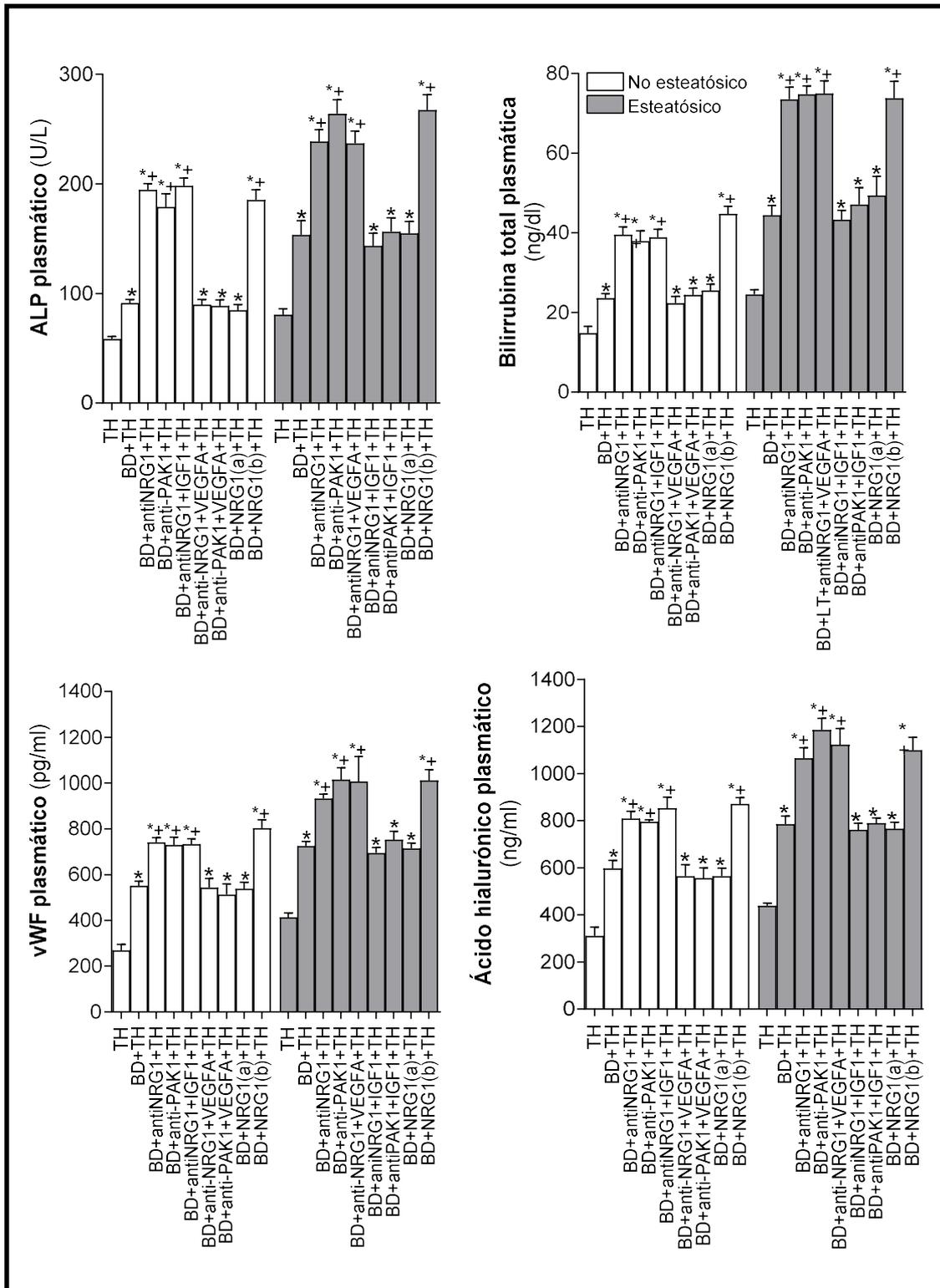


Figura 21. La relevancia de NRG1 en el daño hepático en TH con injertos esteatósicos y no esteatósicos de DBDs en un modelo de obesidad inducida genéticamente. Niveles de ALP, bilirrubina total, vWF y HA en plasma. * p < 0.05 vs. TH; + p < 0.05 vs. BD+TH.

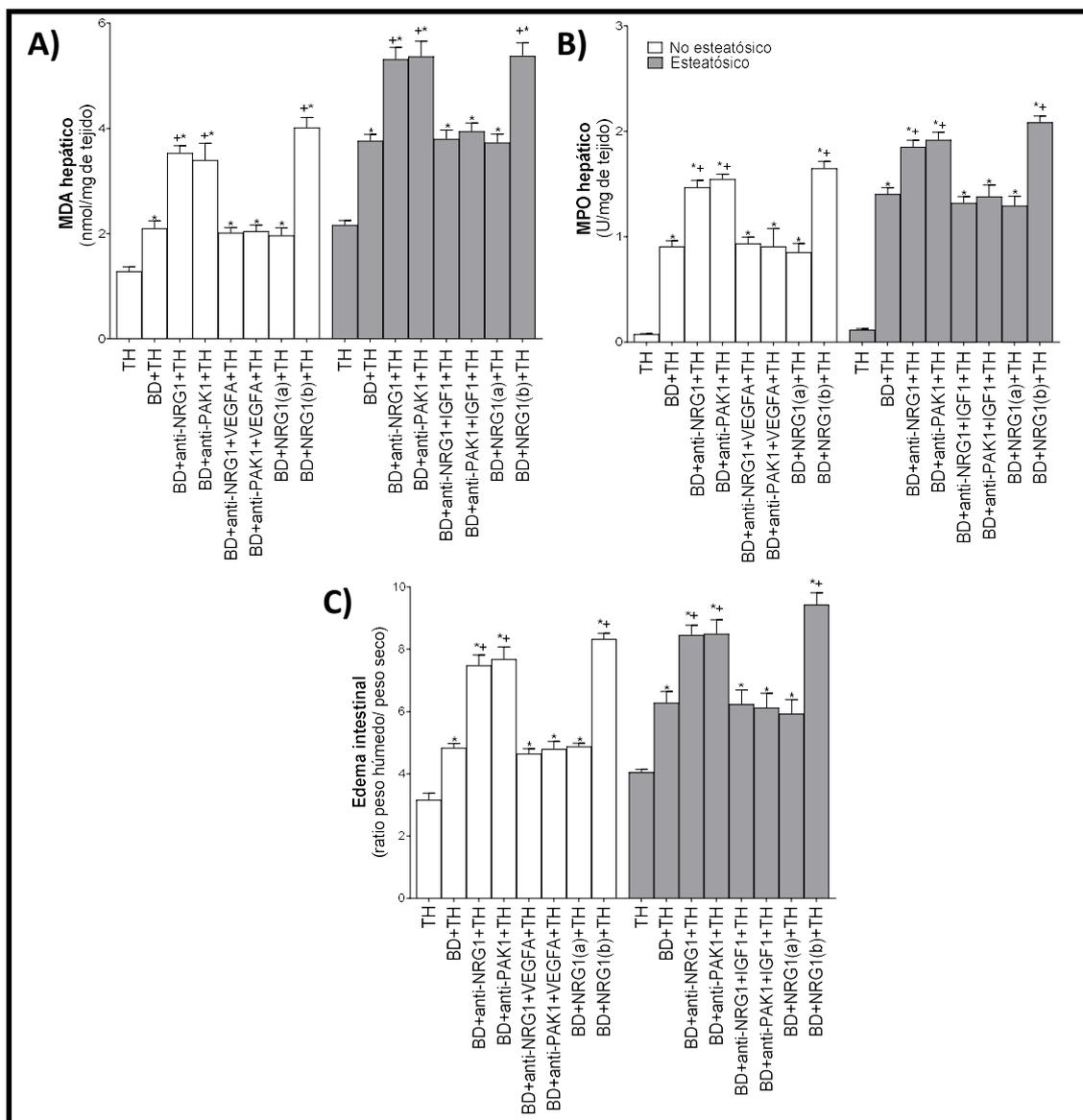


Figura 22. Relevancia de NRG1 en la inflamación en TH con injertos esteatósicos y no esteatósicos de DBDs en un modelo de obesidad inducida genéticamente. (A) Niveles de MDA en tejido hepático como índice de estrés oxidativo; (B) Niveles de MPO en tejido hepático como parámetro de acumulación de neutrófilos y (C) edema hepático.

* $p < 0.05$ vs. TH; † $p < 0.05$ vs. BD+TH.

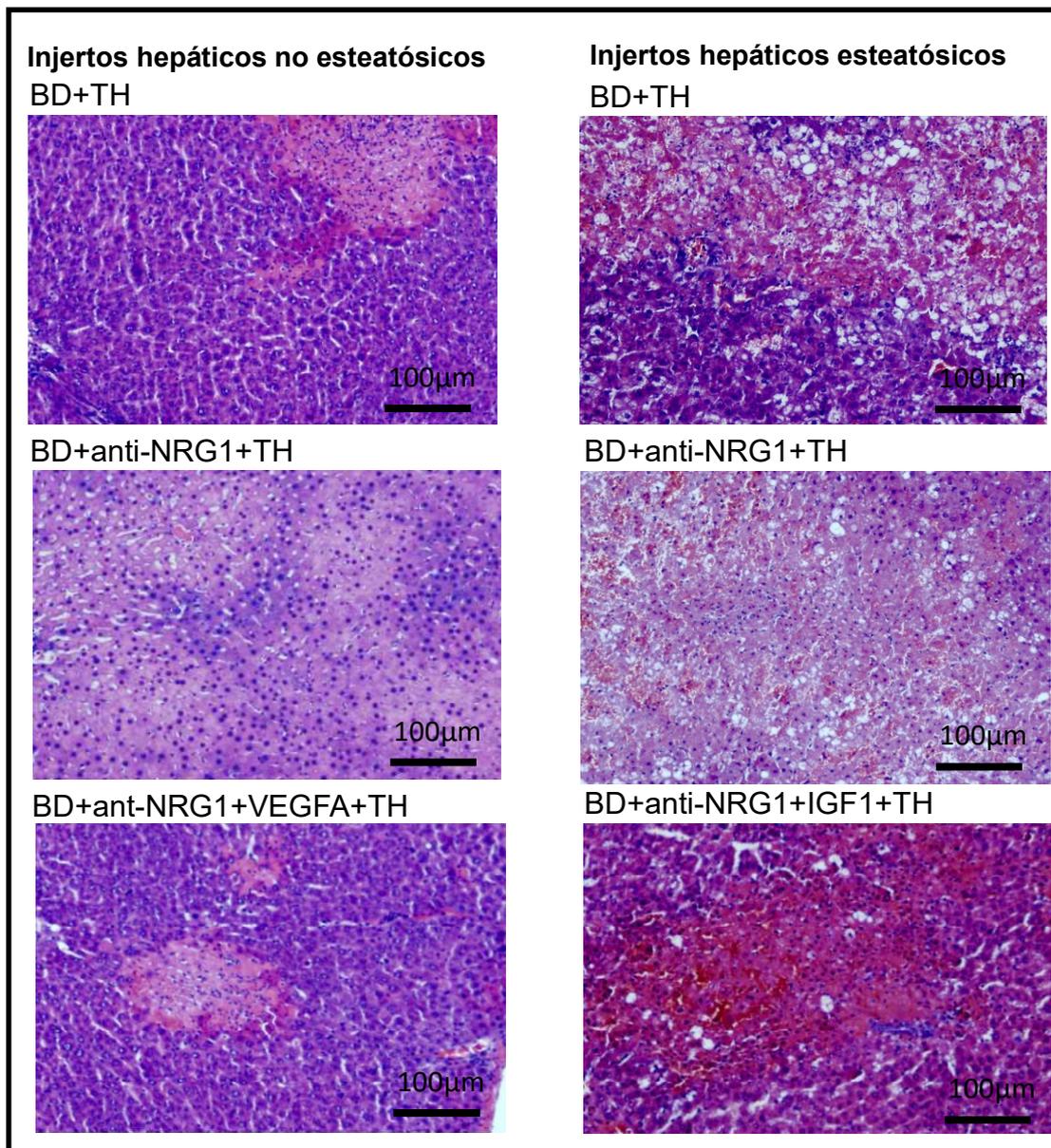


Figura 23. Imágenes representativas de cambios histológicos en TH con injertos esteatóticos y no esteatóticos de DBDs en un modelo de obesidad inducida genéticamente. (4×).

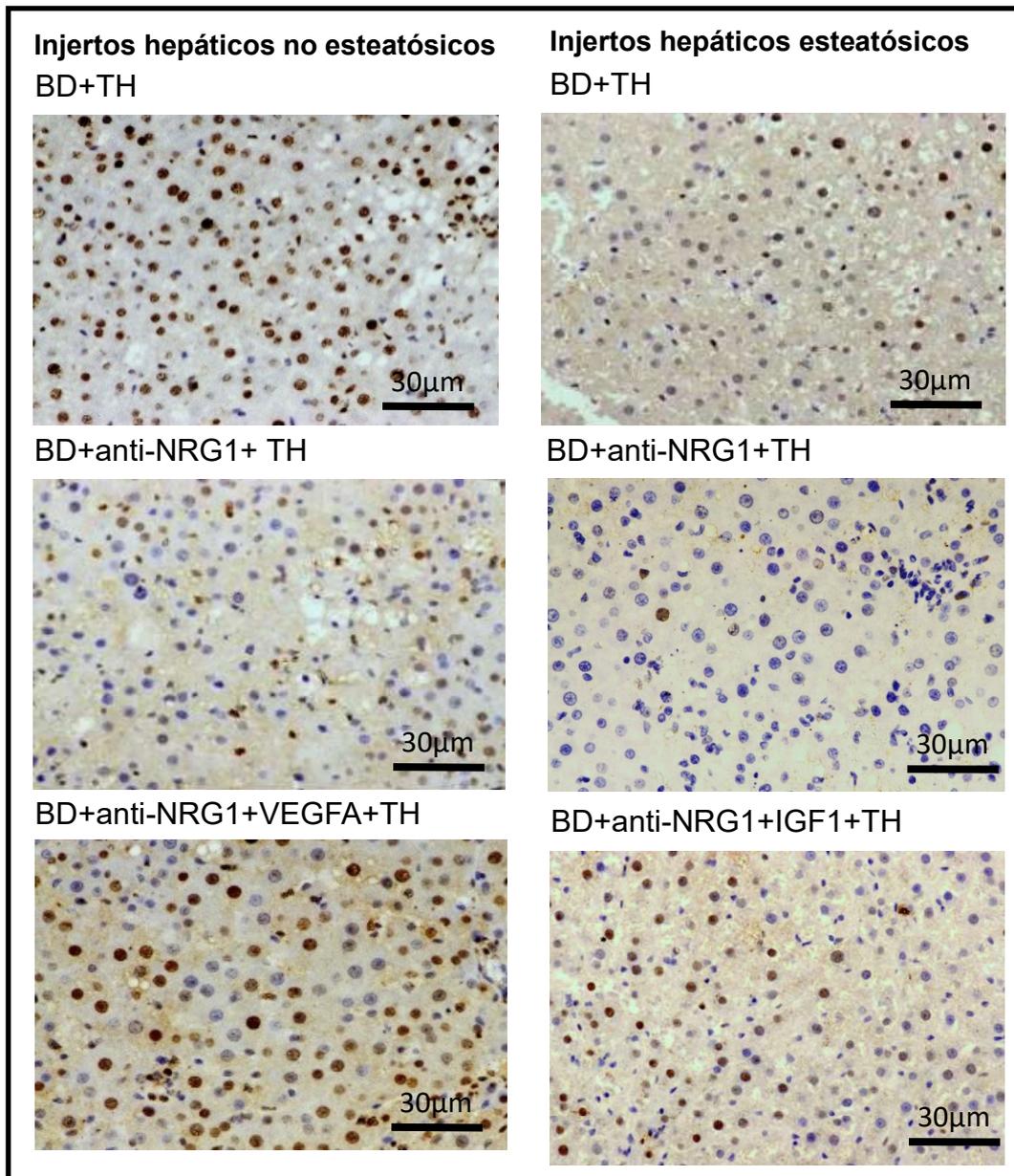


Figura 24. Imágenes representativas de células positivas para PCNA en TH con injertos esteatósicos y no esteatósicos de DBDs en un modelo de obesidad genética. (20x).

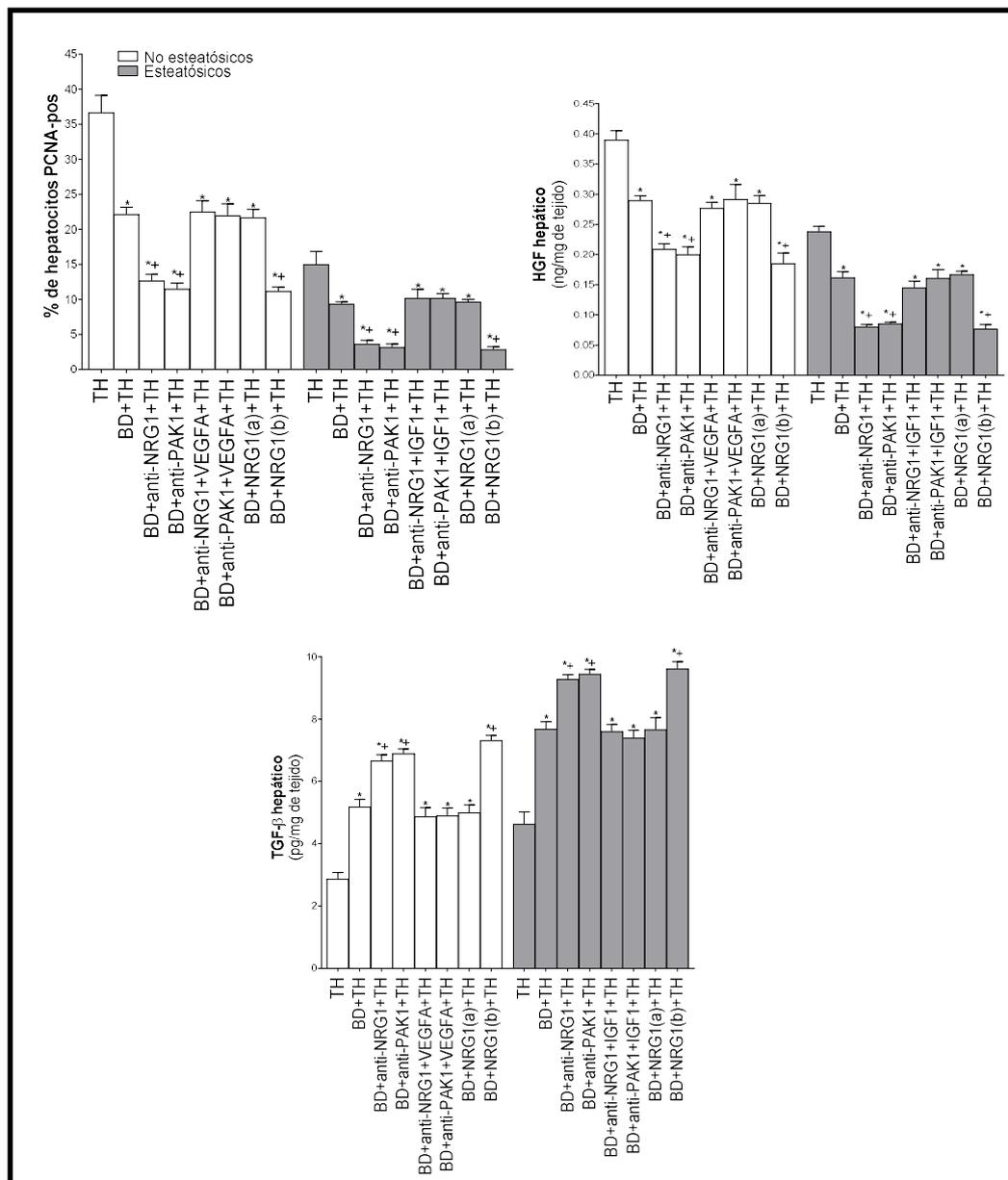


Figura 25. Relevancia de NRG1 en el fallo regenerativo en el TH con hígados esteatósicos y no esteatósicos de DBDs en un modelo de obesidad genética. Hepatocitos positivos para PCNA en los injertos de hígado, niveles de HGF y TGF-β en tejido hepático. * p < 0.05 vs. TH; + p < 0.05 vs. BD + TH.

Se propuso investigar si la vía de señalización NRG1-PAK1 endógena ejerce sus efectos a través de VEGFA/IGF1 ya que los resultados anteriores reflejaron un aumento en la lesión y el fallo regenerativo en los grupos BD + anti-NRG1 + TH y BD + anti-PAK1 + TH, y tales resultados fueron asociados con una disminución en los niveles de VEGFA e IGF1 en hígados no esteatósicos y esteatósicos respectivamente. Se administró VEGFA a ratas con hígados no esteatósicos después de la inhibición farmacológica de la vía NRG1-PAK1 (grupos BD + anti-NRG1 + VEGFA + TH y BD + anti-PAK1 + VEGFA + TH), así como IGF1 exógeno a aquellos con hígados esteatósicos después de la inhibición farmacológica de la vía NRG1-PAK1 (grupos BD + anti-NRG1 + IGF1 + TH y BD + anti-PAK1 + IGF1 + TH). En estas condiciones, los parámetros de lesión hepática (transaminasas, grado de lesión hepática, ALP, bilirrubina total, vWF y HA Figura 20 y Figura 21) e inflamación (MDA, MPO y edema, Figura 22) se redujeron y la regeneración hepática (hepatocitos PCNA+, HGF y TGF- β , Figura 24 y Figura 25) mejoró significativamente en comparación con los grupos experimentales en los cuales se inhibieron la acción de NRG1 o PAK1 (grupos BD + anti-NRG1 + TH y BD + anti-PAK1 + TH), resultando en parámetros de lesión y regeneración similares a los del grupo BD + TH tanto en hígados no esteatósicos como esteatósicos.

Como control, se trataron hígados no esteatósicos y esteatósicos sometidos a la inhibición farmacológica de NRG1 con IGF1 (grupo BD + anti-NRG1 + IGF1 + TH) y con VEGFA respectivamente (grupo BD + anti-NRG1 + VEGFA + TH). Como se esperaba, los parámetros de daño hepático en los injertos no esteatósicos del grupo BD + anti-NRG1 + IGF1 + TH y en los injertos esteatósicos del grupo BD + anti-NRG1 + VEGFA + TH fueron similares a los del grupo BD + anti-NRG1 + TH correspondiente (Figura 20 y Figura 21).

Dado que los resultados demostraron los beneficios del NRG1 endógeno en el TH con hígados esteatósicos y no esteatósicos procedentes de DBDs, evaluamos si el tratamiento con NRG1 exógeno podría potenciar los efectos inducidos por el NRG1 endógeno en la lesión hepática, inflamación y respuesta regenerativa en ambos tipos de hígados. No obstante, el tratamiento con NRG1 exógeno a una dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (grupo BD + NRG1(a) + TH) resultó en parámetros compatibles con la lesión hepática (transaminasas, grado de lesión hepática, ALP, bilirrubina total, vWF y niveles de HA,

Figura 20 y Figura 21), inflamación (MDA, MPO y edema, Figura 22) y proliferación celular (hepatocitos PCNA+, HGF y TGF- β , Figura 24 y Figura 25) iguales a los del grupo BD + TH. La falta de efectividad del NRG1 exógeno para aliviar el daño hepático, la inflamación y el fallo regenerativo en el TH independientemente del tipo de injerto se confirmó al administrar una dosis más alta de NRG1. Al aumentar la dosis administrada (grupo BD + NRG1(b) + TH), se observó más daño y un incremento aún mayor del fallo regenerativo con respecto el grupo BD + TH (Figura 20, Figura 21, Figura 22 y Figura 25).

Adicionalmente, en el estudio se pretendió evaluar si la BD por si misma o la obesidad contribuían al aumento en los niveles de NRG1. Los resultados indicaron que, en hígados esteatósicos y no esteatósicos, los niveles de NRG1 fueron similares en el grupo Sham, el grupo pre-TH y el grupo TH. Sin embargo, los niveles de NRG1 en tejido hepático en el grupo BD aumentaron en comparación con el grupo Sham. Dichos aumentos en los niveles de NRG1 hepático permanecieron tras la isquemia fría (grupo BD + CI). Además, los niveles de NRG1 en hígados esteatósicos en todos los grupos experimentales analizados no fueron diferentes a los niveles de NRG1 observados en sus respectivos grupos análogos no esteatósicos (Figura 26). Estos resultados indicaron que la BD aumenta los niveles de NRG1 en el hígado antes someter a los injertos hepáticos a trasplante, y que la obesidad no contribuye al aumento en los niveles de NRG1 observados en hígados trasplantados.

Una vez establecido que la BD por sí misma es el evento principal que induce un aumento en NRG1 en el contexto del TH, se evaluó dónde se podría sintetizar el NRG1. Así pues, se cuantificaron los niveles de NRG1 plasmático y hepático en diferentes momentos después de la inducción de la BD. Los resultados mostraron que, en ambos tipos de hígados, después de la inducción de la BD, los aumentos en NRG1 se observaron primero en la circulación y más tarde en el hígado. De acuerdo con estos resultados, a las 6 horas después de la inducción de BD, observamos aumentos en NRG1 tanto en la circulación como en el hígado, mientras que en tiempos tempranos (a los 10 minutos o 1 hora después de la inducción de la BD), los aumentos en los niveles de NRG1 solo se observaron en la circulación (Figura 26). Así pues, estos datos indicaron que en las primeras horas después de la inducción de la BD, el tejido

hepático no es la fuente de NRG1, sino que el hígado capta dicho mediador del torrente circulatorio.

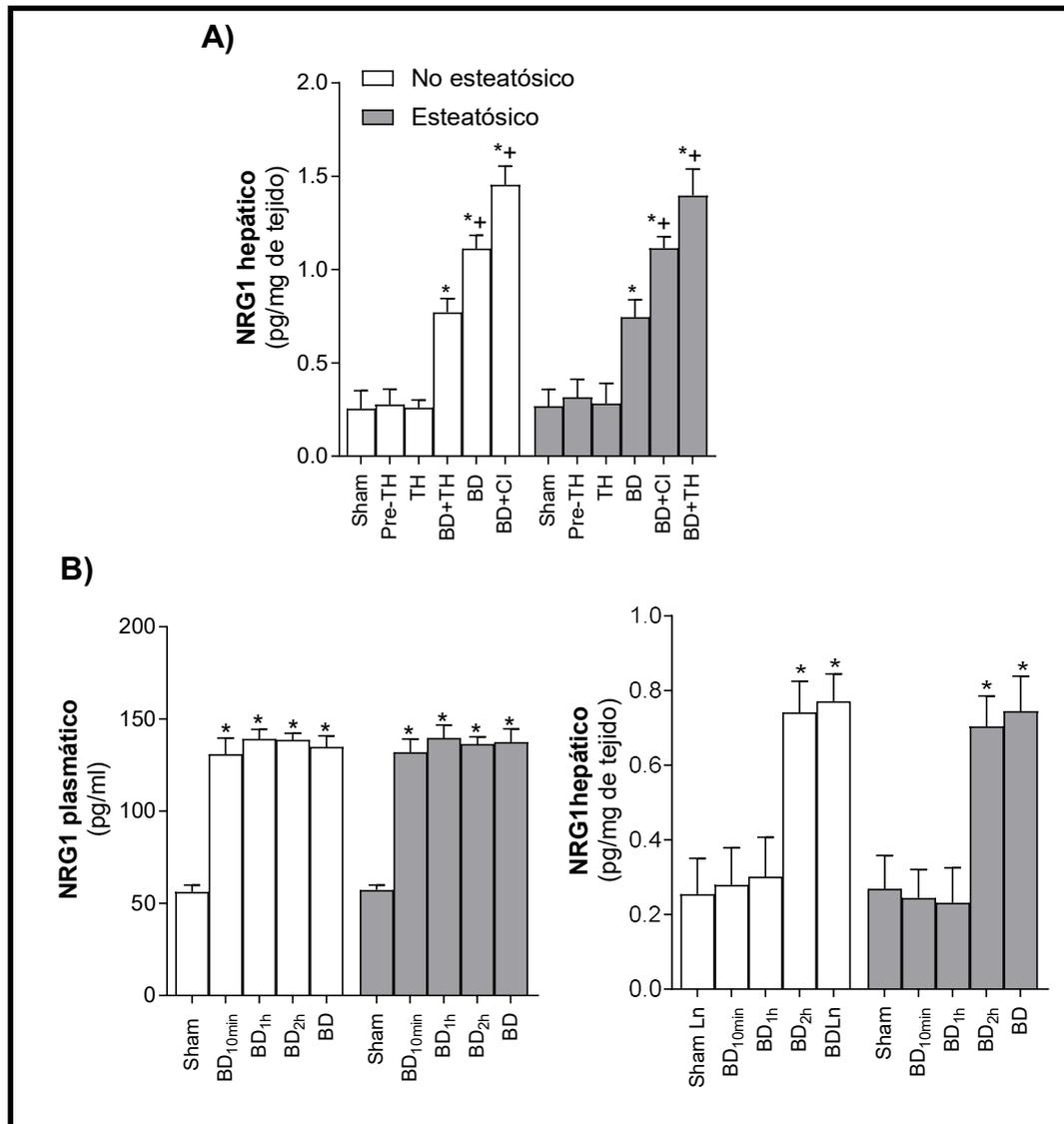


Figura 26. Origen de NRG1 en el TH de DBDs en un modelo de obesidad inducida genéticamente. (A) Niveles de NRG1 en hígados esteatósicos y no esteatósicos. (B) Niveles de NRG1 en plasma e hígado a los 10 minutos, 2 y 6 horas después de la inducción de BD. *P < 0.05 vs a Sham; +P < 0.05 vs a TH.

Los resultados del presente estudio, indicaron que conforme avanza el proceso de BD, se desencadena un proceso en ambos tipos de hígado con el objetivo de mantener los niveles de NRG1 elevados. Esto se observa en los injertos de donantes de BD después de la CI (BD + CI), así como a las 4 horas después del TH (grupo BD + TH). Además, se observó que los aumentos en NRG1 hepático son más evidentes en los injertos procedentes de donantes con BD sometidos a CI antes de su implantación en el receptor (BD + CI), que en los injertos hepáticos después de 6 horas de BD sin CI (grupo BD). En las condiciones experimentales descritas para el grupo BD + CI, el hígado se encuentra aislado y no se ve influenciado por la circulación ni por la acción de otros órganos; por ende, este hecho demuestra que el hígado por sí mismo es capaz de producir NRG1 en dichas condiciones. Esto también es respaldado por los resultados observados en el grupo BD + TH (a las 4 horas después del TH), ya que en este grupo los niveles de NRG1 están aumentados tanto en la circulación como en el hígado, en comparación con los niveles observados en el grupo BD + CI. En el grupo BD + TH, no se sometió al receptor a un proceso de BD, por lo que se puede concluir que NRG1 deriva del hígado (Figura 26). Por lo tanto, se deduce que NRG1 incrementa sus niveles en los injertos hepáticos esteatósicos y no esteatósicos que han experimentado tanto los efectos perjudiciales de la BD como de la CI. En resumen, la BD activa vías de señalización en ambos tipos de hígado, las cuales generan NRG1 y aumentan sus niveles durante varias etapas que tienen lugar en el proceso de TH.

2.2. Papel de NRG1 en injertos esteatósicos y no esteatósicos sometidos a TH procedentes de DBDs en un modelo de obesidad inducida nutricionalmente

Los resultados indicaron que, de igual manera que el modelo de esteatosis inducido genéticamente (Figura 21), en el modelo de esteatosis inducida nutricionalmente se evidenció un aumento en los niveles de ALP, bilirrubina, vWF y HA tanto en injertos esteatósicos como en no esteatósicos en el grupo BD + TH en comparación con los resultados del grupo TH (Figura 27). La inhibición de NRG1 o PAK1 (BD + anti-NRG1 + TH y BD + anti-PAK1 + TH) incrementó todavía más los niveles de dichos marcadores en comparación con el grupo BD + TH en ambos tipos de hígados (Figura 27). Se administró VEGFA exógeno a ratas Wistar Ln con hígados no

esteatósicos e IGF1 exógeno a ratas Wistar Ob con hígados esteatósicos después de la inhibición de la vía NRG1-PAK1 (grupos BD + anti-NRG1 + VEGFA + TH y BD + anti-PAK1 + VEGFA + TH o BD + anti-NRG1 + IGF1 + TH y BD + anti-PAK1 + IGF1 + TH). Los niveles de ALP, bilirrubina, vWF y HA disminuyeron en comparación con los grupos en los que se inhibieron los efectos de NRG1 o PAK1 (grupos BD + anti-NRG1 + TH y BD + anti-PAK1 + TH), resultando en parámetros similares a los del grupo BD + TH (Figura 27).

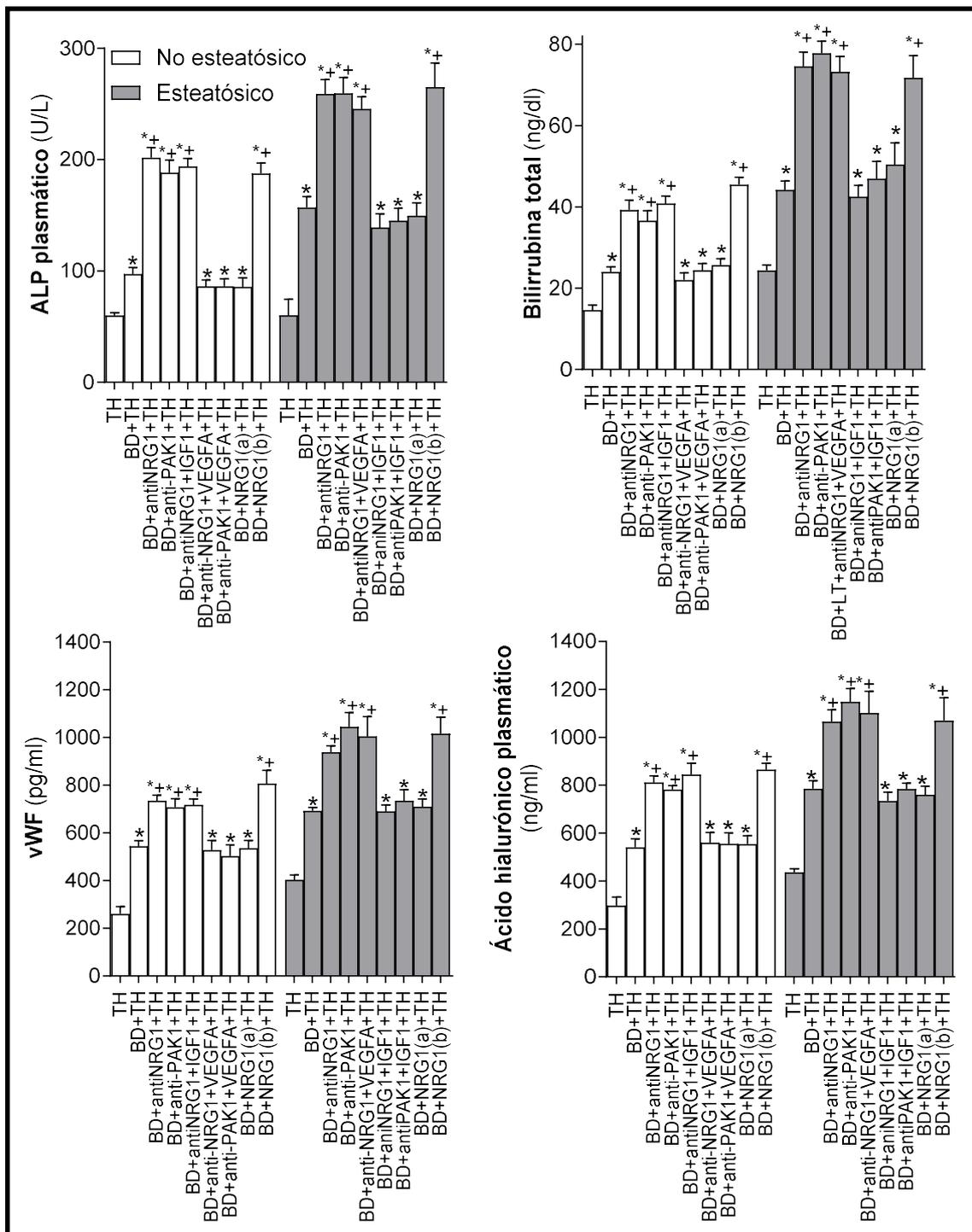


Figura 27. Relevancia del NRG1 en la funcionalidad hepática y el daño endotelial en el TH con injertos esteatósicos y no esteatósicos de DBDs en un modelo de obesidad inducida nutricionalmente. ALP, bilirrubina total, vWF, y HA en plasma. *p<0.05 vs T; +p<0.05 vs BD +TH.

3. ESTUDIO 3: RELEVANCIA DEL EJE GH-VEGFB/VEGFA EN INJERTOS HEPÁTICOS PROCEDENTES DE DONANTES CON MUERTE CEREBRAL CON ENFERMEDAD HEPÁTICA RELACIONADA CON EL CONSUMO DE ALCOHOL

3.1. Validación del modelo de ALD

Se evaluó la esteatosis (mediante tinción con Red Oil) y la fibrosis (mediante tinción con Sirius Red y niveles de colágeno-I y α -SMA). Se detectaron niveles de esteatosis (<30% de esteatosis) y un aumento en los marcadores de fibrosis en el tejido hepático (Figura 28).

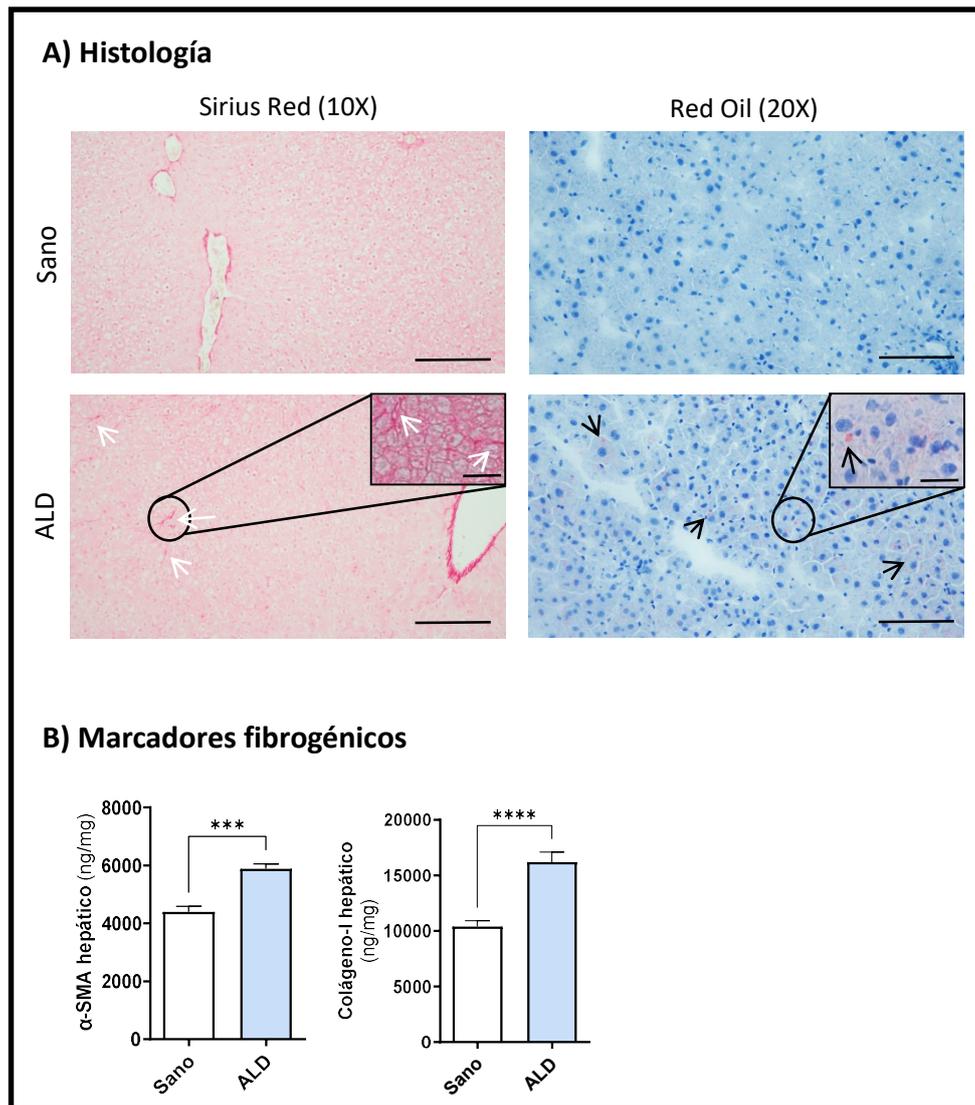


Figura 28. Cortes histológicos de hígado y biomarcadores de fibrosis para el modelo ALD. (A) Fotografías de cambios histológicos en secciones de hígado de ratas sanas y ALD de: fibras de colágeno I (flechas blancas) con tinción Sirius Red a 10X y 20X en la imagen ampliada (la barra de escala de las imágenes a 10X corresponde a 200 μ m y la barra de escala de la imagen a 20X corresponde a 50 μ m); gotas de lípidos (flechas negras) con tinción de Red Oil a 20X y 40X en la imagen ampliada (la barra de escala de las imágenes a 20X corresponde a 100 μ m y la barra de escala de la imagen de 40X corresponde a 25 μ m). **(B)** Niveles de α -SMA y colágeno-I en tejido hepático. **** p <0,0001 y *** p <0,001.

3.2. La vía GH-VEGFB/VEGFA en DBDs con ALD

Inicialmente, se determinaron los niveles de GH y sus efectos sobre VEGFB y VEGFA en injertos hepáticos después de la inducción de la BD antes de la extracción del injerto. No se observaron diferencias significativas en relación a los niveles proteicos ni de GH ni de VEGFA/VEGFB entre los diferentes grupos analizados (tratados o no con GH o VEGFA/VEGFB) (Figura 29A). De esta forma, nuestros resultados indicaron que la administración exógena de GH, VEGFB o VEGFA no llegó al hígado. De hecho, los niveles hepáticos de GH en el grupo BD + GH fueron similares a los del grupo BD. Del mismo modo, los niveles hepáticos de VEGFB o VEGFA después de su administración exógena (grupos BD + VEGFB y BD + VEGFA) fueron similares a los del grupo BD (Figura 29A).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, y debido a la importancia que tiene el eje intestino-hígado en diferentes desórdenes hepáticos que cursan con inflamación, evaluamos los niveles de GH, VEGFB y VEGFA en el tejido intestinal de los DBDs después de las 3 horas de muerte cerebral. Se observó un aumento en los niveles de GH intestinal después de la administración de GH (grupo BD + GH) (Figura 29B). Dicho aumento se asoció con un incremento en la expresión de proteínas y ARNm de VEGFB y VEGFA (Figuras 29C), lo que indica la producción de VEGFB y VEGFA por parte del intestino promovida por la administración de GH. Finalmente, se detectaron también un aumento en los niveles proteicos de VEGFB y VEGFA en el intestino después de su administración exógena (Figura 29B). Así pues, estos resultados indican que todos los factores (GH, VEGFB y VEGFA) son captados por el intestino (pero no por el hígado) después de su administración exógena.

Para descartar una potencial co-regulación entre VEGFB y VEGFA, se evaluaron los niveles de VEGFB y VEGFA en el hígado e intestino. Observando los resultados obtenidos, este no fue el caso. De hecho, los niveles de VEGFB fueron similares entre los grupos BD y BD + VEGFA, y los niveles de VEGFA fueron similares entre los grupos BD y BD + VEGFB (Figuras 29A y 29B).

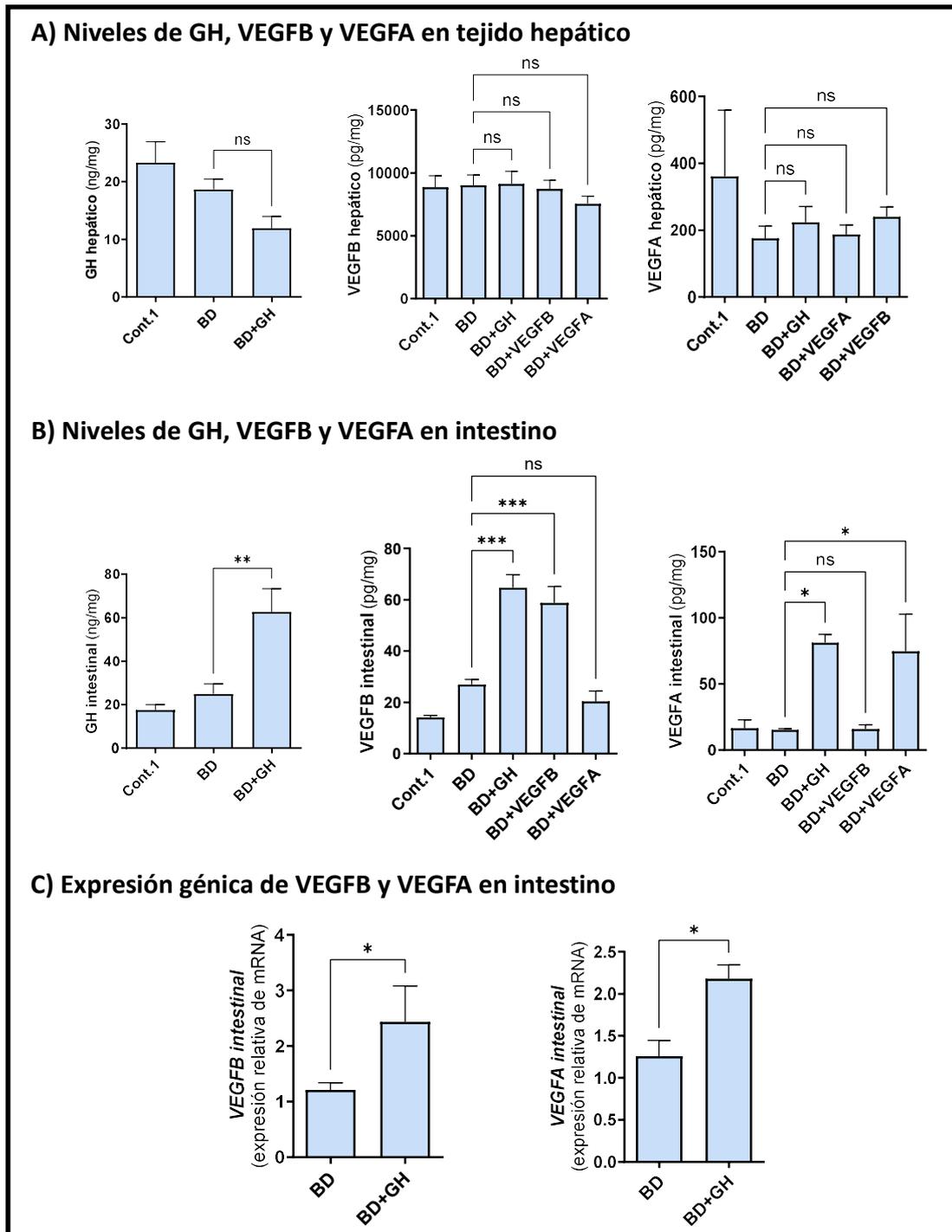


Figura 29. Vía GH-VEGFB/VEGFA en DBDs con ALD. (A) Niveles de proteínas de GH, VEGFB y VEGFA en tejido hepático. **(B)** Niveles de proteínas de GH, VEGFB y VEGFA en tejido intestinal. **(C)** Expresión relativa de ARNm de VEGFB y VEGFA en el intestino. **** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ y ns=sin significancia.

3.3. Relevancia de la vía GH-VEGFB/VEGFA en DBDs con ALD antes de la extracción del injerto del donante

En este estudio se evaluó el papel desempeñado por la GH y sus efectores VEGFB y VEGFA en DBDs con ALD, analizando sus efectos sobre el daño hepático, la inflamación, el estrés oxidativo, la regeneración, la muerte celular y los biomarcadores del metabolismo energético celular antes de la extracción del injerto hepático del donante.

Nuestros resultados indicaron una disminución en todos los parámetros de daño hepático (AST, ALT y grado de lesión hepática) después de la administración exógena de GH, VEGFB o VEGFA (Figura 30). Además, la administración concomitante de GH recombinante y anti-VEGFR1 (un anticuerpo frente al receptor de VEGFB) protegió a los hígados con ALD de los efectos nocivos inducidos por la BD (Figura 30). No obstante, cuando administramos GH junto a los inhibidores de ambos receptores VEGFR1 y VEGFR2 (BD + GH + anti-VEGFR1 + anti-VEGFR2), los marcadores de daño hepático incrementaron hasta llegar a valores similares a los del grupo BD.

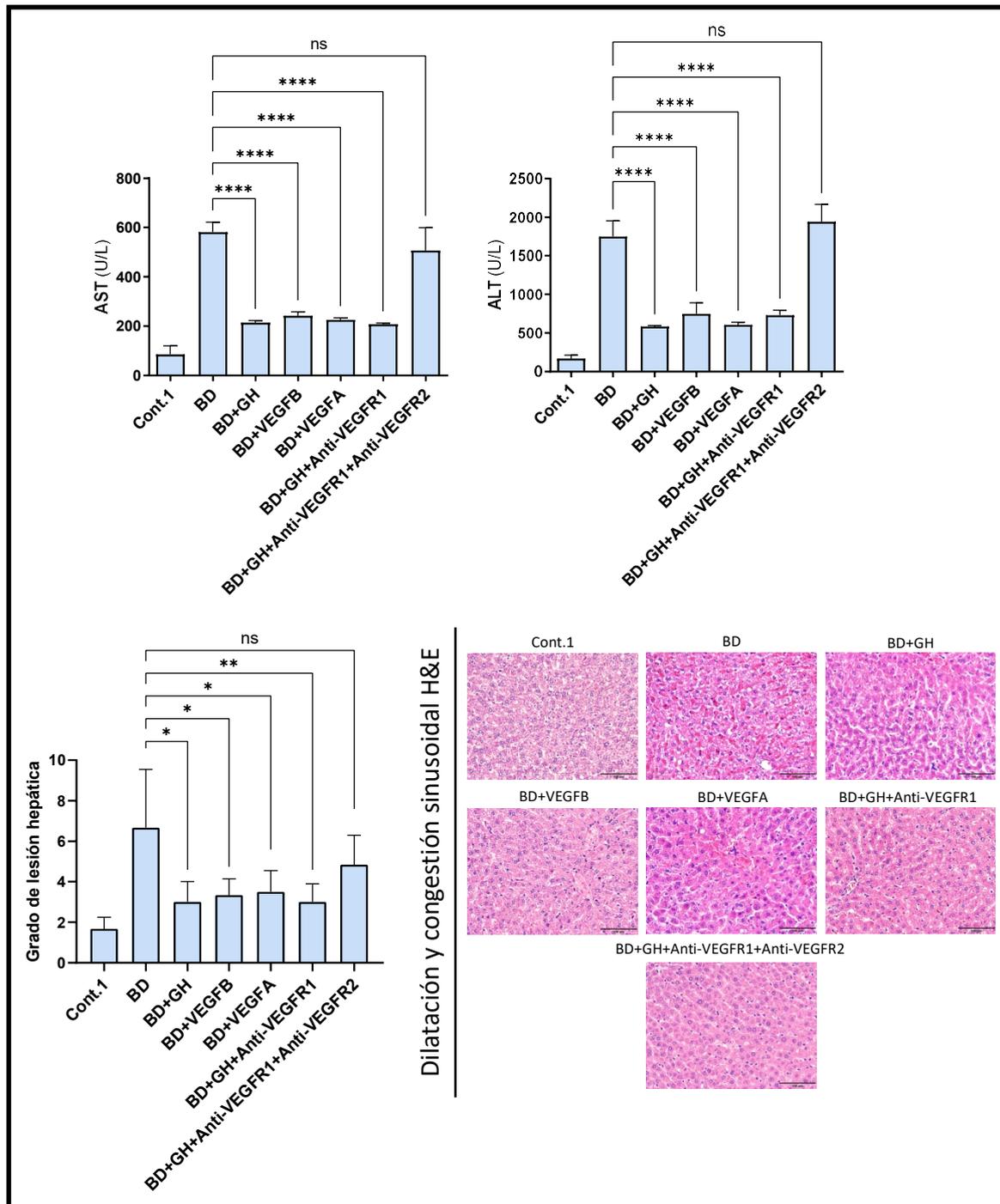


Figura 30. Relevancia del eje GH-VEGFB/VEGFA en el daño hepático en DBDs con ALD. (A) Los niveles de AST y ALT en plasma y grado de lesión hepática con fotomicrografías representativas de dilatación y congestión sinusoidal (20X) (la barra corresponde a 100 μm). **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ y ns=no significativo.

También se analizaron parámetros de inflamación (MDA, IL-1 β e IL-10). Los niveles de MDA siguieron un patrón similar a los del daño hepático: se observó una disminución de los niveles de MDA tras el tratamiento con GH, VEGFB, VEGFA y GH + anti-VEGFR1, mientras que los beneficios de la GH desaparecieron cuando se inhibieron al mismo tiempo los receptores VEGFR1 y VEGFR2 (BD+GH+anti-VEGFR1+anti-VEGFR2) (Figura 31A). Teniendo en cuenta los posibles efectos inflamatorios de la IL-1 β , también se evaluaron sus niveles y, a pesar de que no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos beneficiosos y el grupo BD, se detectó un notable incremento en los niveles hepáticos de IL-1 β en el grupo BD tratado con GH, anti- VEGFR1 y anti-VEGFR2 (BD + GH + anti-VEGFR1 + anti-VEGFR2), lo cual contribuye a explicar los efectos perjudiciales sobre la lesión hepática observada cuando la GH se administra conjuntamente con anti- VEGFR1 y anti-VEGFR2 (Figura 31A). Posteriormente, evaluamos los posibles efectos antiinflamatorios de la vía estudiada. Se detectó un aumento significativo de IL-10 en aquellos grupos que protegían frente al daño hepático (GH, VEGFB, VEGFA y GH + anti-VEGFR1), mientras que los niveles de IL-10 hepática en el grupo BD + GH + anti-VEGFR1 + anti-VEGFR2 fueron similares a los del grupo BD (Figura 31A).

Posteriormente, se analizaron algunos parámetros relacionados con el metabolismo energético (ATP y lactato) en hígados con ALD procedentes de DBDs. Los resultados indicaron que los tratamientos efectivos parecían promover la glucólisis anaeróbica para aumentar los niveles de ATP. De hecho, los niveles elevados de lactato en hígado se relacionaron directamente con los niveles elevados de ATP en los grupos BD + GH, BD + VEGFB, BD + VEGFA y BD + GH + anti-VEGFR1 en comparación con los resultados del grupo BD (Figura 31B). Sin embargo, los niveles de ATP y lactato fueron similares en los grupos BD + GH + anti-VEGFR1 + anti-VEGFR2 y BD.

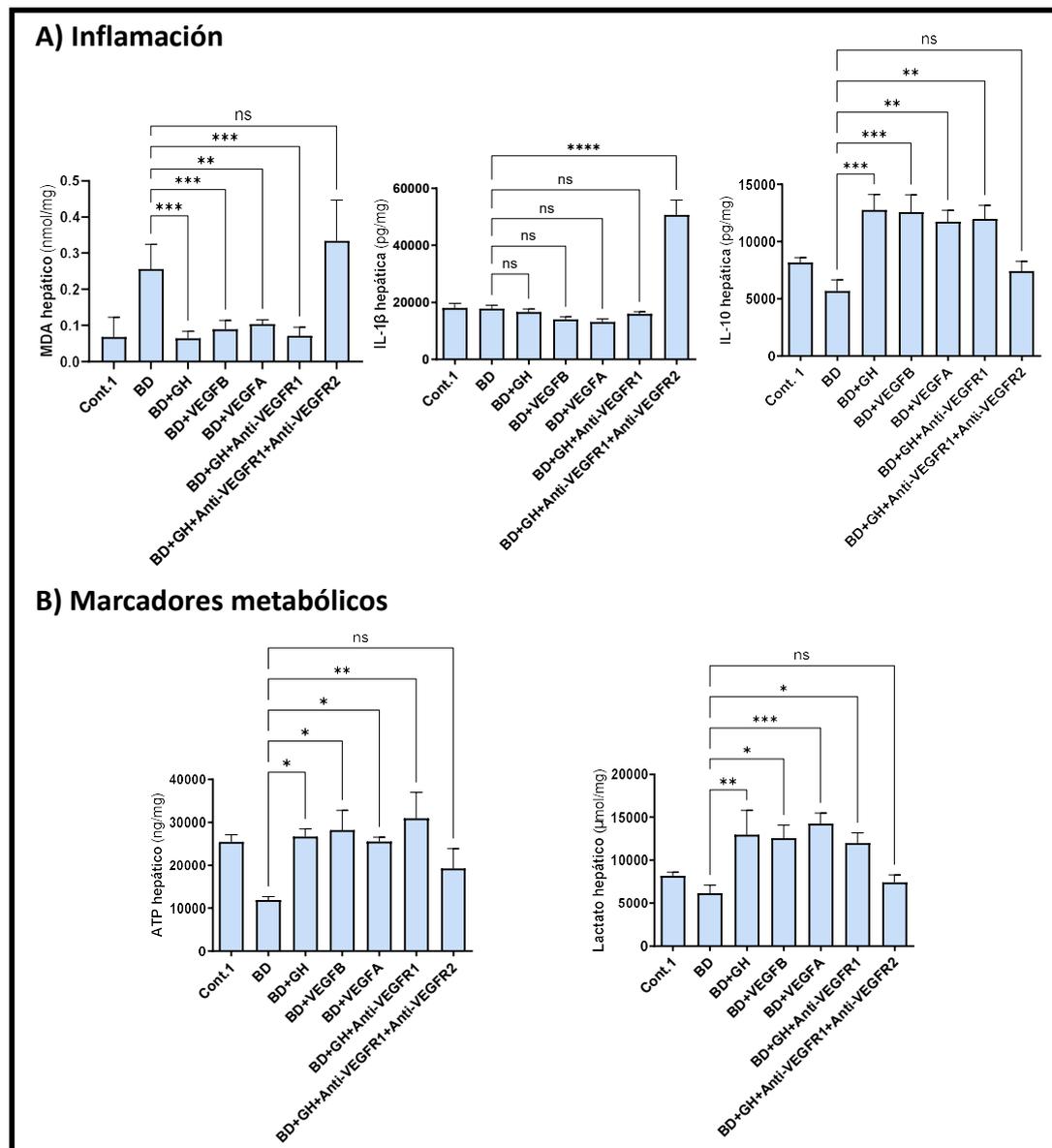
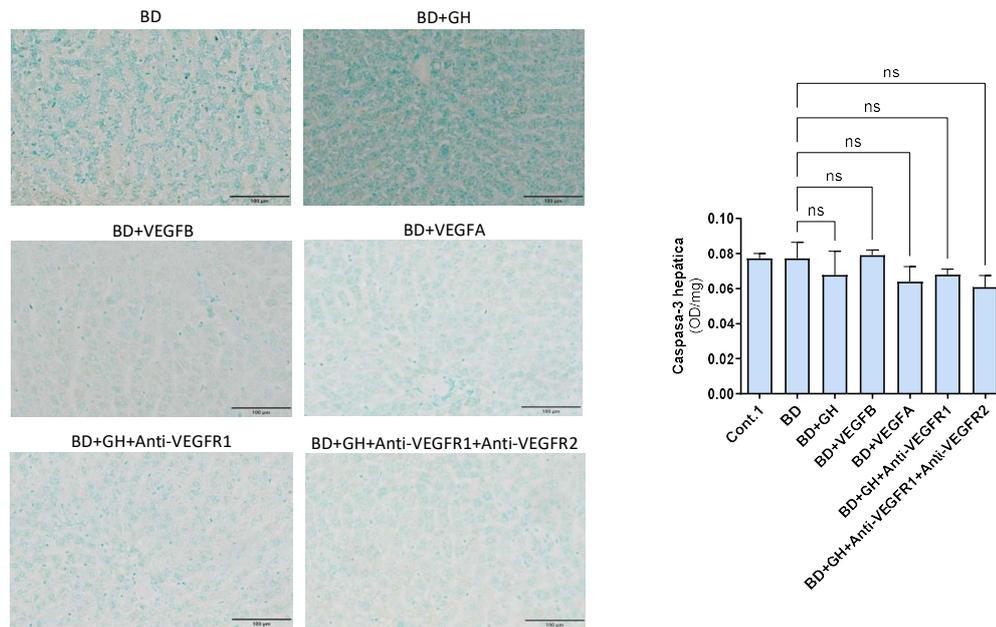


Figura 31. Relevancia del eje GH-VEGFB/VEGFA en la inflamación y función metabólica en DBDs con ALD. (A) Niveles hepáticos de MDA, IL-1 β e IL-10. (B) Niveles hepáticos de ATP y lactato. ** p <0,0001, *** p <0,001, ** p <0,01; * p <0,05 y ns=no significativo.**

Por último, se evaluó la actividad apoptótica y la regeneración hepática. Para determinar la muerte celular por apoptosis se evaluó la actividad de la caspasa-3. No se detectaron diferencias significativas entre los diferentes grupos (Figura 32). Para confirmar que los efectos de la GH y VEGFA/VEGFB sobre la lesión hepática no cursa por cambios en la apoptosis, se evaluaron secciones de hígado teñidas con un kit de TUNEL y no se detectaron diferencias entre los grupos en el número de células apoptóticas (Figura 32). Estos datos sugirieron que el mecanismo celular de muerte por apoptosis no juega un papel relevante en las condiciones experimentales del presente estudio. En cuanto a la capacidad del eje GH-VEGFB/VEGFA sobre la regeneración hepática, se analizaron los niveles de Ki-67 en el hígado. En los grupos BD + GH, BD + VEGFB, BD + VEGFA y BD + GH + anti-VEGFR1 hubo un aumento de los niveles de Ki-67 en estos hígados en comparación con los niveles observados en el grupo BD. La administración de GH con anti-VEGFR1 y anti-VEGFR2 (BD + GH + anti-VEGFR1 + anti-VEGFR2) causó una disminución en los niveles de Ki-67 hasta niveles equiparables a los observados en el grupo BD (Figura 32).

A) Actividad apoptótica (TUNEL por análisis histológico y niveles de caspasa 3)



B) Regeneración hepática

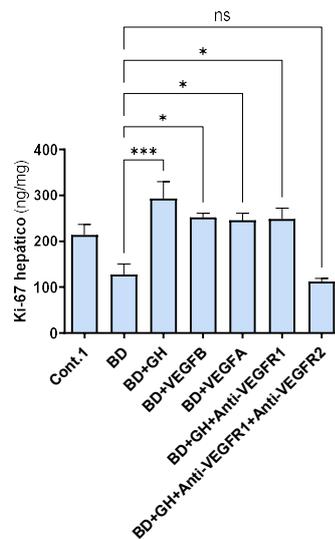


Figura 32. Relevancia del eje GH-VEGFB/VEGFA en la muerte celular y la regeneración en DBDs con ALD. (A) Secciones teñidas con TUNEL (20X) para detectar células apoptóticas (la barra corresponde a 100 μ m) y niveles hepáticos de caspasa-3. **(B)** Niveles hepáticos del biomarcador de proliferación Ki-67., ***p<0,001; *p<0,05 y ns=no significativo.

Discusión

DISCUSIÓN

En la actualidad, los datos indican que el 70-80% de los donantes hepáticos provienen de donantes cadavéricos con muerte cerebral (Kwong et al. 2023; ONT 2023). Está bien reportado que la BD reduce la tolerancia de estos injertos a la lesión por I/R reduciendo tanto la calidad del injerto como la supervivencia del receptor (Lascaris et al. 2022; Terrault et al. 2023). Los incrementos en las listas de espera para trasplante han llevado a muchos centros a utilizar como injertos hígados hasta el momento considerados no aptos, o lo que es lo mismo hígados procedentes de donantes con criterio extendido entre los que encontramos los hígados esteatósicos, y especialmente aquellos con infiltración grasa moderada o severa. La esteatosis se ha convertido en una condición cada vez más prevalente en la sociedad debido a muchos factores entre los que encontramos la dieta o el aumento del sedentarismo (Younossi et al. 2018). Estudios recientes estiman que alrededor del 50% de los injertos de donantes con BD tienen cierto grado de esteatosis (Reis-Júnior et al. 2019) y hay estudios que describen que su incidencia puede llegar a ser de más del 70% en la población con problemas de índole metabólico (Hardy et al. 2016). En relación a la esteatosis y el TH, se conoce que es una de las variables más importantes en la predicción del éxito de la cirugía de trasplante y una de las principales causas de rechazo de injertos candidatos a ser trasplantados (Jiménez-Castro et al. 2015). Una de las causas de la esteatosis hepática es también el consumo abusivo de alcohol. Se estima que este causa unas 3 millones de muertes anuales a nivel mundial y es el causante de las patologías que se engloban dentro del área de las ALD (X. Wu et al. 2023). Como se ha desarrollado detalladamente en la sección de Introducción de la presente Tesis Doctoral, la ONT estima en sus últimos datos que uno de cada cuatro injertos proceden de donantes que consumen alcohol habitualmente, y establece una relación directamente proporcional entre la cantidad de alcohol consumido por el donante y la probabilidad de que el injerto no sea considerado apto para trasplante por sus condiciones patológicas (ONT 2023). No obstante, no existe ningún estudio previo que se centre en evaluar los mecanismos fisiopatológicos que expliquen cómo la BD afecta tales injertos hepáticos procedentes de donantes con criterio extendido.

Debido a la importancia clínica y socioeconómica que representa la problemática detallada anteriormente, la presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de nuevas estrategias que pretendan mejorar la calidad de los hígados procedentes de donantes con criterio extendido, así como en el descubrimiento de los mecanismos fisiopatológicos inherentes a las condiciones propias del TH en diferentes tipos de hígados procedentes de donantes con muerte cerebral y criterio extendido.

En primer lugar, se pretendió determinar la relevancia de diferentes tipos de dietas en la lesión hepática por I/R en el TH de donantes con BD. Este interés surge por estudios previos del grupo que demostraron un papel esencial de la dieta alta en glucosa o en lípidos en hígados no esteatósicos en el contexto de la I/R en cirugía hepática de PH donde se observó que la dieta rica en glucosa ejercía beneficios en ambos tipos de hígados después de la cirugía de PH+I/R, mientras que sólo la dieta lipídica beneficiaba a los injertos esteatósicos (Mendes-Braz et al. 2014). Nuestros resultados derivados de la presente Tesis Doctoral contrastan con estos últimos ya que como se ha podido ver en la sección de resultados, en condiciones de TH procedente de DBDs, sólo el tratamiento con emulsión lipídica tendría un efecto protector, y únicamente sobre los hígados esteatósicos. Un factor a tener en cuenta para explicar estas diferencias, son los diferentes procesos quirúrgicos (por ejemplo, la WI asociada a la PH vs. la CI asociada al TH). Esto se debe a que los mecanismos patológicos subyacentes a ambos tipos de isquemia son completamente diferentes (Paterno et al. 2019; Schlegel et al. 2014). Además, la BD no está presente en condiciones de PH bajo I/R. Así pues, en este estudio el principal hallazgo científico y clínicamente relevante es que el tratamiento con emulsión lipídica y no con glucosa es una buena opción terapéutica para hígados esteatósicos bajo condiciones de TH procedente de DBDs.

Los efectos beneficiosos de la emulsión lipídica con respecto a la glucosa podrían ser debidos al hecho de que los lípidos mantienen más eficientemente los niveles de ATP hepático, entre otros factores, lo cual es crucial para sostener funciones homeostáticas. Está reportado que los bajos niveles de ATP después de la reperusión pueden resultar en una menor tolerancia a la lesión por I/R. De la misma forma, aquellas estrategias centradas en incrementar los niveles de ATP podrían estar protegiendo a los hígados grasos frente a la muerte celular por necrosis (Selzner et al.

2003). En este sentido, se conoce que tras exponer al hígado a una situación de estrés y los niveles de ATP en hígado disminuyen, el hígado intenta mantener los niveles de ATP a través de la oxidación de ácidos grasos (Anderson et al. 2002), por lo que, podría ser la razón por la cual la administración de emulsión lipídica potenciaría la formación de ATP. Otro hecho que podría estar explicando la ausencia de efectos beneficiosos de la glucosa en este contexto, sería la β -oxidación de los AGs que componen las gotas lipídicas de los hepatocitos de los injertos esteatósicos. El incremento de la β -oxidación de los AGs hepáticos estaría llevando a la producción de NADH y acetil-coenzima A. Este hecho, estaría reduciendo el potencial redox mitocondrial, impidiendo la entrada del piruvato en el Ciclo de Krebs inhibiendo en última instancia la oxidación de la glucosa (Holeček 1999; Cornide-Petronio et al. 2020). Todo lo mencionado estaría explicando también el mantenimiento en los niveles de glucógeno en estos hígados esteatósicos tratados con emulsiones lipídicas. El hecho de que se incrementasen los niveles de fosfolípidos en tejido hepático esteatósico tras el tratamiento exógeno con las emulsiones lipídicas, sería un factor también a tener en cuenta. Estas sustancias son componentes esenciales de las membranas lipídicas de las células por lo que las emulsiones podrían estar ayudando a mantener la integridad estructural de las células. De hecho, se sabe que ciertos tipos de fosfolípidos podrían estar relacionados con la producción de segundos mensajeros que intervienen en la transducción de señales celulares y en las vías de señalización de las prostaglandinas que tienen un papel relevante en la inhibición de la inflamación y el daño hepático (Cohn et al. 2008; Motegi et al. 2022; Zabielski et al. 2010).

Los datos del presente estudio revelan también que los niveles de los factores de crecimiento como el HGF y el VEGFA fueron más altos en los hígados que fueron tratados con emulsiones lipídicas que aquellos que recibieron tratamiento con glucosa. Es un dato a destacar ya que se conoce que estos factores desempeñan un papel imprescindible en la protección contra el daño hepático por I/R (Doronzo et al. 2013; Sakakura et al. 2000; Sato et al. 2001; Medina et al. 2004) y algunos de ellos están siendo probados en ensayos clínicos en pacientes con insuficiencia hepática (Ido et al. 2011).

Se ha reportado en diversos estudios el papel relevante de la microbiota en el desarrollo de diferentes patologías hepáticas así como en el pronóstico de la cirugía de TH (Micó-Carnero et al. 2020; Cornide-Petronio et al. 2020). Así mismo, está ampliamente descrito el papel del eje intestino-hígado en el contexto de las patologías estudiadas en la presente Tesis Doctoral (Gulfo et al. 2020; Avalos-de León et al. 2019). Se ha reportado también en diversos estudios que la disbiosis intestinal causa alteraciones en numerosos biomarcadores pro-inflamatorios como TLR4, MDA, MPO, IL-1 β o TNF- α (J. Wu et al. 2020; González et al. 2019; K. A. Kim et al. 2012; Maier et al. 2018; Rosser et al. 2014; Sun et al. 2018). Además, esta microbiota podría estar modulando también la producción o actividad de la citocina anti-inflamatoria IL-10 (Mishima et al. 2019; Burrello et al. 2018), así como la función intestinal en tanto en cuanto estaría modificando la permeabilidad intestinal (Micó-Carnero et al. 2020). Subrayar por último la importancia del LPS como uno de los biomarcadores más importantes relacionado con los problemas intestinales así como de endotoxemia (Micó-Carnero et al. 2020). Teniendo en cuenta estos datos expuestos anteriormente así como la importancia de la dieta en la modulación de la microbiota intestinal (Zmora et al. 2019), se decidió estudiar los efectos de la glucosa o las emulsiones lipídicas en dos modelos de obesidad diferente (la obesidad inducida genéticamente y la inducida nutricionalmente) con el objetivo de investigar si ratas obesas con dietas diferentes podían afectar los niveles intestinales de las diferentes ILs evaluadas y la respuesta inflamatoria en general mediante cambios en la microbiota a nivel de intestino. Si esto es así, los efectos derivados se verían reflejados en el hígado. Pese a la importancia de la dieta en el estado del microbioma intestinal, no hubo cambios ni en la inflamación ni en el daño intestinal. De hecho, todos los parámetros mencionados anteriormente que habitualmente se alteran por desequilibrios en la microbiota, no mostraron cambios. Además, tanto en las ratas Zucker como en las Wistar, la administración de glucosa o lípidos indujo diferentes efectos sobre el daño hepático (dependiendo de si presentaban o no esteatosis, pero no de la causa de la misma, es decir genética o nutricional), pero sin inducir cambios en la inflamación y en el daño intestinal. Así pues, según nuestro estudio en estas condiciones la microbiota, no estaría jugando un papel relevante en el desarrollo del daño por I/R y no se vería alterada por los diferentes tratamientos (administración de glucosa o emulsiones lipídicas) ni por el

tipo de hígado (esteatósico versus no esteatósico) o de esteatosis (genética o nutricional). Es más, en caso de producirse cambios en la microbiota intestinal, tales cambios resultarían irrelevantes para el desarrollo del daño estudiado.

Con respecto a la práctica clínica, la glucosa se administra de forma rutinaria a pacientes en cirugía hepática con hipoglucemia postoperatoria (Mendes-Braz et al. 2014). En el presente estudio reportamos que ninguno de los dos tratamientos (ni el tratamiento con glucosa ni con emulsión lipídica) beneficia el resultado post-TH en hígados no esteatósicos, y solo las infusiones lipídicas tienen efectos positivos en los hígados esteatósicos (Figura 33). No obstante, hay diversas consideraciones que se deberían tener en cuenta con respecto a estos tratamientos, como los potenciales efectos hepatotóxicos que podrían llegar a tener los FFA derivados del tratamiento con emulsiones lipídicas (Ibrahim et al. 2011). Así pues, será interesante profundizar en este campo de investigación para determinar si estos resultados experimentales pueden extrapolarse a la práctica clínica del TH con injertos esteatósicos y no esteatósicos procedentes de DBDs. Esto es importante ya que en el escenario clínico actual en el que el 80% de todos los trasplantes se obtienen de donantes con BD (Kwong et al. 2023; ONT 2023) y el 50% de los donantes presentan esteatosis hepática (Reis-Júnior et al. 2019) los resultados presentados pueden resultar de una gran relevancia clínica. No obstante, serán necesarias nuevas investigaciones, con tal de determinar si estos resultados experimentales pueden extrapolarse a la práctica clínica.

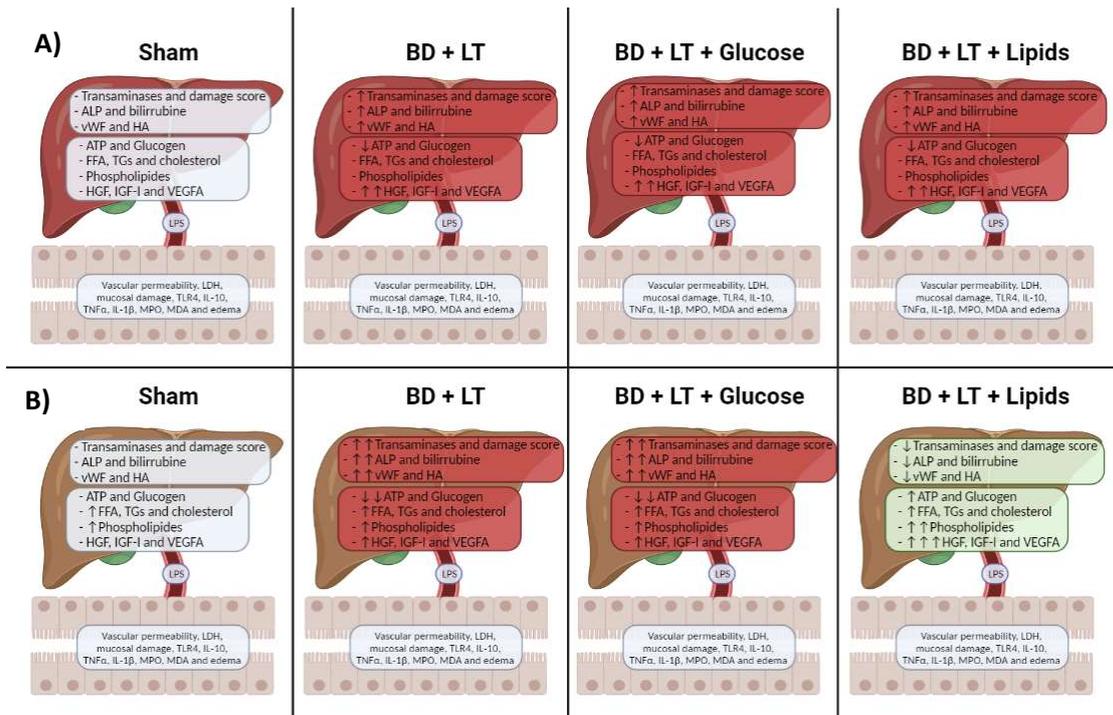


Figura 33. Representación esquemática de los efectos de las diversas intervenciones en hígados no esteatóticos (A) y esteatóticos (B) e intestino con glucosa y lípidos.

Siguiendo los objetivos de la presente Tesis Doctoral, se investigaron los efectos de la neuregulina-1 en el contexto del TH con injertos procedentes de DBDs. A pesar de que hasta estos momentos los estudios reportados en la literatura indican una disminución de los niveles de NRG1 en plasma de pacientes con trastornos del sistema nervioso como la esquizofrenia o el Parkinson (Wang et al. 2015; Hama et al. 2015), no ocurre lo mismo en las condiciones experimentales estudiadas en la presente Tesis

En nuestro modelo preclínico, se observaron niveles elevados de NRG1 en plasma y tejido hepático tras el TH procedente de DBDs tanto en hígados esteatóticos como no esteatóticos. En el presente estudio se demuestra por primera vez los efectos beneficiosos del NRG1 endógeno en injertos hepáticos de donantes con DBDs. Según los resultados que hemos obtenido, la BD desencadena una serie de mecanismos en el hígado con el objetivo de mantener altos los niveles de NRG1, contribuyendo de esta forma a mitigar sus efectos dañinos. Se ha llegado a esta conclusión ya que al inhibir farmacológicamente NRG1 se exagera la lesión y la inflamación, así como el fallo

regenerativo. Pese a que el objetivo del presente estudio no ha sido evaluar los niveles de NRG1 en el cerebro, podríamos hipotetizar que después de la inducción de la BD, incrementan sus niveles en dicho tejido resultando por consiguiente en niveles elevados de NRG1 en circulación y en hígado. Estos hallazgos se han podido observar en casos de lesiones cerebrales debidas a traumas o procesos isquémicos, donde ha habido un aumento de la expresión local de NRG1 en el cerebro (Deng et al. 2019; Parker et al. 2002; Tokita et al. 2001; Guo et al. 2006). Considerando que en nuestro modelo de TH procedente de DBDs hay presente un trauma cerebral y que este desencadena una isquemia cerebral (Stroh et al. 2021) no se puede descartar un aumento en los niveles de NRG1 también en cerebro tal y como ocurre en los estudios previamente mencionados. Nuestros resultados indican que, después de la BD, el aumento de NRG1 se observan primero en la circulación y luego en el hígado, indicando así que el tejido hepático no es la fuente de NRG1. Durante este período, el principal productor de NRG1 podría estar siendo el cerebro. Así pues, el NRG1 estaría siendo producido en el cerebro, liberado a la circulación e ingresando al hígado para ejercer sus efectos.

Además de lo mencionado, el hígado intenta mantener altos los niveles de NRG1 después de la CI, así como después del TH. Dado que este aumento se ha observado después del proceso de CI en los hígados de DBDs, y durante este proceso el hígado permanece aislado sin estar afectado por otros órganos, se podría concluir que el hígado por sí mismo es capaz de producir NRG1. Lo mismo se deduce del aumento de NRG1 en los injertos hepáticos después de su implantación en el receptor. En tal caso, el receptor no ha sufrido una BD que promoviera altos niveles de NRG1 y por ende se podría concluir que es el hígado el que sigue sintetizado NRG1 tras el trasplante. En consecuencia, en el contexto de las condiciones experimentales del presente estudio, deducimos que la muerte cerebral (BD) aumenta el NRG1 en el hígado antes del TH y, a medida que el evento progresa, la CI induce un aumento adicional de NRG1. El presente estudio también ha demostrado que la obesidad no induce cambios en los niveles de NRG1 ya que tales niveles no varían entre hígados esteatósicos y no esteatósicos.

Investigaciones previas al presente estudio, ya habían identificado una relación entre NRG1 y la proteína PAK1 en diferentes modelos *in vitro* de líneas celulares humanas (Maceyka et al. 2008; Akinmade et al. 2008; Bourguignon et al. 2007). Los resultados aquí descritos indican que PAK1 desempeña un papel crucial en los efectos beneficiosos de NRG1 en injertos hepáticos, estableciendo una vía de señalización en el contexto del TH con DBDs desconocida hasta el momento. Dicha investigación ha demostrado que el bloqueo de la acción del NRG1 endógeno disminuyó los niveles de PAK1. Además, la inhibición farmacológica de la actividad endógena de PAK1 condujo a un aumento en los parámetros de daño hepático, inflamación y redujo la regeneración, demostrando así su papel beneficioso en el daño hepático y fallo en la regeneración causado por la BD en el TH. La participación de PAK1 en el proceso de proliferación celular de hepatocitos y HCC ha sido ampliamente reportada (Cao et al. 2020; Z.-L. Zhang et al. 2018; Iyer et al. 2015; Wong et al. 2013; Parekh et al. 2011). No obstante, nuestros resultados contradicen el papel inflamatorio de PAK1 ya descrito anteriormente en hepatocitos e hígados envejecidos (D. H. Kim et al. 2015), hecho que se podría explicar por las diferencias entre los modelos experimentales (*in vitro* vs *in vivo* entre muchas otras diferentes condiciones).

La vía NRG1-PAK1, según los datos que hemos obtenido en la presente Tesis, fue responsable de modular los niveles de VEGFA en TH con injertos no esteatósicos procedentes de DBDs. La inhibición farmacológica de la vía NRG1-PAK1 en ambos tipos de hígados (lo cual indujo efectos dañinos) disminuyó VEGFA e IGF1 en hígados no esteatósicos y esteatósicos, respectivamente. Esto significa que en TH procedente de DBDs, NRG1 y PAK1 incrementan VEGFA e IGF1 en hígados no esteatósicos y esteatósicos, respectivamente, con la finalidad de mitigar el daño hepático y fallo en la regeneración que sufren los injertos hepáticos en tales condiciones quirúrgicas. Para reforzar esta hipótesis sobre el establecimiento de la vía NRG1-PAK1-VEGFA en injertos no esteatósicos, administramos el efector final de esta vía, bajo la inhibición farmacológica de los efectos de ambos (NRG1 o PAK1) y se observó que el tratamiento con VEGFA exógeno previno los efectos negativos derivados de la inhibición de NRG1 y PAK1 en términos de lesión, inflamación y proliferación en los injertos no esteatósicos. Así pues, el estudio aquí presentado es el primero que reporta el papel de VEGFA

como mediador indispensable en los efectos beneficiosos subyacentes de la vía NRG1-PAK1 en TH con injertos no esteatósicos procedentes de DBDs. Hasta el momento sólo un estudio había demostrado el papel de la vía NRG1-PAK1-VEGFA en la angiogénesis y ha sido en un modelo *in vitro* de células epiteliales de cáncer de mama (Bagheri-Yarmand et al. 2000).

Investigaciones previas a los datos aquí presentados, ya demostraron una relación entre NRG1 e IGF1 o entre PAK1 e IGF1 en diferentes tipos celulares (Qiao et al. 2004; Kennedy et al. 2013; Kehat et al. 2010; Worthington et al. 2010; Takahashi et al. 2010). No obstante, el efecto de NRG1-PAK1 sobre IGF1 no había sido descrito previamente. Nuestros resultados indicaron que en TH de injertos esteatósicos procedentes de DBDs, IGF1 es el principal efector de la vía NRG1-PAK1. De hecho, tras la administración de IGF1 exógeno en combinación con inhibidores de NRG1 o PAK1 en injertos esteatósicos, la lesión, inflamación y fallo regenerativo mejoraron en comparación con los resultados obtenidos cuando solo se inhibía la actividad de NRG1 o PAK1. Por lo tanto, se demostró la existencia de una nueva vía, (NRG1-PAK1-IGF1), beneficiosa en injertos esteatósicos. Cabe destacar que las diferencias entre hepatocitos con y sin infiltración grasa en cuanto a su estructura y función están ampliamente descritas (Farrell et al. 2008; Veteläinen et al. 2007; D. H. Kim et al. 2015), por lo que no resulta difícil explicar por qué nuestros resultados muestran un efecto diferencial en la vía de señalización de NRG1-PAK1 sobre VEGFA e IGF1, dependiendo del tipo de injerto.

Es importante mencionar, que los efectos de las vías descritas anteriormente (NRG1-PAK1-VEGFA para hígados no esteatósicos y NRG1-PAK1-IGF1 para hígados esteatósicos) se observan tanto en el modelo de obesidad inducida genéticamente como en el modelo de obesidad inducida nutricionalmente, lo cual es de interés científico y clínico a causa de las dificultades del establecimiento de estrategias protectoras en la clínica dependiendo del tipo de esteatosis. Esto es debido a que los mecanismos subyacentes a la patología de los hígados esteatósicos pueden ser diferentes en función del tipo de esteatosis, y por consiguiente es difícil encontrar las dianas específicas para que protejan injertos esteatósicos independientemente del tipo de esteatosis.

Tras observar los efectos beneficiosos del NRG1 endógeno, se pretendió evaluar si la administración de NRG1 exógeno podría ser una estrategia farmacológica que protegiese frente al daño por I/R en el TH con DBDs. Sin embargo, se observó que tras la administración de NRG1, la lesión y la inflamación no disminuyeron, ni hubo una mejora en los marcadores de regeneración hepática respecto al grupo experimental de BD+LT sin tratamiento sino todo lo contrario ya que la administración exógena de NRG1 exacerbó la lesión y el fallo en la regeneración. De esta forma, los resultados que se presentan indicando que el NRG1 exógeno no ejerce un efecto protector frente al daño, la inflamación o fallo en la respuesta regenerativa en ninguno de los tipos de injertos hepáticos en TH procedente de DBDs contrastan con los numerosos estudios de investigación básica y clínica que reportan beneficios de la administración de NRG1 exógeno en hepatocitos aislados, modelos experimentales de regeneración cardíaca o enfermedades neurodegenerativas, así como en pacientes con insuficiencia cardíaca (Hama et al. 2015; Ganapathy et al. 2016; Jalilzad et al. 2019; Lenihan et al. 2016).

Los efectos diferenciales de NRG1, independientemente de su origen (endógeno o exógeno) no son de extrañar ya que también se han observado con otros mediadores en el contexto quirúrgico del TH (Carrasco-Chaumel et al. 2005). Los efectos perjudiciales del NRG1 exógeno podrían deberse a la desregulación de los mediadores involucrados en la señalización celular de la vía NRG1-PAK1-VEGFA/IGF1, o a los efectos secundarios dañinos derivados del fármaco administrado. No se puede descartar tampoco que el NRG1 exógeno pueda afectar vías distintas a las desencadenadas por el NRG1 endógeno modificando de esta forma los efectos beneficiosos del NRG1 endógeno.

Dado que el NRG1 exógeno no potenció la actividad protectora endógena de NRG1 en LT de DBD como se describe en este estudio, futuras investigaciones de gran interés científico y clínico, podrían centrarse en los receptores de NRG1 o en vías de señalización que afectan a NRG1, con la finalidad de regular NRG1 y de disminuir en consecuencia la incidencia de complicaciones postoperatorias en los receptores de injertos hepáticos tanto esteatósicos como no esteatósicos obtenidos de DBDs.

Los resultados aquí observados sobre el NRG1 exógeno son de interés científico y clínico, ya que proporcionan nuevos conocimientos sobre los mecanismos subyacentes del NRG1 endógeno y contradice el dogma acerca del potencial beneficioso que se ha descrito en la literatura sobre este factor neurotrófico, NRG1 (Figura 34). Aquí se demuestra que la administración de NRG1 no es una opción terapéutica apropiada en el TH procedente de DBDs.

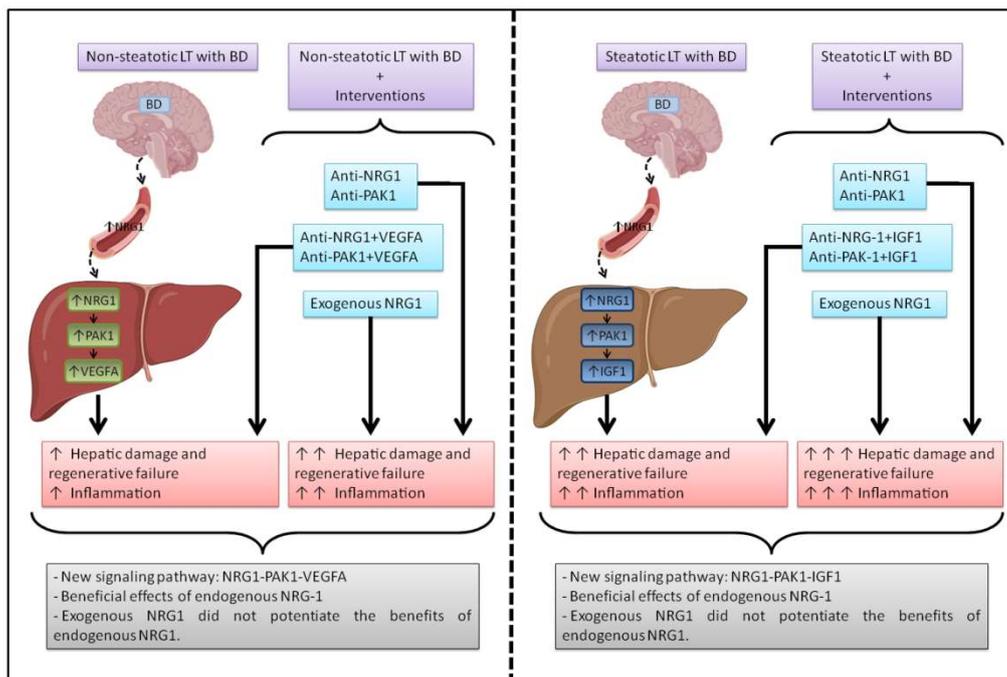


Figura 34. Representación esquemática de las vías de señalización propuestas detectadas en este estudio en hígados esteatósicos y no esteatósicos en TH y los efectos de diferentes intervenciones.

Atendiendo a los objetivos relativos al último estudio de la presente Tesis Doctoral, se analizaron los efectos de la GH en el contexto de DBDs con ALD. Nuestros resultados indican que no hay alteraciones relevantes en el eje hipotálamo-hipofisario en injertos hepáticos de DBDs. Además, la BD tampoco indujo cambios en los niveles de GH ni en el hígado ni en el intestino. Tal y como se ha mencionado en la introducción son muchos los estudios que reportan un papel importante de la GH en numerosas alteraciones metabólicas y patologías hepáticas (Fang et al. 2019; Rufinatscha et al. 2018; Sarmiento-Cabral et al. 2021; Tateno et al. 2011). Nuestros

resultados van en línea con los anteriormente mencionados en tanto en cuanto la administración de GH exógena (que fue captada por el intestino) mejoró la calidad de los injertos de DBDs con ALD antes de la extracción de los mismos del donante. Según los datos obtenidos, este hecho sería debido a que la GH estaría modulando la expresión de VEGFA y VEGFB en intestino. Ninguno de los 3 factores mencionados anteriormente fue captado por el hígado, aunque curiosamente y de interés científico, lo protegieron del daño inducido por la BD.

Se ha descrito previamente que la GH puede tener un papel positivo en la ALD. Por otra parte, se ha reportado en modelos preclínicos que tratamientos prolongados con la GH (6 semanas) podrían estar reduciendo la infiltración grasa en el hígado (Qin et al. 2010). A más a más, diversos estudios estarían correlacionando los niveles de GH con el consumo de alcohol (Trifunović et al. 2016; Vatsalya et al. 2012). Esta correlación se estaría observando también con los niveles de VEGFA y VEGFB con el consumo de alcohol en diferentes modelos preclínicos (Ceccanti et al. 2012; Costa et al. 2017).

Hasta donde sabemos, solo un estudio *in vitro* ha establecido una relación entre GH y VEGFA, en donde se muestra que GH estaría positivamente regulando los niveles de dicho factor, VEGFA (S. Li et al. 2010), mientras que ningún estudio hasta la fecha ha demostrado relación alguna entre GH y VEGFB. No obstante, debido a las similitudes entre los mecanismos de acción y los receptores de ambos factores de crecimiento (VEGFA y VEGFB), hipotetizamos que la GH también podría estar incrementando no sólo VEGFA sino también VEGFB. Con respecto a los efectos sobre el intestino de la GH, según Ran T. et al., el tracto gastrointestinal expresa el receptor de la GH, GHR (Ran et al. 2016), lo que podría explicar la acción de la GH en intestino. Además, un estudio reciente demuestra que el intestino tiene la capacidad de producir ambos factores (VEGFB y VEGFA) (F. Zhang et al. 2018). Según los resultados aquí presentados, la administración exógena de GH en DBDs con ALD aumenta la producción intestinal de VEGFB y VEGFA, lo que iría en consonancia con los estudios mencionados anteriormente.

En cuanto a VEGFA, en condiciones de PH+IR, exacerba el daño hepatocelular en hígados esteatósicos en un modelo experimental de obesidad inducida genéticamente (Bujaldon et al. 2019). En otros estudios, VEGFB se ha descrito también como un factor con un importante efecto modulador de la lesión por I/R en tejido cardíaco (Kivelä et al. 2014; Raissadati et al. 2017). Como se ha mostrado en los resultados anteriormente descritos, la administración de GH induciría la producción de VEGFB y VEGFA en intestino, mitigando de esta forma el daño hepático en DBDs con ALD antes de la extracción de los injertos hepáticos de los donantes. De forma contraria a lo esperado, cuando se administró anti-VEGFR1 junto con GH, las propiedades beneficiosas inducidas por GH en el hígado no fueron revertidas. Sólo con la administración concomitante de anti-VEGFR1 y de un inhibidor de VEGFR2 (el receptor de VEGFA) se eliminaron los beneficios observados por la administración de GH. Estos resultados están en línea con la literatura existente sobre la dinámica de las vías de señalización de VEGFR1 y VEGFR2. Diferentes estudios sugieren la idea de que VEGFA puede unirse tanto a VEGFR1 como a VEGFR2, pero solo ejercería su función a través de VEGFR2, mientras que VEGFR1 estaría actuando de "decoy" (Figura 35). Al unirse VEGFB a su receptor (VEGFR1), este desplaza a VEGFA a VEGFR2, promoviendo la acción de este segundo factor. A su vez VEGFB también podría estar ejerciendo efectos beneficiosos al unirse a VEGFR1. En otras palabras, los beneficios potenciales de VEGFB se deben a que potencia la acción de VEGFA (Boucher et al. 2017; Lal et al. 2018). Esto es lo que podría estar sucediendo en DBDs con ALD. La GH exógena estaría aumentando los niveles de ambos VEGFs. VEGFB se estaría uniendo a su receptor (VEGFR1) potenciando la unión de VEGFA a VEGFR2. Cuando solo se administra VEGFA, este se une tanto a VEGFR1 como a VEGFR2 ejerciendo su función a través de VEGFR2. Por otro lado, cuando se administra VEGFB, este se une a VEGFR1, permitiendo que el VEGFA endógeno se una a VEGFR2. Cuando se administra GH y anti-VEGFR1, el VEGFA producido por GH se estaría uniendo a VEGFR2 ejerciendo su función. Finalmente, cuando se administra GH junto con anti-VEGFR1 y anti-VEGFR2, ni VEGFA ni VEGFB se unirían a los receptores. De esta forma, no se observaría la protección inducida por la GH exógena ya que se estarían inhibiendo la acción de ambos VEGFA y VEGFB. Según nuestros resultados, VEGFA y VEGFB pueden proteger indirectamente al hígado al ejercer sus funciones en el intestino. Esto podría explicarse por el hecho de que el

intestino expresa ambos receptores (VEGFR1 y VEGFR2) (Wejman et al. 2013; Zhou et al. 2023). En este caso, la GH exógena (a través de la producción de VEGFA y VEGFB en el intestino), o la administración de VEGFA y VEGFB exógenos (que son captados por el intestino y no por el hígado) podrían estar ejerciendo sus efectos beneficiosos modulando diferentes vías y produciendo diferentes mediadores en el intestino, los cuales podrían ser liberados a la circulación portal y ser recaptados por el hígado para evitar el daño hepático producido por la BD y en presencia de ALD. Está ampliamente reportado que las múltiples vías moduladas por la familia VEGF incluyen supervivencia, apoptosis y muerte celular, proliferación, procesos hipertróficos, permeabilidad o migración celular, etc. (X. Li et al. 2012; Melincovici et al. 2018; Shen et al. 2018). Por este motivo, el identificar los mecanismos de acción que expliquen cómo los VEGF modulan este daño hepático y fallo en la regeneración con exactitud sería de un enorme interés científico y clínico.

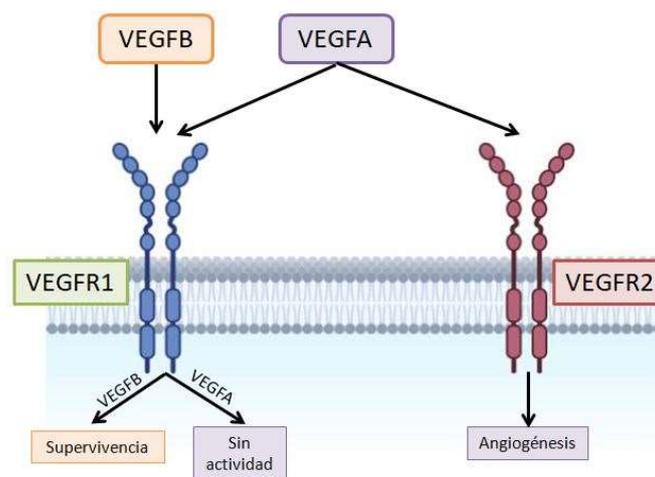


Figura 35. Representación esquemática de VEGFA y VEGFB, sus receptores y funciones celulares. Adaptada de (Lal et al. 2018)

Así pues, los resultados presentados en este estudio muestran la relevancia de VEGFB/VEGFA sintetizados en el intestino por acción GH en el contexto del TH con donantes ALD con BD. Esta última estaría reduciendo el daño hepático causado por la BD antes de la extracción del injerto porque estaría sintetizando VEGFB y VEGFA en el intestino. Estos datos resultan de un gran interés clínico y científico ya que es el primer

estudio que explora una potencial terapia para reducir los efectos perjudiciales de la BD en donantes con ALD (Figura 36).

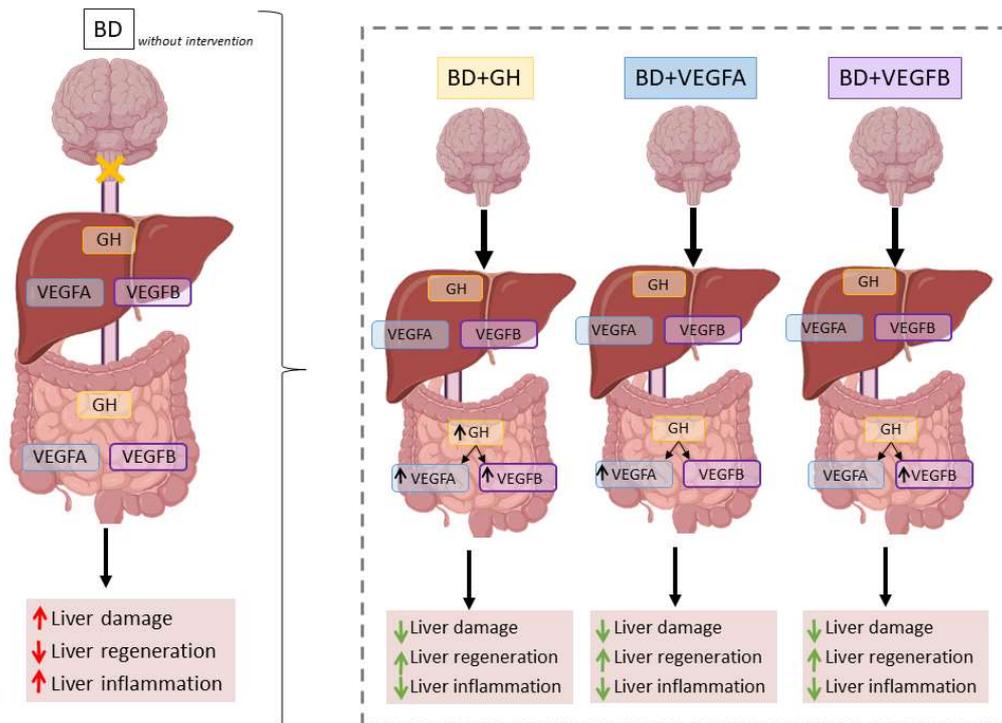


Figura 36. Representación esquemática de la vía GH-VEGFB/VEGFA en intestino e hígado en donantes con BD y ALD y efectos sobre el daño hepático de las diferentes potenciales terapias farmacológicas.

En conclusión, los mecanismos fisiopatológicos y nuevas terapias descritas en la presente tesis doctoral podrían llegar a mejorar la calidad de los injertos hepáticos sometidos a TH procedentes de donantes con criterio extendido mejorando los resultados post-operatorios. Todo ello, podría llevar a una mayor utilización de los injertos esteatósicos y procedentes de donantes con ALD y en consecuencia reducir la problemática de las listas de espera para trasplante.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- Las estrategias nutricionales basadas en la administración de glucosa o emulsiones lipídicas tienen efectos diferentes en el TH procedente de DBD dependiendo del injerto hepático. En el caso de los injertos no esteatósicos ninguna de las estrategias protegió frente al daño e inflamación asociado al TH procedente de DBDs. En los injertos esteatósicos (independiente del tipo de esteatosis, genética o nutricional), la administración de glucosa fue inefectiva mientras que el tratamiento con emulsiones lipídicas protegió a los injertos esteatósicos frente a la vulnerabilidad que presentan a la lesión e inflamación.
- El eje intestino-hígado no es crucial en los efectos de las estrategias nutricionales en injertos esteatósicos y no esteatósicos procedentes de DBDs sometidos a TH.
- Los efectos de la neuregulina-1 en TH de injertos esteatósicos y no esteatósicos procedente de DBDs depende de la fuente de este factor neurotrófico (endógeno vs exógeno).
- La neuregulina-1 endógena estaría ejerciendo efectos beneficiosos frente al daño inducido por I/R y fallo en la regeneración hepática en TH procedente de DBDs por vías de señalización diferentes dependiendo del tipo de injerto (esteatósico vs no esteatósico). La vía NRG1-PAK1-VEGFA sería la responsable de los efectos beneficiosos de la NRG1 en el TH con hígados no esteatósicos procedentes de DBDs mientras que la vía de señalización NRG1-PAK1-IGF1 sería la responsable de los efectos beneficiosos de la NRG1 sobre la lesión, y fallo en la regeneración en el TH con injertos esteatósicos procedentes de DBDs.
- En contra del dogma creado con los efectos protectores derivados de la administración exógena de neuregulina-1 en diferentes patologías, en el TH con injertos esteatósicos y no esteatósicos procedentes de DBDs, es contraproducente ya que exacerba la lesión y fallo en la regeneración.

- El tipo de esteatosis (genética vs nutricional), no afecta de forma diferencial a la lesión por I/R y fallo en la regeneración ni a los efectos y vías de señalización de NRG1 cuando los injertos hepáticos esteatósicos procedentes de DBDs se someten a TH.
- En el TH procedente de donantes con ALD, la hormona del crecimiento reduce el daño hepático causado por la muerte cerebral en los donantes, antes de la extracción del injerto hepático mediante un aumento en la expresión de VEGFB y de VEGFA en el intestino.
- El eje intestino-hígado estaría jugando un papel crucial en donantes con BD y ALD ya que sería el órgano diana de la GH. El tratamiento de GH en donantes con ALD aumenta los niveles de GH en intestino. Esta hormona de crecimiento aumenta la expresión de VEGFB/VEGFA en intestino y, en consecuencia, se evitan los efectos nocivos derivados de la muerte cerebral en los injertos con ALD.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Adashek, Jacob J., Chinmayi Pandya, Nicholas J. Maragakis, Pradip De, Philip R. Cohen, Shumei Kato, and Razelle Kurzrock. 2024. "Neuregulin-1 and ALS19 (ERBB4): At the Crossroads of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Cancer." *BMC Medicine* 22 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12916-024-03293-3>.
- Ahmad, Ajmal, and Mohd Imtiaz Nawaz. 2022. "Molecular Mechanism of VEGF and Its Role in Pathological Angiogenesis." *Journal of Cellular Biochemistry* 123 (12): 1938–65. <https://doi.org/10.1002/jcb.30344>.
- Akinmade, D., A. H. Talukder, Y. Zhang, W. M. Luo, R. Kumar, and A. W. Hamburger. 2008. "Phosphorylation of the ErbB3 Binding Protein Ebp1 by P21-Activated Kinase 1 in Breast Cancer Cells." *British Journal of Cancer* 98 (6): 1132–40. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604261>.
- Álvarez-Mercado, Ana I., José Gulfo, Manuel Romero Gómez, Mónica B. Jiménez-Castro, Jordi Gracia-Sancho, and Carmen Peralta. 2019. "Use of Steatotic Grafts in Liver Transplantation: Current Status." *Liver Transplantation* 25 (5): 771–86. <https://doi.org/10.1002/lt.25430>.
- Álvarez-Mercado, Ana I., Elsa Negrete-Sánchez, José Gulfo, Cindy G. Ávalos De León, Araní Casillas-Ramírez, María Eugenia Cornide-Petronio, Esther Bujaldon, et al. 2019. "EGF-GH Axis in Rat Steatotic and Non-Steatotic Liver Transplantation from Brain-Dead Donors." *Transplantation* 103 (7): 1349–59. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002636>.
- Anderson, Steven P., Lawrence Yoon, Erika B. Richard, Corrie S. Dunn, Russell C. Cattley, and J. Christopher Corton. 2002. "Delayed Liver Regeneration in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α -Null Mice." *Hepatology* 36 (3): 544–54. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.35276>.
- Aron-Wisnewsky, Judith, Chloé Vigliotti, Julia Witjes, Phuong Le, Adriaan G. Holleboom, Joanne Verheij, Max Nieuwdorp, and Karine Clément. 2020. "Gut Microbiota and

- Human NAFLD: Disentangling Microbial Signatures from Metabolic Disorders.” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 17 (5): 279–97. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0269-9>.
- Avalos-de León, Cindy G., Mónica B. Jiménez-Castro, María Eugenia Cornide-Petronio, José Gulfo, Floriana Rotondo, Jordi Gracia-Sancho, Araní Casillas-Ramírez, and Carmen Peralta. 2019. “The Effect of Fibroblast Growth Factor 15 Signaling in Non-Steatotic and Steatotic Liver Transplantation from Cardiocirculatory Death.” *Cells* 8 (12): 1640. <https://doi.org/10.3390/cells8121640>.
- Avalos-de León, Cindy G, Mónica B Jiménez-Castro, María Eugenia Cornide-Petronio, Araní Casillas-Ramírez, and Carmen Peralta. 2019. “The Role of GLP1 in Rat Steatotic and Non-Steatotic Liver Transplantation from Cardiocirculatory Death Donors.” *Cells* 8 (12): 1–15. <https://doi.org/10.3390/cells8121599>.
- Bagheri-Yarmand, R, R K Vadlamudi, R A Wang, J Mendelsohn, and R Kumar. 2000. “Vascular Endothelial Growth Factor Up-Regulation via P21-Activated Kinase-1 Signaling Regulates Heregulin-Beta1-Mediated Angiogenesis.” *The Journal of Biological Chemistry* 275 (50): 39451–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006150200>.
- Barone, Sharon, Tomohisa Okaya, Steve Rudich, Snezana Petrovic, Kathy Tenrani, Zhaohui Wang, Kamyar Zahedi, Robert A. Casero, Alex B. Lentsch, and Manoocher Soleimani. 2005. “Distinct and Sequential Upregulation of Genes Regulating Cell Growth and Cell Cycle Progression during Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury.” *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 289 (4 58-4): 826–35. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00629.2004>.
- Behrends, Matthias, Graciela Martinez-Palli, Claus U. Niemann, Sara Cohen, Rageshree Ramachandran, and Ryutaro Hirose. 2010. “Acute Hyperglycemia Worsens Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Rats.” *Journal of Gastrointestinal Surgery*. <https://doi.org/10.1007/s11605-009-1112-3>.
- Barr, Tasha, Christa Helms, Kathleen Grant, and Ilhem Messaoudi. 2016. “Opposing

Effects of Alcohol on the Immune System.” *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 65: 242–51. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.09.001>.

Boccanegra, Brigida, Ornella Cappellari, Paola Mantuano, Daniela Trisciuzzi, Antonietta Mele, Lisamaura Tulimiero, Michela De Bellis, et al. 2023. “Growth Hormone Secretagogues Modulate Inflammation and Fibrosis in Mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy.” *Frontiers in Immunology* 14 (April): 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1119888>.

Bockhorn, Maximilian, Michal Goralski, Dennis Prokofiev, Philipp Dammann, Petra Grünewald, Martin Trippler, Alireza Biglarnia, et al. 2007. “VEGF Is Important for Early Liver Regeneration After Partial Hepatectomy.” *Journal of Surgical Research* 138 (2): 291–99. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.07.027>.

Boucher, Joshua M., Ryan P. Clark, Diana C. Chong, Kathryn M. Citrin, Lyndsay A. Wylie, and Victoria L. Bautch. 2017. “Dynamic Alterations in Decoy VEGF Receptor-1 Stability Regulate Angiogenesis.” *Nature Communications* 8: 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms15699>.

Bourguignon, Lilly Y.W., Eli Gilad, and Karine Peyrollier. 2007. “Heregulin-Mediated ErbB2-ERK Signaling Activates Hyaluronan Synthases Leading to CD44-Dependent Ovarian Tumor Cell Growth and Migration.” *Journal of Biological Chemistry* 282 (27): 19426–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610054200>.

Bujaldon, Esther, María Eugenia Cornide-Petronio, José Gulfo, Floriana Rotondo, Cindy Ávalos de León, Elsa Negrete-Sánchez, Jordi Gracia-Sancho, Anna Novials, Mónica B. Jiménez-Castro, and Carmen Peralta Uroz. 2019. “Relevance of VEGFA in Rat Livers Subjected to Partial Hepatectomy under Ischemia-Reperfusion.” *Journal of Molecular Medicine* 97 (9): 1299–1314. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01811-y>.

Burne, Melissa J, Asmaa Elghandour, Mahmud Haq, Sabiha R Saba, James Norman, Thomas Condon, Frank Bennett, and Hamid Rabb. 2001. “IL-1 and TNF Independent Pathways Mediate ICAM-1/VCAM-1 up-Regulation in Ischemia

- Reperfusion Injury.” *Journal of Leukocyte Biology* 70 (2): 192–98. <https://doi.org/10.1189/jlb.70.2.192>.
- Burrello, Claudia, Federica Garavaglia, Fulvia Milena Cribiù, Giulia Ercoli, Gianluca Lopez, Jacopo Troisi, Angelo Colucci, et al. 2018. “Therapeutic Faecal Microbiota Transplantation Controls Intestinal Inflammation through IL10 Secretion by Immune Cells.” *Nature Communications* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07359-8>.
- Caicedo, Diego, Oscar Díaz, Pablo Devesa, and Jesús Devesa. 2018. “Growth Hormone (GH) and Cardiovascular System.” *International Journal of Molecular Sciences* 19 (1): 1–40. <https://doi.org/10.3390/ijms19010290>.
- Cannistrà, Marco, Michele Ruggiero, Alessandra Zullo, Giuseppe Gallelli, Simone Serafini, Mazzitelli Maria, Agostino Naso, Raffaele Grande, Raffaele Serra, and Bruno Nardo. 2016. “Hepatic Ischemia Reperfusion Injury: A Systematic Review of Literature and the Role of Current Drugs and Biomarkers.” *International Journal of Surgery (London, England)* 33 Suppl 1 (September): S57-70. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2016.05.050>.
- Cao, Fei, and Li-Xue Yin. 2020. “PAK1 Promotes Proliferation, Migration and Invasion of Hepatocellular Carcinoma by Facilitating EMT via Directly up-Regulating Snail.” *Genomics* 112 (1): 694–702. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.05.002>.
- Caraceni, Paolo, Marco Domenicali, Gianluigi Vendemiale, Ignazio Grattagliano, Annamaria Pertosa, Bruno Nardo, Antonio Maria Morselli-Labate, et al. 2005. “The Reduced Tolerance of Rat Fatty Liver to Ischemia Reperfusion Is Associated with Mitochondrial Oxidative Injury.” *The Journal of Surgical Research* 124 (2): 160–68. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.10.007>.
- Cardiff, Robert D, Claramae H Miller, and Robert J Munn. 2014. “Manual Hematoxylin and Eosin Staining of Mouse Tissue Sections.” *Cold Spring Harbor Protocols* 2014 (6): 655–58. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot073411>.
- Carrasco-Chaumel, Esther, Joan Roselló-Catafau, Ramon Bartrons, Rosa Franco-Gou,

- Carme Xaus, Arani Casillas, Emili Gelpí, Joan Rodés, and Carmen Peralta. 2005. "Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase and Nitric Oxide in Rat Steatotic Liver Transplantation." *Journal of Hepatology* 43 (6): 997–1006. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.05.021>.
- Casillas-Ramírez, Araní, Ismail Ben Mosbah, Fernando Ramalho, Joan Roselló-Catafau, and Carmen Peralta. 2006. "Past and Future Approaches to Ischemia-Reperfusion Lesion Associated with Liver Transplantation." *Life Sciences* 79 (20): 1881–94. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.06.024>.
- Casillas-Ramírez, Araní, Amine Zaouali, Susagna Padriša-Altés, Ismail Ben Mosbah, Anna Pertosa, Izabel Alfany-Fernández, Maria Bintanel-Morcillo, et al. 2009. "Insulin-like Growth Factor and Epidermal Growth Factor Treatment: New Approaches to Protecting Steatotic Livers against Ischemia-Reperfusion Injury." *Endocrinology* 150 (7): 3153–61. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1458>.
- Casillas-Ramírez, Araní, Marc Micó-Carnero, Alfredo Sánchez-González, Cristina Maroto-Serrat, Andrés Trostchansky, and Carmen Peralta. 2023. "NO–IL-6/10–IL-1 β Axis: A New Pathway in Steatotic and Non-Steatotic Liver Grafts from Brain-Dead Donor Rats." *Frontiers in Immunology* 14 (August): 1–27. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1178909>.
- Ceccanti, Mauro, Rosanna Mancinelli, Paola Tirassa, Giovanni Laviola, Simona Rossi, Marina Romeo, and Marco Fiore. 2012. "Early Exposure to Ethanol or Red Wine and Long-Lasting Effects in Aged Mice. A Study on Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Hepatocyte Growth Factor, and Vascular Endothelial Growth Factor." *Neurobiology of Aging* 33 (2): 359–67. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.005>.
- Chiari, P., G. Hadour, P. Michel, V. Piriou, C. Rodriguez, C. Budat, M. Ovize, O. Jegaden, J. J. Lehot, and R. Ferrera. 2000. "Biphasic Response after Brain Death Induction: Prominent Part of Catecholamines Release in This Phenomenon." *Journal of Heart and Lung Transplantation* 19 (7): 675–82. [https://doi.org/10.1016/S1053-2498\(00\)00127-3](https://doi.org/10.1016/S1053-2498(00)00127-3).

- Chiu, C J, A H McArdle, R Brown, H J Scott, and F N Gurd. 1970. "Intestinal Mucosal Lesion in Low-Flow States. I. A Morphological, Hemodynamic, and Metabolic Reappraisal." *Archives of Surgery (Chicago, Ill. : 1960)* 101 (4): 478–83. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1970.01340280030009>.
- Cohn, Jeffrey S., Elaine Wat, Alvin Kamili, and Sally Tandy. 2008. "Dietary Phospholipids, Hepatic Lipid Metabolism and Cardiovascular Disease." *Current Opinion in Lipidology* 19 (3): 257–62. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3282ffaf96>.
- Cornide-Petronio, María Eugenia, Ana Isabel Álvarez-Mercado, Mónica B. Jiménez-Castro, and Carmen Peralta. 2020. "Current Knowledge about the Effect of Nutritional Status, Supplemented Nutrition Diet, and Gut Microbiota on Hepatic Ischemia-Reperfusion and Regeneration in Liver Surgery." *Nutrients* 12 (2): 284. <https://doi.org/10.3390/nu12020284>.
- Corps, Kara N., Theodore L. Roth, and Dorian B. McGavern. 2015. "Inflammation and Neuroprotection in Traumatic Brain Injury." *JAMA Neurology* 72 (3): 355–62. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.3558>.
- Costa, Raquel, Ilda Rodrigues, Luísa Guardão, Sílvia Rocha-rodrigues, Carolina Silva, José Magalhães, Manuel Ferreira-de-almeida, Rita Negrão, and Raquel Soares. 2017. "Xanthohumol and 8-Prenylnaringenin Ameliorate Diabetic-Related Metabolic Dysfunctions in Mice." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 45: 39–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.03.006>.
- Dahlborg, S A, A Petrillo, J R Crossen, S Roman-Goldstein, N D Doolittle, K H Fuller, and E A Neuwelt. 1998. "The Potential for Complete and Durable Response in Nonglial Primary Brain Tumors in Children and Young Adults with Enhanced Chemotherapy Delivery." *The Cancer Journal from Scientific American* 4 (2): 110–24.
- Deng, Weike, Fei Luo, Bao-Ming Li, and Lin Mei. 2019. "NRG1-ErbB4 Signaling Promotes Functional Recovery in a Murine Model of Traumatic Brain Injury via Regulation of GABA Release." *Experimental Brain Research* 237 (12): 3351–62.

<https://doi.org/10.1007/s00221-019-05680-2>.

Dominguez, Sara L., Ganapati V. Hegde, Jesse E. Hanson, Hong Xiang, Danielle Mandikian, C. Andrew Boswell, Cecilia Chiu, et al. 2018. "Antibody-Mediated Stabilization of NRG1 Induces Behavioral and Electrophysiological Alterations in Adult Mice." *Scientific Reports* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26492-4>.

Donaghy, A., R. Ross, C. Wicks, S. C. Hughes, J. Holly, A. Gimson, and R. Williams. 1997. "Growth Hormone Therapy in Patients with Cirrhosis: A Pilot Study of Efficacy and Safety." *Gastroenterology* 113 (5): 1617–22. <https://doi.org/10.1053/gast.1997.v113.pm9352864>.

Dong, Ting, Guangan Hu, Zhongqi Fan, Huirui Wang, Yinghui Gao, Sisi Wang, Hao Xu, et al. 2024. "Activation of GPR3- β -Arrestin2-PKM2 Pathway in Kupffer Cells Stimulates Glycolysis and Inhibits Obesity and Liver Pathogenesis." *Nature Communications* 15 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45167-5>.

Doronzio, Gabriella, Michela Viretto, Cristina Barale, Isabella Russo, Luigi Mattiello, Giovanni Anfossi, and Mariella Trovati. 2013. "Oleic Acid Increases Synthesis and Secretion of VEGF in Rat Vascular Smooth Muscle Cells: Role of Oxidative Stress and Impairment in Obesity." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (9): 18861–80. <https://doi.org/10.3390/ijms140918861>.

Dorsey, Waneene C., Paul B. Tchounwou, and Byron D. Ford. 2006. "Neuregulin 1-Beta Cytoprotective Role in AML 12 Mouse Hepatocytes Exposed to Pentachlorophenol." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 3 (1): 11–22. <https://doi.org/10.3390/ijerph2006030002>.

Du, Junbao, Li Zhao, Quan Kang, Yun He, and Yang Bi. 2023. "An Optimized Method for Oil Red O Staining with the Salicylic Acid Ethanol Solution." *Adipocyte* 12 (1): 2179334. <https://doi.org/10.1080/21623945.2023.2179334>.

Dukić, Marija, Tijana Radonjić, Igor Jovanović, Marija Zdravković, Zoran Todorović, Nemanja Krašnik, Bojana Arandžević, et al. 2023. "Alcohol, Inflammation, and

- Microbiota in Alcoholic Liver Disease.” *International Journal of Molecular Sciences* 24 (4). <https://doi.org/10.3390/ijms24043735>.
- Dziodzio, Tomasz, Matthias Biebl, and Johann Pratschke. 2014. “Impact of Brain Death on Ischemia/Reperfusion Injury in Liver Transplantation.” *Current Opinion in Organ Transplantation* 19 (2): 108–14. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000061>.
- Egom, E. Eroume A., Yunbo Ke, Hanny Musa, Tamer M.A. Mohamed, Tao Wang, Elizabeth Cartwright, R. John Solaro, and Ming Lei. 2010. “FTY720 Prevents Ischemia/Reperfusion Injury-Associated Arrhythmias in an Ex Vivo Rat Heart Model via Activation of Pak1/Akt Signaling.” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48 (2): 406–14. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.10.009>.
- Eltzschig, Holger K., and Tobias Eckle. 2011. “Ischemia and Reperfusion—from Mechanism to Translation.” *Nature Medicine* 17 (11): 1391–1401. <https://doi.org/10.1038/nm.2507>.
- Ennequin, Gaël, Nathalie Boisseau, Kevin Caillaud, Vivien Chavanelle, Monique Etienne, Xinyan Li, and Pascal Sirvent. 2015. “Neuregulin 1 Improves Glucose Tolerance in Db/Db Mice.” *PLoS ONE* 10 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130568>.
- Fang, Fei, Xuanming Shi, Michael S. Brown, Joseph L. Goldstein, and Guosheng Liang. 2019. “Growth Hormone Acts on Liver to Stimulate Autophagy, Support Glucose Production, and Preserve Blood Glucose in Chronically Starved Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (15): 7449–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901867116>.
- Farrell, Geoff C, N C Teoh, and R S McCuskey. 2008. “Hepatic Microcirculation in Fatty Liver Disease.” *Anatomical Record (Hoboken, N.J. : 2007)* 291 (6): 684–92. <https://doi.org/10.1002/ar.20715>.
- Fernández-Pérez, Leandro, Mercedes de Mirecki-Garrido, Borja Guerra, Mario Díaz, and Juan Carlos Díaz-Chico. 2016. “Sex Steroids and Growth Hormone Interactions.” *Endocrinología y Nutrición* 63 (4): 171–80.

<https://doi.org/10.1016/j.endonu.2015.11.004>.

Fromenty, B, M A Robin, A Igoudjil, A Mansouri, and D Pessayre. 2004. "The Ins and Outs of Mitochondrial Dysfunction in NASH." *Diabetes & Metabolism* 30 (2): 121–38. [https://doi.org/10.1016/s1262-3636\(07\)70098-8](https://doi.org/10.1016/s1262-3636(07)70098-8).

G. Bardallo, Raquel, Arnau Panisello-Roselló, Sergio Sanchez-Nuno, Norma Alva, Joan Roselló-Catafau, and Teresa Carbonell. 2022. "Nrf2 and Oxidative Stress in Liver Ischemia/Reperfusion Injury." *FEBS Journal* 289 (18): 5463–79. <https://doi.org/10.1111/febs.16336>.

Ganapathy, Balakrishnan, Nikitha Nandhagopal, Brian D. Polizzotti, David Bennett, Alparslan Asan, Yijen Wu, and Bernhard Kühn. 2016. "Neuregulin-1 Administration Protocols Sufficient for Stimulating Cardiac Regeneration in Young Mice Do Not Induce Somatic, Organ, or Neoplastic Growth." *PLoS ONE* 11 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155456>.

Garbayo, Elisa, Juan José Gavira, Manuel Garcia De Yebenes, Beatriz Pelacho, Gloria Abizanda, Hugo Lana, María José Blanco-Prieto, and Felipe Prosper. 2016. "Catheter-Based Intramyocardial Injection of FGF1 or NRG1-Loaded MPs Improves Cardiac Function in a Preclinical Model of Ischemia-Reperfusion." *Scientific Reports* 6 (April): 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep25932>.

GODT. 2023. "Global Observatory on Donation and Transplantation (GODT) - 2022 Global Report." 2023. <https://www.transplant-observatory.org/>.

Goetze, Oliver, Andreas Steingoetter, Dieter Menne, Ivo R. van der Voort, Monika A. Kwiatek, Peter Boesiger, Dominik Weishaupt, Miriam Thumshirn, Michael Fried, and Werner Schwizer. 2007. "The Effect of Macronutrients on Gastric Volume Responses and Gastric Emptying in Humans: A Magnetic Resonance Imaging Study." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 292 (1): G11–17. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00498.2005>.

Goikoetxea-Usandizaga, Naroa, Marina Serrano-Maciá, Teresa C Delgado, Jorge Simón, David Fernández Ramos, Diego Barriales, Maria E Cornide, et al. 2022.

- “Mitochondrial Bioenergetics Boost Macrophage Activation, Promoting Liver Regeneration in Metabolically Compromised Animals.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 75 (3): 550–66. <https://doi.org/10.1002/hep.32149>.
- González, S., T. Fernández-Navarro, S. Arbolea, C. G. De Los Reyes-Gavilán, N. Salazar, and M. Gueimonde. 2019. “Fermented Dairy Foods: Impact on Intestinal Microbiota and Health-Linked Biomarkers.” *Frontiers in Microbiology* 10 (MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01046>.
- Gonzalez-Villasana, Vianey, Enrique Fuentes-Mattei, Cristina Ivan, Heather J. Dalton, Cristian Rodriguez-Aguayo, Ricardo J. Fernandez-De Thomas, Burcu Aslan, et al. 2015. “Rac1/Pak1/P38/MMP-2 Axis Regulates Angiogenesis in Ovarian Cancer.” *Clinical Cancer Research* 21 (9): 2127–37. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2279>.
- Gracia-Sancho, Jordi, Araní Casillas-Ramírez, and Carmen Peralta. 2015. “Molecular Pathways in Protecting the Liver from Ischaemia/Reperfusion Injury: A 2015 Update.” *Clinical Science* 129 (4): 345–62. <https://doi.org/10.1042/CS20150223>.
- Gu, Yanli, Jan Peter Sowa, Andreas Paul, Guido Gerken, and Joerg F. Schlaak. 2013. “Vascular Endothelial Growth Factor Improves Liver Regeneration and Survival after 90% Hepatectomy in a Rat Model of Diet-Induced Steatosis.” *Digestion* 88 (4): 235–42. <https://doi.org/10.1159/000355528>.
- Gulfo, José, Floriana Rotondo, Cindy G. Ávalos de León, María Eugenia Cornide-Petronio, Carla Fuster, Jordi Gracia-Sancho, Mónica B. Jiménez-Castro, and Carmen Peralta. 2020. “FGF15 Improves Outcomes after Brain Dead Donor Liver Transplantation with Steatotic and Non-Steatotic Grafts in Rats.” *Journal of Hepatology* 73 (5): 1131–43. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.05.007>.
- Guo, Wen-Ping, Jie Wang, Rui-Xi Li, and Yu-Wen Peng. 2006. “Neuroprotective Effects of Neuregulin-1 in Rat Models of Focal Cerebral Ischemia.” *Brain Research* 1087 (1): 180–85. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.007>.
- Hama, Yuka, Ichiro Yabe, Koichi Wakabayashi, Takahiro Kano, Makoto Hirotsu, Yuriko

- Iwakura, Jun Utsumi, and Hidenao Sasaki. 2015. "Level of Plasma Neuregulin-1 SMDF Is Reduced in Patients with Idiopathic Parkinson's Disease." *Neuroscience Letters* 587 (February): 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.12.024>.
- Hammad, Ahmed, Toshimi Kaido, and Shinji Uemoto. 2015. "Perioperative Nutritional Therapy in Liver Transplantation." *Surgery Today* 45 (3): 271–83. <https://doi.org/10.1007/s00595-014-0842-3>.
- Hammer, Alan, and Maria Diakonova. 2016. "Prolactin-Induced PAK1 Tyrosyl Phosphorylation Promotes FAK Dephosphorylation, Breast Cancer Cell Motility, Invasion and Metastasis." *BMC Cell Biology* 17 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0109-5>.
- Han, Qi, Huiling Chen, Likai Wang, Yang An, Xiaoxiang Hu, Yaofeng Zhao, Hao Zhang, and Ran Zhang. 2021. "Systemic Deficiency of GHR in Pigs Leads to Hepatic Steatosis via Negative Regulation of Ahr Signaling." *International Journal of Biological Sciences* 17 (15): 4108–21. <https://doi.org/10.7150/ijbs.64894>.
- Han, Sangbin, Sang Yun Ha, Cheol Keun Park, Jae Won Joh, Choon Hyuck D. Kwon, Ghee Young Kwon, Gaabsoo Kim, Mi Sook Gwak, Woo Kyoung Jeong, and Justin S. Ko. 2015. "Microsteatosis May Not Interact with Macrosteatosis in Living Donor Liver Transplantation." *Journal of Hepatology* 62 (3): 556–62. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.10.027>.
- Hardy, Timothy, Fiona Oakley, Quentin M. Anstee, and Christopher P. Day. 2016. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 11 (May): 451–96. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044224>.
- Hine, Christopher, Eylul Harputlugil, Yue Zhang, Christoph Ruckenstein, Byung Cheon Lee, Lear Brace, Alban Longchamp, et al. 2015. "Endogenous Hydrogen Sulfide Production Is Essential for Dietary Restriction Benefits." *Cell* 160 (1–2): 132–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.048>.
- Hoeven, J. A.B. Van Der, S. Lindell, R. Van Schilfgaarde, G. Molema, G. J. Ter Horst, J. H.

- Southard, and R. J. Ploeg. 2001. "Donor Brain Death Reduces Survival after Transplantation in Rat Livers Preserved for 20 HR." *Transplantation* 72 (10): 1632–36. <https://doi.org/10.1097/00007890-200111270-00009>.
- Hoeven, Joost A.B. Van Der, Gert J. Ter Horst, Grietje Molema, Paul De Vos, Armand R.J. Girbes, Folkert Postema, Reni L. Freund, Janneke Wiersema, Reinout Van Schilfgaarde, and Rutger J. Ploeg. 2000. "Effects of Brain Death and Hemodynamic Status on Function and Immunologic Activation of the Potential Donor Liver in the Rat." *Annals of Surgery* 232 (6): 804–13. <https://doi.org/10.1097/00000658-200012000-00009>.
- Holecek, M, and J Simek. 1988. "Different Effects of Glucose and Intralipid on the Onset of Liver Regeneration in the Early Period after Partial Hepatectomy in the Rat." *Experimental Pathology* 33 (4): 257–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3229461>.
- Holeček, Milan. 1999. "Nutritional Modulation of Liver Regeneration by Carbohydrates, Lipids, and Amino Acids: A Review." *Nutrition* 15 (10): 784–88. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(99\)00158-6](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(99)00158-6).
- Hsiao, Ing-Tsung, Kun-Ju Lin, Shi-Ing Chang, Tzu-Chen Yen, Tse-Ching Chen, and Ta-Sen Yeh. 2010. "Impaired Liver Regeneration of Steatotic Rats after Portal Vein Ligation: A Particular Emphasis on (99m)Tc-DISIDA Scintigraphy and Adiponectin Signaling." *Journal of Hepatology* 52 (4): 540–49. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.01.005>.
- Hu, Sheng, Yuxiang Fei, Chenchen Jin, Jun Yao, Haiyan Ding, Jianing Wang, and Chao Liu. 2024. "Ginsenoside Rd Enhances Blood-Brain Barrier Integrity after Cerebral Ischemia/Reperfusion by Alleviating Endothelial Cells Ferroptosis via Activation of NRG1/ErbB4-Mediated PI3K/Akt/MTOR Signaling Pathway." *Neuropharmacology* 251 (October 2023): 109929. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2024.109929>.
- Huang, Ming, Jinshun Zhang, Mengwei Li, Haowei Cao, Qiuju Zhu, and Dejun Yang. 2023. "PAK1 Contributes to Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury by Regulating

- the Blood-Brain Barrier Integrity.” *IScience* 26 (8): 107333.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107333>.
- Ibrahim, Samar H., Rohit Kohli, and Gregory J. Gores. 2011. “Mechanisms of Lipotoxicity in NAFLD and Clinical Implications.” *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 53 (2): 131–40.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31822578db>.
- Ido, Akio, Akihiro Moriuchi, Masatsugu Numata, Toshinori Murayama, Satoshi Teramukai, Hiroyuki Marusawa, Naohisa Yamaji, et al. 2011. “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.” *Journal of Translational Medicine* 9: 1–12.
<https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-55>.
- Iyer, Soumya C, Ashidha Gopal, and Devaraj Halagowder. 2015. “Myricetin Induces Apoptosis by Inhibiting P21 Activated Kinase 1 (PAK1) Signaling Cascade in Hepatocellular Carcinoma.” *Molecular and Cellular Biochemistry* 407 (1–2): 223–37. <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2471-6>.
- Jadhav, Prafulla V., Sunil Raviraj Kothakota, Madhu Sasidharan, Harish Kareem, and Ajith K. Nair. 2020. “Effect of Donor Hepatic Steatosis on Ischemia Reperfusion Injury in Liver Transplant Recipient.” *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 10 (3): 236–44. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2019.07.004>.
- Jagadeeshan, S, A Subramanian, S Tentu, S Beesetti, M Singhal, S Raghavan, R P Surabhi, et al. 2016. “P21-Activated Kinase 1 (Pak1) Signaling Influences Therapeutic Outcome in Pancreatic Cancer.” *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 27 (8): 1546–56.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdw184>.
- Jalilzad, Marzieh, Adele Jafari, and Parvin Babaei. 2019. “Neuregulin1 β Improves Both Spatial and Associative Learning and Memory in Alzheimer Model of Rats Possibly through Signaling Pathways Other than Erk1/2.” *Neuropeptides* 78 (December).
<https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.101963>.

- Jimenez-Castro, Monica B, Arani Casillas-Ramirez, Marta Massip-Salcedo, Maria Elias-Miro, Anna Serafin, Antoni Rimola, Juan Rodés, and Carmen Peralta. 2011. "Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate in Rat Steatotic Liver Transplantation." *Liver Transplantation : Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 17 (9): 1099–1110. <https://doi.org/10.1002/lt.22359>.
- Jiménez-Castro, M. B., M. Elias-Miro, M. Mendes-Braz, A. Lemoine, A. Rimola, J. Rodés, A. Casillas-Ramírez, and C. Peralta. 2012. "Tauroursodeoxycholic Acid Affects PPAR γ and TLR4 in Steatotic Liver Transplantation." *American Journal of Transplantation* 12 (12): 3257–71. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04261.x>.
- Jiménez-Castro, M B, M Elias-Miró, A Casillas-Ramírez, and C Peralta. 2013. "Experimental Models in Liver Surgery." In , edited by Hesham Abdeldayem, Ch. 6. Rijeka: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/51829>.
- Jiménez-Castro, M B, J Gracia-Sancho, and C Peralta. 2015. "Brain Death and Marginal Grafts in Liver Transplantation." *Cell Death & Disease* 6 (6): e1777–e1777. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.147>.
- Jiménez-Castro, Mónica B., Noelia Meroño, Mariana Mendes-Braz, Jordi Gracia-Sancho, Laia Martínez-Carreres, Maria Eugenia Cornide-Petronio, Araní Casillas-Ramirez, Juan Rodés, and Carmen Peralta. 2015. "The Effect of Brain Death in Rat Steatotic and Non-Steatotic Liver Transplantation with Previous Ischemic Preconditioning." *Journal of Hepatology* 62 (1): 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.031>.
- Jiménez-Castro, Mónica B., Elsa Negrete-Sánchez, Araní Casillas-Ramírez, Jose Gulfo, Ana I. Álvarez-Mercado, María Eugenia Cornide-Petronio, Jordi Gracia-Sancho, Juan Rodés, and Carmen Peralta. 2017. "The Effect of Cortisol in Rat Steatotic and Non-Steatotic Liver Transplantation from Brain-Dead Donors." *Clinical Science* 131 (8): 733–46. <https://doi.org/10.1042/CS20160676>.

- Jochmans, Ina, Steffen Fieuws, Ineke Tiekens, Undine Samuel, and Jacques Pirenne. 2018. "The Impact of Implantation Time During Liver Transplantation on Outcome: A Eurotransplant Cohort Study." *Transplantation Direct* 4 (6): e356. <https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000000793>.
- Kamada, N, and R Y Calne. 1979. "Orthotopic Liver Transplantation in the Rat. Technique Using Cuff for Portal Vein Anastomosis and Biliary Drainage." *Transplantation* 28 (1): 47–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/377595>.
- Kehat, Izhak, and Jeffery D. Molkenkin. 2010. "Molecular Pathways Underlying Cardiac Remodeling during Pathophysiological Stimulation." *Circulation* 122 (25): 2727–35. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.942268>.
- Kennedy, Lisa M., Steven C.D.L. Pham, and Alla Grishok. 2013. "Nonautonomous Regulation of Neuronal Migration by Insulin Signaling, DAF-16/FOXO, and PAK-1." *Cell Reports* 4 (5): 996–1009. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.045>.
- Khare, Vineeta, Kyle Dammann, Mario Asboth, Anita Krnjic, Manuela Jambrich, and Christoph Gasche. 2015. "Overexpression of PAK1 Promotes Cell Survival in Inflammatory Bowel Diseases and Colitis-Associated Cancer." *Inflammatory Bowel Diseases* 21 (2): 287–96. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000281>.
- Kim, Dae Hyun, Min Hi Park, Ki Wung Chung, Min Jo Kim, Daeui Park, Bonggi Lee, Eun Kyeong Lee, et al. 2015. "Suppression of FoxO6 by Lipopolysaccharide in Aged Rat Liver." *Oncotarget* 6 (33): 34143–57. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6219>.
- Kim, Kyung Ah, Wan Gu, In Ah Lee, Eun Ha Joh, and Dong Hyun Kim. 2012. "High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway." *PLoS ONE* 7 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047713>.
- Kinoshita, Y, K Go, T Yoshioka, and T Sugimoto. 1992. "Absence of Response to Hypothalamic Stimulation Test in Brain Death." *Neurologia Medico-Chirurgica* 32 (3): 153–56. <https://doi.org/10.2176/nmc.32.153>.
- Kivelä, Riikka, Maija Bry, Marius R. Robciuc, Markus Räsänen, Miia Taavitsainen,

- Johanna Mu Silvola, Antti Saraste, et al. 2014. "VEGF-B-Induced Vascular Growth Leads to Metabolic Reprogramming and Ischemia Resistance in the Heart." *EMBO Molecular Medicine* 6 (3): 307–21. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303147>.
- Koteish, A., and A. M. Diehl. 2001. "Animal Models of Steatosis." *Seminars in Liver Disease* 21 (1): 89–104. <https://doi.org/10.1055/s-2001-12932>.
- Kuboki, Satoshi, Thomas Shin, Nadine Huber, Thorsten Eismann, Elizabeth Galloway, Rebecca Schuster, John Blanchard, Michael J Edwards, and Alex B Lentsch. 2008. "Hepatocyte Signaling through CXC Chemokine Receptor-2 Is Detrimental to Liver Recovery after Ischemia/Reperfusion in Mice." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48 (4): 1213–23. <https://doi.org/10.1002/hep.22471>.
- Kumari, Sunita, Arka De, Naveen Kalra, and Virendra Singh. 2024. "Growth Hormone Therapy in Decompensated Cirrhosis: An Open-Label, Randomized Control Trial." *American Journal of Gastroenterology* 119 (1): 116–26. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000002300>.
- Kundu, Debjyoti, Lindsey Kennedy, Tianhao Zhou, Burcin Ekser, Vik Meadows, Amelia Sybenga, Konstantina Kyritsi, et al. 2023. "P16 INK4A Drives Nonalcoholic Fatty Liver Disease Phenotypes in High Fat Diet Fed Mice through Biliary E2F1/FOXO1/IGF-1 Signaling." *Hepatology* 78 (1): 243–57. <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000307>.
- Kupiec-Weglinski, J W, and R W Busuttil. 2005. "Ischemia and Reperfusion Injury in Liver Transplantation." *Transplantation Proceedings* 37 (4): 1653–56. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.03.134>.
- Kwong, Allison J., Noelle H. Ebel, W. Ray Kim, John R. Lake, Jodi M. Smith, David P. Schladt, Erin M. Schnellinger, et al. 2023. "OPTN/SRTR 2021 Annual Data Report: Liver." *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 23 (2S1): S178–263. <https://doi.org/10.1016/j.ajt.2023.02.006>.
- Lai, Xing, Junhua Gong, Weiming Wang, Ding Cao, Menghao Wang, Yiming Liu, Hao

- Wu, et al. 2019. "Acetyl-3-Aminoethyl Salicylate Ameliorates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury and Liver Graft Survival Through a High-Mobility Group Box 1/Toll-Like Receptor 4-Dependent Mechanism." *Liver Transplantation : Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 25 (8): 1220–32. <https://doi.org/10.1002/lt.25575>.
- Lal, Nathaniel, Karanjit Puri, and Brian Rodrigues. 2018. "Vascular Endothelial Growth Factor B and Its Signaling." *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 5 (April): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00039>.
- Lascaris, Bianca, Vincent E. de Meijer, and Robert J. Porte. 2022. "Normothermic Liver Machine Perfusion as a Dynamic Platform for Regenerative Purposes: What Does the Future Have in Store for Us?" *Journal of Hepatology* 77 (3): 825–36. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.04.033>.
- Lazzeri, Chiara, Manuela Bonizzoli, Stefano Batacchi, Cristiana Guetti, Walter Vessella, Alessandra Valletta, Alessandra Ottaviano, and Adriano Peris. 2023. "Haemodynamic Management in Brain Death Donors: Influence of Aetiology of Brain Death." *World Journal of Transplantation* 13 (4): 183–89. <https://doi.org/10.5500/wjt.v13.i4.183>.
- Lenihan, Daniel J, Sarah A Anderson, Carrie Geisberg Lenneman, Evan Brittain, James A S 3rd Muldowney, Lisa Mendes, Ping Z Zhao, et al. 2016. "A Phase I, Single Ascending Dose Study of Cimaglermin Alfa (Neuregulin 1 β 3) in Patients With Systolic Dysfunction and Heart Failure." *JACC. Basic to Translational Science* 1 (7): 576–86. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.09.005>.
- Leung, Kin Chuen, Nathan Doyle, Mercedes Ballesteros, Michael J. Waters, and Ken K.Y. Ho. 2000. "Insulin Regulation of Human Hepatic Growth Hormone Receptors: Divergent Effects on Biosynthesis and Surface Translocation." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85 (12): 4712–20. <https://doi.org/10.1210/jc.85.12.4712>.
- Lewis, Sloan A., Isaac R. Cinco, Brianna M. Doratt, Madison B. Blanton, Cherise

- Hoagland, Natali Newman, Michael Davies, Kathleen A. Grant, and Ilhem Messaoudi. 2023. "Chronic Alcohol Consumption Dysregulates Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in the Lung." *EBioMedicine* 97: 104812. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104812>.
- Li, Suyi, Guiqing Hou, Ying Wang, Xiangyu Su, and Lexun Xue. 2010. "Influence of Recombinant Human Growth Hormone (RhGH) on Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells with Positive and Negative Growth Hormone Receptors in Vitro." *Tumori* 96 (2): 282–88. <https://doi.org/10.1177/030089161009600216>.
- Li, Xuri, Anil Kumar, Fan Zhang, Chunsik Lee, and Zhongshu Tang. 2012. "Complicated Life, Complicated VEGF-B." *Trends in Molecular Medicine* 18 (2): 119–27. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.11.006>.
- Linares, Ivan, Kaveh Farrokhi, Juan Echeverri, Johan Moritz Kath, Dagmar Kollmann, Matyas Hamar, Peter Urbanellis, et al. 2018. "PPAR-Gamma Activation Is Associated with Reduced Liver Ischemia-Reperfusion Injury and Altered Tissue-Resident Macrophages Polarization in a Mouse Model." *PLoS ONE* 13 (4): 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195212>.
- Liu, Jiang, and Kwan Man. 2023. "Mechanistic Insight and Clinical Implications of Ischemia/Reperfusion Injury Post Liver Transplantation." *Cmgh* 15 (6): 1463–74. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2023.03.003>.
- Livak, K J, and T D Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lozanovski, Vladimir J., Bernd Döhler, Karl Heinz Weiss, Arianeb Mehrabi, and Caner Süsal. 2020. "The Differential Influence of Cold Ischemia Time on Outcome After Liver Transplantation for Different Indications—Who Is at Risk? A Collaborative Transplant Study Report." *Frontiers in Immunology* 11 (May): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00892>.
- Maceyka, Michael, Sergio E. Alvarez, Sheldon Milstien, and Sarah Spiegel. 2008.

- “Filamin A Links Sphingosine Kinase 1 and Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 at Lamellipodia To Orchestrate Cell Migration.” *Molecular and Cellular Biology* 28 (18): 5687–97. <https://doi.org/10.1128/mcb.00465-08>.
- Madathil, Sindhu K, and Kathryn E Saatman. 2015. “IGF-1/IGF-R Signaling in Traumatic Brain Injury: Impact on Cell Survival, Neurogenesis, and Behavioral Outcome.” In , edited by Firas H Kobeissy. Boca Raton (FL).
- Maier, Eva, Rachel C. Anderson, Eric Altermann, and Nicole C. Roy. 2018. “Live Faecalibacterium Prausnitzii Induces Greater TLR2 and TLR2/6 Activation than the Dead Bacterium in an Apical Anaerobic Co-Culture System.” *Cellular Microbiology* 20 (2): 1–11. <https://doi.org/10.1111/cmi.12805>.
- Manandhar, Sumeet, Ravinder Reddy Gaddam, Stephen Chambers, and Madhav Bhatia. 2024. “Kupffer Cell Inactivation Alters Endothelial Cell Adhesion Molecules in Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis.” *Biomolecules* 14 (1). <https://doi.org/10.3390/biom14010084>.
- Mao, Xin Li, Yue Cai, Ya Hong Chen, Yi Wang, Xiu Xiu Jiang, Li Ping Ye, and Shao Wei Li. 2022. “Novel Targets and Therapeutic Strategies to Protect Against Hepatic Ischemia Reperfusion Injury.” *Frontiers in Medicine* 8 (January): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.757336>.
- Medina, Jesús, Alicia G Arroyo, Francisco Sánchez-Madrid, and Ricardo Moreno-Otero. 2004. “Angiogenesis in Chronic Inflammatory Liver Disease.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 39 (5): 1185–95. <https://doi.org/10.1002/hep.20193>.
- Melincovici, Carmen Stanca, Adina Bianca Boşca, Sergiu Şuşman, Mariana Mărginean, Carina Mişu, Mihnea Istrate, Ioana Maria Moldovan, Alexandra Livia Roman, and Carmen Mihaela Mişu. 2018. “Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) – Key Factor in Normal and Pathological Angiogenesis.” *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 59 (2): 455–67.
- Mendes-Braz, Mariana, Maria Elias-Miró, Burkhard Kleuser, Susann Fayyaz, Mónica B. Jiménez-Castro, Marta Massip-Salcedo, Jordi Gracia-Sancho, Fernando S.

- Ramalho, Juan Rodes, and Carmen Peralta. 2014. "The Effects of Glucose and Lipids in Steatotic and Non-Steatotic Livers in Conditions of Partial Hepatectomy under Ischaemia-Reperfusion." *Liver International* 34 (7): 271–89. <https://doi.org/10.1111/liv.12348>.
- Meng, Di, Hongying Pan, Youwei Chen, Jiexia Ding, and Yining Dai. 2021. "Roles and Mechanisms of NRG1 in Modulating the Pathogenesis of NAFLD through ErbB3 Signaling in Hepatocytes (NRG1 Modulates NAFLD through ErbB3 Signaling)." *Obesity Research and Clinical Practice* 15 (2): 145–51. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2021.01.003>.
- Micó-Carnero, Marc, Carlos Rojano-Alfonso, Ana Isabel Álvarez-Mercado, Jordi Gracia-Sancho, Araní Casillas-Ramírez, and Carmen Peralta. 2021. "Effects of Gut Metabolites and Microbiota in Healthy and Marginal Livers Submitted to Surgery." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (1): 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijms22010044>.
- Micó-Carnero, Marc, Mohamed Amine Zaouali, Carlos Rojano-Alfonso, Cristina Maroto-Serrat, Hassen Ben Abdennebi, and Carmen Peralta. 2022. "A Potential Route to Reduce Ischemia/Reperfusion Injury in Organ Preservation." *Cells* 11 (17). <https://doi.org/10.3390/cells11172763>.
- Mishima, Yoshiyuki, Akihiko Oka, Bo Liu, Jeremy W. Herzog, Chang Soo Eun, Ting Jia Fan, Emily Bulik-Sullivan, et al. 2019. "Microbiota Maintain Colonic Homeostasis by Activating TLR2/MyD88/PI3K Signaling in IL-10-Producing Regulatory B Cells." *Journal of Clinical Investigation* 129 (9): 3702–16. <https://doi.org/10.1172/JCI93820>.
- Miyauchi, Tomoyuki, Yoichiro Uchida, Kentaro Kadono, Hirofumi Hirao, Junya Kawasoe, Takeshi Watanabe, Shugo Ueda, Hideaki Okajima, Hiroaki Terajima, and Shinji Uemoto. 2019. "Up-Regulation of FOXO1 and Reduced Inflammation by β -Hydroxybutyric Acid Are Essential Diet Restriction Benefits against Liver Injury." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (27): 13533–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820282116>.

- Møller, Niels, Lars C. Gormsen, Ole Schmitz, Sten Lund, Jens Otto L. Jørgensen, and Niels Jessen. 2009. "Free Fatty Acids Inhibit Growth Hormone/Signal Transducer and Activator of Transcription-5 Signaling in Human Muscle: A Potential Feedback Mechanism." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94 (6): 2204–7. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2624>.
- Møller, S, U Becker, M Grønbaek, A Juul, K Winkler, and N E Skakkebaek. 1994. "Short-Term Effect of Recombinant Human Growth Hormone in Patients with Alcoholic Cirrhosis." *Journal of Hepatology* 21 (5): 710–17. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(94\)80228-9](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(94)80228-9).
- Motegi, Satoko, Atsunori Tsuchiya, Takahiro Iwasawa, Takeki Sato, Masaru Kumagai, Kazuki Natsui, Shunsuke Nojiri, et al. 2022. "A Novel Prostaglandin I(2) Agonist, ONO-1301, Attenuates Liver Inflammation and Suppresses Fibrosis in Non-Alcoholic Steatohepatitis Model Mice." *Inflammation and Regeneration* 42 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/s41232-021-00191-6>.
- Muniyandi, Anbukkarasi, Gabriella D. Hartman, Yang Song, Mahmut Mijit, Mark R. Kelley, and Timothy W. Corson. 2023. "Beyond VEGF: Targeting Inflammation and Other Pathways for Treatment of Retinal Disease." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 386 (1): 15–25. <https://doi.org/10.1124/jpet.122.001563>.
- Nair-Collins, Michael, and Ari R. Joffe. 2021. *Hypothalamic Function in Patients Diagnosed as Brain Dead and Its Practical Consequences. Handbook of Clinical Neurology*. 1st ed. Vol. 182. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819973-2.00029-0>.
- Nevzorova, Yulia A., Zoe Boyer-Diaz, Francisco Javier Cubero, and Jordi Gracia-Sancho. 2020. "Animal Models for Liver Disease – A Practical Approach for Translational Research." *Journal of Hepatology* 73 (2): 423–40. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.011>.
- Novitzky D, Cooper DK, Morrell D, Isaacs S. 1988. "Change from Aerobic to Anaerobic Metabolism after Brain Death, and Reversal Following Triiodothyronine Therapy."

Transplantation 45 (1): 32–36. <https://doi.org/10.1097/00007890-198801000-00008>.

Novitzky, Dimitri, Zhibao Mi, Luis A. Videla, Joseph F. Collins, and David K.C. Cooper. 2016. “Thyroid Hormone Therapy and Procurement of Livers from Brain-Dead Donors.” *Endocrine Research* 41 (3): 270–73. <https://doi.org/10.3109/07435800.2015.1111902>.

Ocaranza, Paula, Germán Íñiguez, M. Cecilia Johnson, and Fernando Cassorla. 2021. “Differential Effects of Androgens and Estrogens over Cellular GH Sensitivity in HEPG2 Cells.” *Growth Hormone and IGF Research* 57–58 (March). <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2021.101390>.

Olarescu NC, Gunawardane K, Hansen TK, Møller N, Jørgensen JOL. 2019. “Normal Physiology of Growth Hormone in Adults.” In *Endotext*, 1–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905284>.

ONT. 2023. “Memoria de Actividad de Donación y Trasplante Hepático - España 2022.”

Papegay, Bérengère, Michaela Stadler, Vincent Nuyens, Véronique Kruys, Jean G. Boogaerts, and Joseph Vamecq. 2017. “Short Fasting Does Not Protect Perfused Ex Vivo Rat Liver against Ischemia-Reperfusion. On the Importance of a Minimal Cell Energy Charge.” *Nutrition* 35: 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.10.008>.

Parekh, Palak, Leena Motiwale, Nishigandha Naik, and K V K Rao. 2011. “Downregulation of Cyclin D1 Is Associated with Decreased Levels of P38 MAP Kinases, Akt/PKB and Pak1 during Chemopreventive Effects of Resveratrol in Liver Cancer Cells.” *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie* 63 (1–2): 167–73. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.11.005>.

Parker, Marcus W, Yong Chen, John M Hallenbeck, and Byron D Ford. 2002. “Neuregulin Expression after Focal Stroke in the Rat.” *Neuroscience Letters* 334 (3): 169–72. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)01126-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)01126-6).

- Paterno, Flavio, James V. Guarrera, Koffi Wima, Tayyab Diwan, Madison C. Cuffy, Nadeem Anwar, E. Steve Woodle, and Shimul Shah. 2019. "Clinical Implications of Donor Warm and Cold Ischemia Time in Donor After Circulatory Death Liver Transplantation." *Liver Transplantation* 25 (9): 1342–52. <https://doi.org/10.1002/lt.25453>.
- Peralta, Carmen, Neus Prats, Carme Xaus, Emilio Gelpí, and Joan Roselló-Catafau. 1999. "Protective Effect of Liver Ischemic Preconditioning on Liver and Lung Injury Induced by Hepatic Ischemia-Reperfusion in the Rat." *Hepatology* 30 (6): 1481–89. <https://doi.org/10.1002/hep.510300622>.
- Peralta, Carmen, Mónica B. Jiménez-Castro, and Jordi Gracia-Sancho. 2013. "Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury: Effects on the Liver Sinusoidal Milieu." *Journal of Hepatology* 59 (5): 1094–1106. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.06.017>.
- Petrinovic, Marija M., Carri S. Duncan, Dimitris Bourikas, Oliver Weinman, Laura Montani, Aileen Schroeter, David Maerki, Lukas Sommer, Esther T. Stoeckli, and Martin E. Schwab. 2010. "Neuronal Nogo-A Regulates Neurite Fasciculation, Branching and Extension in the Developing Nervous System." *Development* 137 (15): 2539–50. <https://doi.org/10.1242/dev.048371>.
- Pollok, Joerg M., Pascale Tinguely, Marina Berenguer, Claus U. Niemann, Dimitri A. Raptis, Michael Spiro, Andreas Mayr, et al. 2023. "Enhanced Recovery for Liver Transplantation: Recommendations from the 2022 International Liver Transplantation Society Consensus Conference." *The Lancet Gastroenterology and Hepatology* 8 (1): 81–94. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00268-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00268-0).
- Powell, Elizabeth E., Vincent Wai Sun Wong, and Mary Rinella. 2021. "Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *The Lancet* 397 (10290): 2212–24. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32511-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32511-3).
- Psichas, A, M L Sleeth, K G Murphy, L Brooks, G A Bewick, A C Hanyaloglu, M A Ghatei, S R Bloom, and G Frost. 2015. "The Short Chain Fatty Acid Propionate Stimulates GLP-1 and PYY Secretion via Free Fatty Acid Receptor 2 in Rodents." *International*

Journal of Obesity 39 (3): 424–29. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.153>.

Qi, Bo, Xiao-Qiang Wang, Shu-Ting Pan, Pei-Ying Li, Ling-Ke Chen, Qiang Xia, Li-Qun Yang, and Wei-Feng Yu. 2021. “Effect of Remote Ischemic Preconditioning among Donors and Recipients Following Pediatric Liver Transplantation: A Randomized Clinical Trial.” *World Journal of Gastroenterology*. United States. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i4.345>.

Qiao, Meng, Paul Shapiro, Rakesh Kumar, and Antonino Passaniti. 2004. “Insulin-like Growth Factor-1 Regulates Endogenous RUNX2 Activity in Endothelial Cells through a Phosphatidylinositol 3-Kinase/ERK-Dependent and Akt-Independent Signaling Pathway.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (41): 42709–18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404480200>.

Qin, Ying, and Ya ping Tian. 2010. “Exploring the Molecular Mechanisms Underlying the Potentiation of Exogenous Growth Hormone on Alcohol-Induced Fatty Liver Diseases in Mice.” *Journal of Translational Medicine* 8: 1–15. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-120>.

Radic, I., M. Mijovic, N. Tatalovic, M. Mitic, V. Lukic, B. Joksimovic, Z. Petrovic, et al. 2019. “Protective Effects of Whey on Rat Liver Damage Induced by Chronic Alcohol Intake.” *Human and Experimental Toxicology* 38 (6): 632–45. <https://doi.org/10.1177/0960327119829518>.

Rafaqat, Sana, Aqsa Sattar, Amber Khalid, and Saira Rafaqat. 2023. “Role of Liver Parameters in Diabetes Mellitus - a Narrative Review.” *Endocrine Regulations* 57 (1): 200–220. <https://doi.org/10.2478/enr-2023-0024>.

Raissadati, Alireza, Raimo Tuuminen, Alexey Dashkevich, Maija Bry, Riikka Kivelä, Andrey Anisimov, Simo Syrjälä, et al. 2017. “Vascular Endothelial Growth Factor-B Overexpressing Hearts Are Not Protected from Transplant-Associated Ischemia-Reperfusion Injury.” *Experimental and Clinical Transplantation* 15 (2): 203–12. <https://doi.org/10.6002/ect.2016.0181>.

Ran, Tao, Yong Liu, Hengzhi Li, Shaoxun Tang, Zhixiong He, Cristian R. Munteanu,

- Humberto Gonzalez-Diaz, Zhiliang Tan, and Chuanshe Zhou. 2016. "Gastrointestinal Spatiotemporal mRNA Expression of Ghrelin vs Growth Hormone Receptor and New Growth Yield Machine Learning Model Based on Perturbation Theory." *Scientific Reports* 6 (April): 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep30174>.
- Randell, T T, and K A Höckerstedt. 1993. "Triiodothyronine Treatment Is Not Indicated in Brain-Dead Multiorgan Donors: A Controlled Study." *Transplantation Proceedings* 25 (1 Pt 2): 1552–53.
- Reis-Júnior, Paulo, Ryan Tanigawa, Gustavo Heluani Antunes de Mesquita, Natalia Basan, Venâncio Alves, Luiz Augusto Carneiro D'albuquerque, and Wellington Andraus. 2019. "Steatosis and Steatohepatitis Found in Adults after Death Due to Non-Burn Trauma." *Clinics* 74 (7): 1–8. <https://doi.org/10.6061/clinics/2019/e1070>.
- Rosser, Elizabeth C., Kristine Oleinika, Silvia Tonon, Ronan Doyle, Anneleen Bosma, Natalie A. Carter, Kathryn A. Harris, Simon A. Jones, Nigel Klein, and Claudia Mauri. 2014. "Regulatory B Cells Are Induced by Gut Microbiota-Driven Interleukin-1 β and Interleukin-6 Production." *Nature Medicine* 20 (11): 1334–39. <https://doi.org/10.1038/nm.3680>.
- Rufinatscha, Kerstin, Claudia Ress, Sabrina Folie, Simone Haas, Karin Salzmänn, Patrizia Moser, Jochen Dobner, et al. 2018. "Metabolic Effects of Reduced Growth Hormone Action in Fatty Liver Disease." *Hepatology International* 12 (5): 474–81. <https://doi.org/10.1007/s12072-018-9893-7>.
- Rupert, Cassady E., and Karen L.K. Coulombe. 2017. "IGF1 and NRG1 Enhance Proliferation, Metabolic Maturity, and the Force-Frequency Response in HESC-Derived Engineered Cardiac Tissues." *Stem Cells International* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7648409>.
- Sakakura, Y, M Kaibori, M Oda, T Okumura, A H Kwon, and Y Kamiyama. 2000. "Recombinant Human Hepatocyte Growth Factor Protects the Liver against Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury in Rats." *The Journal of Surgical*

Research 92 (2): 261–66. <https://doi.org/10.1006/jsre.2000.5913>.

Sarmiento-Cabral, Andre, Mercedes Del Rio-Moreno, Mari C. Vazquez-Borrego, Mariyah Mahmood, Elena Gutierrez-Casado, Natalie Pelke, Grace Guzman, et al. 2021. “GH Directly Inhibits Steatosis and Liver Injury in a Sex-Dependent and IGF1-Independent Manner.” *Journal of Endocrinology* 248 (1): 31–44. <https://doi.org/10.1530/JOE-20-0326>.

Sato, T, O N El-Assal, T Ono, A Yamanoi, D K Dhar, and N Nagasue. 2001. “Sinusoidal Endothelial Cell Proliferation and Expression of Angiopoietin/Tie Family in Regenerating Rat Liver.” *Journal of Hepatology* 34 (5): 690–98. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(00\)00109-4](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(00)00109-4).

Schäfer, T. V., Ju Ju Ivnitsky, and V. L. Rejniuk. 2019. “Permeability of Intestinal and Blood—Tissue Barriers in Rats for Evans Blue Dye under Conditions of Acute Intoxication with Cyclophosphamide.” *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 168 (1): 38–40. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04640-8>.

Schlegel, Andrea, Philipp Kron, Rolf Graf, Philipp Dutkowski, and Pierre Alain Clavien. 2014. “Warm vs. Cold Perfusion Techniques to Rescue Rodent Liver Grafts.” *Journal of Hepatology* 61 (6): 1267–75. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.023>.

Segnani, Cristina, Chiara Ippolito, Luca Antonioli, Carolina Pellegrini, Corrado Blandizzi, Amelio Dolfi, and Nunzia Bernardini. 2015. “Histochemical Detection of Collagen Fibers by Sirius Red/Fast Green Is More Sensitive than van Gieson or Sirius Red Alone in Normal and Inflamed Rat Colon.” *PloS One* 10 (12): e0144630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144630>.

Selzner, Markus, Hannes A. RüDiger, David Sindram, John Madden, and Pierre Alain Clavien. 2000. “Mechanisms of Ischemic Injury Are Different in the Steatotic and Normal Rat Liver.” *Hepatology* 32 (6): 1280–88. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.20528>.

Selzner, Nazia, Markus Selzner, Wolfram Jochum, and Pierre Alain Clavien. 2003.

- “Ischemic Preconditioning Protects the Steatotic Mouse Liver against Reperfusion Injury: An ATP Dependent Mechanism.” *Journal of Hepatology* 39 (1): 55–61. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00147-8).
- Seo, Hyang Hee, Se Yeon Lee, Chang Youn Lee, Ran Kim, Pilseog Kim, Sekyung Oh, Hojin Lee, et al. 2017. “Exogenous MiRNA-146a Enhances the Therapeutic Efficacy of Human Mesenchymal Stem Cells by Increasing Vascular Endothelial Growth Factor Secretion in the Ischemia/Reperfusion-Injured Heart.” *Journal of Vascular Research* 54 (2): 100–108. <https://doi.org/10.1159/000461596>.
- Serafín, Anna, Joan Roselló-Catafau, Neus Prats, Carme Xaus, Emilio Gelpí, and Carmen Peralta. 2002. “Ischemic Preconditioning Increases the Tolerance of Fatty Liver to Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat.” *American Journal of Pathology* 161 (2): 587–601. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64214-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64214-9).
- Serviddio, Gaetano, Juan Sastre, Francesco Bellanti, José Viña, Gianluigi Vendemiale, and Emanuele Altomare. 2008. “Mitochondrial Involvement in Non-Alcoholic Steatohepatitis.” *Molecular Aspects of Medicine* 29 (1–2): 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2007.09.014>.
- Shen, Hao, Han Yu, Qian yu Li, Ya ting Wei, Jing Fu, Hui Dong, Dan Cao, et al. 2022. “Hepatocyte-Derived VEGFA Accelerates the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease to Hepatocellular Carcinoma via Activating Hepatic Stellate Cells.” *Acta Pharmacologica Sinica*, no. December 2021. <https://doi.org/10.1038/s41401-022-00907-5>.
- Shen, Zhijie, Zhihui Zhang, Xiaoyan Wang, and Kan Yang. 2018. “VEGFB-VEGFR1 Ameliorates Ang II-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy through Ca²⁺-Mediated PKG I Pathway.” *Journal of Cellular Biochemistry* 119 (2): 1511–20. <https://doi.org/10.1002/jcb.26311>.
- Sibulesky, Lena, Meng Li, Ryan N. Hansen, Andre A.S. Dick, Martin I. Montenovo, Stephen C. Rayhill, Ramasamy Bakthavatsalam, and Jorge D. Reyes. 2016. “Impact of Cold Ischemia Time on Outcomes of Liver Transplantation: A Single Center Experience.” *Annals of Transplantation* 21: 145–51.

<https://doi.org/10.12659/AOT.896190>.

Sindram, David, Robert J. Porte, Maureane R. Hoffman, Rex C. Bentley, and Pierre Alain Clavien. 2000. "Platelets Induce Sinusoidal Endothelial Cell Apoptosis upon Reperfusion of the Cold Ischemic Rat Liver." *Gastroenterology* 118 (1): 183–91. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(00\)70427-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(00)70427-6).

Slevin, Elise, Leonardo Baiocchi, Nan Wu, Burcin Ekser, Keisaku Sato, Emily Lin, Ludovica Ceci, et al. 2020. "Kupffer Cells: Inflammation Pathways and Cell-Cell Interactions in Alcohol-Associated Liver Disease." *American Journal of Pathology* 190 (11): 2185–93. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.08.014>.

Stanley, Takara L., Lindsay T. Fourman, Isabel Zheng, Colin M. McClure, Meghan N. Feldpausch, Martin Torriani, Kathleen E. Corey, et al. 2021. "Relationship of IGF-1 and IGF-Binding Proteins to Disease Severity and Glycemia in Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 106 (2): E520–33. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa792>.

Stroh, J N, Tellen D Bennett, Vitaly Kheyfets, and David Albers. 2021. "Clinical Decision Support for Traumatic Brain Injury: Identifying a Framework for Practical Model-Based Intracranial Pressure Estimation at Multihour Timescales." *JMIR Medical Informatics* 9 (3): e23215. <https://doi.org/10.2196/23215>.

Sun, Meng Fei, Ying Li Zhu, Zhi Lan Zhou, Xue Bing Jia, Yi Da Xu, Qin Yang, Chun Cui, and Yan Qin Shen. 2018. "Neuroprotective Effects of Fecal Microbiota Transplantation on MPTP-Induced Parkinson's Disease Mice: Gut Microbiota, Glial Reaction and TLR4/TNF- α Signaling Pathway." *Brain, Behavior, and Immunity* 70: 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.02.005>.

Szabo, Gyongyi. 2015. "Gut-Liver Axis in Alcoholic Liver Disease." *Gastroenterology* 148 (1): 30–36. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.10.042>.

Takahashi, Kazuhide, Tacu Tanaka, and Katsuo Suzuki. 2010. "Directional Control of WAVE2 Membrane Targeting by EB1 and Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate." *Cellular Signalling* 22 (3): 510–18.

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.11.005>.

Takahashi, Yutaka. 2017. "The Role of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor-I in the Liver." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms18071447>.

Tan, Huajun, Weijian Yang, Chenggang Wu, Baolong Liu, Hao Lu, Hong Wang, and Hua Yan. 2017. "Assessment of the Role of Intracranial Hypertension and Stress on Hippocampal Cell Apoptosis and Hypothalamic-Pituitary Dysfunction after TBI." *Scientific Reports* 7 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04008-w>.

Tang, Shen Ping, Xin Li Mao, Ya Hong Chen, Ling Ling Yan, Li Ping Ye, and Shao Wei Li. 2022. "Reactive Oxygen Species Induce Fatty Liver and Ischemia-Reperfusion Injury by Promoting Inflammation and Cell Death." *Frontiers in Immunology* 13 (April): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.870239>.

Tateno, Chise, Miho Kataoka, Rie Utoh, Asato Tachibana, Toshiyuki Itamoto, Toshimasa Asahara, Fuyuki Miya, Tatsuhiko Tsunoda, and Katsutoshi Yoshizato. 2011. "Growth Hormone-Dependent Pathogenesis of Human Hepatic Steatosis in a Novel Mouse Model Bearing a Human Hepatocyte-Repopulated Liver." *Endocrinology* 152 (4): 1479–91. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0953>.

Teo, Jin Yao, Andrew F W Ho, Heerajnarain Bulluck, Fei Gao, Jun Chong, Ye Xin Koh, Ek Khoon Tan, et al. 2020. "Effect of Remote Ischemic PreConditioning on Liver Injury in Patients Undergoing Liver Resection: The ERIC-LIVER Trial." *HPB: The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 22 (9): 1250–57. <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2019.12.002>.

Terrault, Norah A., Claire Francoz, Marina Berenguer, Michael Charlton, and Julie Heimbach. 2023. "Liver Transplantation 2023: Status Report, Current and Future Challenges." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 21 (8): 2150–66. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2023.04.005>.

Tokita, Y, H Keino, F Matsui, S Aono, H Ishiguro, S Higashiyama, and A Oohira. 2001. "Regulation of Neuregulin Expression in the Injured Rat Brain and Cultured

Astrocytes." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (4): 1257–64. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-04-01257.2001>.

Trebicka, Jonel, Jane Macnaughtan, Bernd Schnabl, Debbie L. Shawcross, and Jasmohan S. Bajaj. 2021. "The Microbiota in Cirrhosis and Its Role in Hepatic Decompensation." *Journal of Hepatology* 75: S67–81. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.013>.

Trifunović, Svetlana, Milica Manojlović-Stojanoski, Nataša Ristić, Branka Šošić Jurijević, Snežana Raus Balind, Gordana Brajković, Florina Perčinić-Popovska, and Verica Milošević. 2016. "Effects of Prolonged Alcohol Exposure on Somatotrophs and Corticotrophs in Adult Rats: Stereological and Hormonal Study." *Acta Histochemica* 118 (4): 353–60. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.03.005>.

Vatsalya, Vatsalya, Julnar E. Issa, Daniel W. Hommer, and Vijay A. Ramchandani. 2012. "Pharmacodynamic Effects of Intravenous Alcohol on Hepatic and Gonadal Hormones: Influence of Age and Sex." *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 36 (2): 207–13. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01600.x>.

Veteläinen, Reeta, Arlène van Vliet, Dirk J Gouma, and Thomas M van Gulik. 2007. "Steatosis as a Risk Factor in Liver Surgery." *Annals of Surgery* 245 (1): 20–30. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000225113.88433.cf>.

Wang, Ran, Yumei Wang, Rui Hu, Xingshi Chen, Mei Song, and Xueyi Wang. 2015. "Decreased Plasma Levels of Neureglin-1 in Drug Naïve Patients and Chronic Patients with Schizophrenia." *Neuroscience Letters* 606 (October): 220–24. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.09.010>.

Wejman, Jaroslaw, Michal Pyzlak, Dariusz Szukiewicz, Dorota Jarosz, Wieslaw Tarnowski, and Grzegorz Szewczyk. 2013. "Thrombospondin and VEGF-R: Is There a Correlation in Inflammatory Bowel Disease?" *Mediators of Inflammation* 2013: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/908259>.

Werr, Lisa, Dennis Plenker, Marcel A. Dammert, Carina Lorenz, Johannes Brägelmann,

- Hannah L. Tumbrink, Sebastian Klein, et al. 2022. "CD74-NRG1 Fusions Are Oncogenic In Vivo and Induce Therapeutically Tractable ERBB2:ERBB3 Heterodimerization." *Molecular Cancer Therapeutics* 21 (5): 821–30. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-21-0820>.
- Wong, Leo Lap-Yan, Ian Pak-Yan Lam, Tracy Yuk-Nar Wong, Wai-Lung Lai, Heong-Fai Liu, Lam-Lung Yeung, and Yick-Pang Ching. 2013. "IPA-3 Inhibits the Growth of Liver Cancer Cells by Suppressing PAK1 and NF-KB Activation." *PloS One* 8 (7): e68843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068843>.
- Worthington, Jenny, Mariana Bertani, Hong Lin Chan, Bertran Gerrits, and John F. Timms. 2010. "Transcriptional Profiling of ErbB Signalling in Mammary Luminal Epithelial Cells - Interplay of ErbB and IGF1 Signalling through IGFBP3 Regulation." *BMC Cancer* 10 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-490>.
- Wu, Jiazhen, Yuxuan Gan, Muxia Li, Liping Chen, Jiali Liang, Jianyi Zhuo, Huijuan Luo, et al. 2020. "Patchouli Alcohol Attenuates 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis via TLR2/MyD88/NF-KB Pathway and Regulation of Microbiota." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 124 (October 2019): 109883. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109883>.
- Wu, Xiaoqin, Xiude Fan, Tatsunori Miyata, Adam Kim, Christina K. Cajigas-Du Ross, Semanti Ray, Emily Huang, et al. 2023. "Recent Advances in Understanding of Pathogenesis of Alcohol-Associated Liver Disease." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 18: 411–38. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-031521-030435>.
- Xu, Jin, Blayne Amir Sayed, Ana Maria Casas-Ferreira, Parthi Srinivasan, Nigel Heaton, Mohammed Rela, Yun Ma, Susan Fuggle, Cristina Legido-Quigley, and Wayel Jassem. 2016. "The Impact of Ischemia/Reperfusion Injury on Liver Allografts from Deceased after Cardiac Death versus Deceased after Brain Death Donors." *PLoS ONE* 11 (2): 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148815>.
- Younossi, Zobair, Quentin M. Anstee, Milena Marietti, Timothy Hardy, Linda Henry, Mohammed Eslam, Jacob George, and Elisabetta Bugianesi. 2018. "Global Burden

- of NAFLD and NASH: Trends, Predictions, Risk Factors and Prevention.” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 15 (1): 11–20. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109>.
- Zabielski, Piotr, Marcin Baranowski, Agnieszka Błachnio-Zabielska, Małgorzata Zendzian-Piotrowska, and Jan Górski. 2010. “The Effect of High-Fat Diet on the Sphingolipid Pathway of Signal Transduction in Regenerating Rat Liver.” *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 93 (3–4): 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2010.06.006>.
- Zaouali, M. Amine, Susagna Padriša-Altés, Ismail Ben Mosbah, Izabel Alfany-Fernandez, Marta Massip-Salcedo, Araní Casillas-Ramirez, María Bintanel-Morcillo, et al. 2010. “Improved Rat Steatotic and Nonsteatotic Liver Preservation by the Addition of Epidermal Growth Factor and Insulin-like Growth Factor-I to University of Wisconsin Solution.” *Liver Transplantation* 16 (9): 1098–1111. <https://doi.org/10.1002/lt.22126>.
- Zhang, Hanwen, Ming Ni, Han Wang, Jing Zhang, Dan Jin, Ronald W. Busuttil, Jerzy W. Kupiec-Weglinski, Wei Li, Xuehao Wang, and Yuan Zhai. 2023. “Gsk3 β Regulates the Resolution of Liver Ischemia/Reperfusion Injury via MerTK.” *JCI Insight* 8 (1). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.151819>.
- Zhang, Feng, Georgia Zarkada, Jinah Han, Jinyu Li, Alexandre Dubrac, Roxana Ola, Gael Genet, et al. 2018. “Lacteal Junction Zippering Protects against Diet-Induced Obesity.” *Science* 361 (6402): 599–603. <https://doi.org/10.1126/science.aap9331>.
- Zhang, Peng, Henry Kuang, Yanlin He, Sharon O. Idiga, Siming Li, Zhimin Chen, Zhao Yang, et al. 2018. “NRG1-Fc Improves Metabolic Health via Dual Hepatic and Central Action.” *JCI Insight* 3 (5). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98522>.
- Zhang, Wenpei, Lei Sun, Hongxia Gao, and Shengquan Wang. 2023. “Mechanism of the HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 Pathway in the Proliferation and Apoptosis of Human Haemangioma Endothelial Cells.” *International Journal of Experimental Pathology* 104 (5): 258–68. <https://doi.org/10.1111/iep.12485>.

- Zhang, Zhi-Lei, Guang-Chao Liu, Li Peng, Chong Zhang, Yu-Ming Jia, Wu-Han Yang, and Lei Mao. 2018. "Effect of PAK1 Gene Silencing on Proliferation and Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines MHCC97-H and HepG2 and Cells in Xenograft Tumor." *Gene Therapy* 25 (4): 284–96. <https://doi.org/10.1038/s41434-018-0016-9>.
- Zhao, Li, Yi Chen, Fangzhen Xia, Buatikamu Abudukerimu, Wen Zhang, Yuyu Guo, Ningjian Wang, and Yingli Lu. 2018. "A Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonist Lowers Weight by Modulating the Structure of Gut Microbiota." *Frontiers in Endocrinology* 9 (MAY): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00233>.
- Zhong, Wentao, Xueqing Wang, Yufei Wang, Guoqian Sun, Jia Zhang, and Zhuo Li. 2023. "Obesity and Endocrine-Related Cancer: The Important Role of IGF-1." *Frontiers in Endocrinology* 14 (January): 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1093257>.
- Zhou, Y., T. Zhang, Y. Y. Zhang, J. Xu, M. Li, Q. Zhang, Z. Qiao, and K. Yang. 2023. "Expression and Distribution of Erythropoietin, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF Receptor 2 in Small Intestine of Yaks at Different Ages." *Folia Morphologica* 82 (3): 683–95. <https://doi.org/10.5603/FM.a2022.0058>.
- Zmora, Niv, Jotham Suez, and Eran Elinav. 2019. "You Are What You Eat: Diet, Health and the Gut Microbiota." *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 16 (1): 35–56. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0061-2>.

Anexos

ANEXOS

Los artículos originados directa y estrechamente relacionados con el tema de la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1) **Micó-Carnero, M.***, Casillas-Ramírez, A.*, Caballeria-Casals, A., Rojano-Alfonso, C., Sánchez-González, A., & Peralta, C. (2021). Role of Dietary Nutritional Treatment on Hepatic and Intestinal Damage in Transplantation with Steatotic and Non-Steatotic Liver Grafts from Brain Dead Donors. *Nutrients*, 13(8), 2554. <https://doi.org/10.3390/nu13082554>

IF: 6.706

- 2) **Micó-Carnero, M.***, Casillas-Ramírez, A.*, Sánchez-González, A., Rojano-Alfonso, C., & Peralta, C. (2022). The Role of Neuregulin-1 in Steatotic and Non-Steatotic Liver Transplantation from Brain-Dead Donors. *Biomedicines*, 10(5), 978. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10050978>

IF: 4.7

- 3) **Micó-Carnero, M.***, Rojano-Alfonso, C.*, Maroto-Serrat C., Cutrin, JC., Casillas-Ramírez A. and Peralta C. (2024). Relevance of the GH-VEGFB/VEGFA axis in liver grafts from brain-dead donors with alcohol-associated liver disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Submitted under review).

IF: 4.6

- 4) Rojano-Alfonso C.*, **Micó-Carnero M***, Maroto-Serrat C., Casillas-Ramírez A. and Peralta C. (2024). Role of VEGFA on Hepatic Damage and Regeneration Failure in Type 2 Diabetes Mellitus Rats Submitted to Partial Hepatectomy Under Vascular Occlusion. *Cells*. (Submitted under review).

IF: 5.1

-
- 5) Casillas-Ramírez, A., **Micó-Carnero, M.**, Sánchez-González, A., Maroto-Serrat, C., Trostchansky, A., & Peralta, C. (2023). NO-IL-6/10-IL-1 β axis: a new pathway in steatotic and non-steatotic liver grafts from brain-dead donor rats. *Frontiers in immunology*, 14, 1178909. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1178909>
IF: 5.7
- 6) **Micó-Carnero, M.***, Rojano-Alfonso, C.* , Álvarez-Mercado, A. I., Gracia-Sancho, J., Casillas-Ramírez, A., & Peralta, C. (2020). Effects of Gut Metabolites and Microbiota in Healthy and Marginal Livers Submitted to Surgery. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 44. <https://doi.org/10.3390/ijms22010044>
IF: 5.924
- 7) **Micó-Carnero, M.**, Zaouali, M. A., Rojano-Alfonso, C., Maroto-Serrat, C., Ben Abdennebi, H., & Peralta, C. (2022). A Potential Route to Reduce Ischemia/Reperfusion Injury in Organ Preservation. *Cells*, 11(17), 2763. <https://doi.org/10.3390/cells11172763>
IF: 6.0
- 8) Caballeria-Casals, A.* , **Micó-Carnero, M.***, Rojano-Alfonso, C., Maroto-Serrat, C., Casillas-Ramírez, A., Álvarez-Mercado, A. I., Gracia-Sancho, J., & Peralta, C. (2021). Role of FGF15 in Hepatic Surgery in the Presence of Tumorigenesis: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?. *Cells*, 10(6), 1421. <https://doi.org/10.3390/cells10061421>
IF: 7.666
- 9) Álvarez-Mercado, A. I.* , Rojano-Alfonso, C.* , **Micó-Carnero, M.**, Caballeria-Casals, A., Peralta, C., & Casillas-Ramírez, A. (2021). New Insights Into the Role of Autophagy in Liver Surgery in the Setting of Metabolic Syndrome and Related Diseases. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 670273. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.670273>
IF: 6.081

10) Álvarez-Mercado, A. I., Caballeria-Casals, A., Rojano-Alfonso, C., Chávez-Reyes, J., **Micó-Carnero, M.**, Sanchez-Gonzalez, A., Casillas-Ramírez, A., Gracia-Sancho, J., & Peralta, C. (2021). Insights into Growth Factors in Liver Carcinogenesis and Regeneration: An Ongoing Debate on Minimizing Cancer Recurrence after Liver Resection. *Biomedicines*, *9*(9), 1158.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9091158>

IF: 4.757

11) **Micó-Carnero, M.**, Trostchansky, A., Peralta, C. (2023). Editorial: Pathological livers in the surgery of hepatic resections and liver transplantation, 175olumen II. *Frontiers in medicine*, *10*, 1330122.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1330122>

IF: 3.1

*Han contribuido de igual manera a este artículo como primer autor.

Article

Role of Dietary Nutritional Treatment on Hepatic and Intestinal Damage in Transplantation with Steatotic and Non-Steatotic Liver Grafts from Brain Dead Donors

Marc Micó-Camero ^{1,†}, Araní Casillas-Ramírez ^{2,3,†}, Albert Caballeria-Casals ¹, Carlos Rojano-Alfonso ¹, Alfredo Sánchez-González ² and Carmen Peralta ^{1,*}

¹ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; mico@clinic.cat (M.M.-C.); acabalca31@alumnes.ub.edu (A.C.-C.); rojano@clinic.cat (C.R.-A.)

² Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria "Bicentenario 2010", 87087 Ciudad Victoria, Mexico; aranyc@yahoo.com (A.C.-R.); asg_4@live.com (A.S.-G.)

³ Facultad de Medicina e Ingeniería en Sistemas Computacionales de Matamoros, Universidad Autónoma de Tamaulipas, 87300 Matamoros, Mexico

* Correspondence: cperalta@clinic.cat; Tel.: +34-932-275-400

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Micó-Camero, M.;

Casillas-Ramírez, A.;

Caballeria-Casals, A.; Rojano-Alfonso,

C.; Sánchez-González, A.; Peralta, C.

Role of Dietary Nutritional Treatment

on Hepatic and Intestinal Damage in

Transplantation with Steatotic and

Non-Steatotic Liver Grafts from Brain

Dead Donors. *Nutrients* **2021**, *13*, 2554.

<https://doi.org/10.3390/nu13082554>

Academic Editor: Pietro Vajro

Received: 16 June 2021

Accepted: 22 July 2021

Published: 26 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article

distributed under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Abstract: Herein, we investigate whether: (1) the administration of glucose or a lipid emulsion is useful in liver transplantation (LT) using steatotic (induced genetically or nutritionally) or non-steatotic livers from donors after brain death (DBDs); and (2) any such benefits are due to reductions in intestinal damage and consequently to gut microbiota preservation. In recipients from DBDs, we show increased hepatic damage and failure in the maintenance of ATP, glycogen, phospholipid and growth factor (HGF, IGF1 and VEGFA) levels, compared to recipients from non-DBDs. In recipients of non-steatotic grafts from DBDs, the administration of glucose or lipids did not protect against hepatic damage. This was associated with unchanged ATP, glycogen, phospholipid and growth factor levels. However, the administration of lipids in steatotic grafts from DBDs protected against damage and ATP and glycogen drop and increased phospholipid levels. This was associated with increases in growth factors. In all recipients from DBDs, intestinal inflammation and damage (evaluated by LPS, vascular permeability, mucosal damage, TLR4, TNF, IL1, IL-10, MPO, MDA and edema formation) was not shown. In such cases, potential changes in gut microbiota would not be relevant since neither inflammation nor damage was evidenced in the intestine following LT in any of the groups evaluated. In conclusion, lipid treatment is the preferable nutritional support to protect against hepatic damage in steatotic LT from DBDs; the benefits were independent of alterations in the recipient intestine.

Keywords: brain death; liver transplantation; steatotic liver grafts; ischemia-reperfusion; polysaccharides; glucose; lipid emulsion; intestinal inflammation; gut microbiota

1. Introduction

At present, some 80% of grafts are taken from donors after brain death (DBDs). However, brain death (BD) markedly reduces tolerance of preservation/reperfusion injury among liver grafts and reduces graft survival [1,2]. In clinical liver transplantation (LT), the shortage of hepatic graft donors, and consequently the increase in waiting lists for LT, has led centers to relax their criteria for the acceptance of organs from marginal donors, such as steatotic liver grafts. Up to 50% of deceased donor livers are estimated to be steatotic and steatosis is recognized to be a key donor variable when it comes to predicting post-transplant outcomes [3]. A further increase in the prevalence of steatosis in society in general and therefore also in deceased donor livers is expected. It is important to note that hepatic steatosis represents a greater risk of organ dysfunction and primary non-function when compared to non-steatotic livers [2]. Furthermore, many steatotic livers, especially those with severe fatty infiltration, are excluded from consideration for LT, which exacerbates the critical shortage of liver donors [1].

Article

The Role of Neuregulin-1 in Steatotic and Non-Steatotic Liver Transplantation from Brain-Dead Donors

Marc Micó-Carnero ^{1,†}, Araní Casillas-Ramírez ^{2,3,†}, Alfredo Sánchez-González ², Carlos Rojano-Alfonso ¹ and Carmen Peralta ^{1,*}

¹ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; mico@clinic.cat (M.M.-C.); rojano@clinic.cat (C.R.-A.)

² Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria "Bicentenario 2010", Ciudad Victoria 87087, Mexico; aranyrc@yahoo.com (A.C.-R.); asg_4@live.com (A.S.-G.)

³ Facultad de Medicina e Ingeniería en Sistemas Computacionales de Matamoros, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Matamoros 87300, Mexico

* Correspondence: cperalta@clinic.cat; Tel: +34-932-275-400

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Micó-Carnero, M.; Casillas-Ramírez, A.; Sánchez-González, A.; Rojano-Alfonso, C.; Peralta, C. The Role of Neuregulin-1 in Steatotic and Non-Steatotic Liver Transplantation from Brain-Dead Donors. *Biomedicines* **2022**, *10*, 978. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10050978>

Academic Editors: Marica Meroni and Jose Moisés Laparra Llopis

Received: 1 March 2022

Accepted: 21 April 2022

Published: 23 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background. Brain death (BD) and steatosis are key risk factors to predict adverse post-transplant outcomes. We investigated the role of Neuregulin-1 (NRG1) in rat steatotic and non-steatotic liver transplantation (LT) from brain death donors (DBD). Methods: NRG1 pathways were characterized after surgery. Results: NRG1 and p21-activated kinase 1 (PAK1) levels increased in steatotic and non-steatotic grafts from DBDs. The abolishment of NRG1 effects reduced PAK1. When the effect of either NRG1 nor PAK1 was inhibited, injury and regenerative failure were exacerbated. The benefits of the NRG1-PAK1 axis in liver grafts from DBDs were associated with increased vascular endothelial growth factor-A (VEGFA) and insulin growth factor-1 (IGF1) levels, respectively. Indeed, VEGFA administration in non-steatotic livers and IGF1 treatment in steatotic grafts prevented damage and regenerative failure resulting from the inhibition of either NRG1 or PAK-1 activity in each type of liver. Exogenous NRG1 induced greater injury than BD induction. Conclusions: This study indicates the benefits of endogenous NRG1 in liver grafts from DBDs and underscores the specificity of the NRG1 signaling pathway depending on the type of liver: NRG1-PAK1-VEGFA in non-steatotic livers and NRG1-PAK1-IGF1 in steatotic livers. Exogenous NRG1 is not an appropriate strategy to apply to liver grafts from DBD.

Keywords: neuregulin-1; brain death; liver transplantation; steatotic liver grafts; ischemia-reperfusion

1. Introduction

Currently, 80% of grafts are obtained from donors after brain death (DBDs). However, brain death (BD) markedly decreases liver graft tolerance to preservation/reperfusion injury, as well as graft survival [1,2]. In clinical liver transplantation (LT), the shortage of hepatic graft donors, and consequently the increase in transplant waiting lists, has led centers to expand their organ acceptance criteria to marginal donors, such as steatotic liver grafts. Up to 50% of deceased donor livers are estimated to be steatotic, and steatosis is recognized as a key donor variable in the prediction of adverse post-transplant outcomes because hepatic steatosis implies a greater risk of organ dysfunction and primary non-function than transplants with non-steatotic livers [3,4]. The prevalence of steatosis is constantly increasing in society, so many steatotic livers, especially those with severe fatty infiltration, are discarded, thus exacerbating the critical shortage of liver donors [5]. Progress in therapeutic strategies aimed at reducing the inherent risk of dysfunction or failure that steatotic livers suffer after LT from DBDs is urgently required and would also help to more rapidly decrease the LT waiting lists. Neuregulin-1 (NRG1) is a neurotrophic factor that is highly expressed in the nervous system [6]. Experimental studies indicate that



1 **Relevance of the GH-VEGFB/VEGFA axis in liver grafts from brain-**
2 **dead donors with alcohol-associated liver disease**

3 **Marc Micó-Carnero^{1,2,†}, Carlos Rojano-Alfonso^{1,2,†}, Cristina Maroto-Serrat^{1,2}, Juan Carlos**
4 **Cutrin³, Araní Casillas-Ramírez^{4,5,‡*} and Carmen Peralta^{1,4,*}**

5 ¹Department of Liver, Digestive System and Metabolism, Institut d'Investigacions Biomèdiques
6 August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain

7 ²Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

8 ³Molecular Biotechnology Center II "Guido Tarone", Department of Molecular Biotechnologies and
9 Science for the Health, University of Torino, Italy

10 ⁴Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria, IMSS-BIENESTAR, 87087 Ciudad
11 Victoria, Mexico

12 ⁵Facultad de Medicina e Ingeniería en Sistemas Computacionales de Matamoros, Universidad
13 Autónoma de Tamaulipas, 87300 Matamoros, Mexico

14

15 [†] These authors contributed equally to this work

16 [‡] These authors contributed equally to this work

17 *Correspondence: cperalta@recerca.clinic.cat; aranyc@yahoo.com

18 **Keywords: liver transplantation, brain death, ALD, ischemia-reperfusion, growth hormone,**
19 **VEGF.**

20 **Abstract**

21 Grafts with alcohol-associated liver disease (ALD) subjected to prolonged cold ischaemia from
22 donors after brain death (DBD) are typically unsuitable for transplantation. Here, we investigated the
23 role of growth hormone (GH) in livers with ALD from DBDs and its relationship with vascular
24 endothelial growth factor A (VEGFA) and VEGFB. Livers from rats fed ethanol for 6 weeks and
25 with brain death (BD) were cold stored for 24 h and subjected to ex vivo reperfusion. Hepatic
26 damage and proliferative and inflammatory parameters were analysed after BD, before graft retrieval,
27 and after reperfusion. Survival was monitored using an in vivo transplantation model. In DBDs, the
28 administration of GH, which increased the levels in the intestine but not in the liver, induced the
29 generation of both VEGFA and VEGFB in the intestine and protected against hepatic damage caused
30 by BD before retrieving liver grafts from donors. However, VEGFA was the only factor that
31 protected against damage after cold ischemia and reperfusion, which also increased the survival of
32 the recipients. In conclusion, the signalling pathway and beneficial properties of the GH-
33 VEGFA/VEGFB pathway, in which the intestine-liver axis plays a key role, were disrupted when
34 grafts with ALD from DBDs were retrieved from donors and subjected to cold ischemia and
35 reperfusion.

36



Article

Role of VEGFA on Hepatic Damage and Regeneration Failure in Type 2 Diabetes Mellitus Rats Submitted to Partial Hepatectomy Under Vascular Occlusion

Carlos Rojano-Alfonso ^{1,2†}, Marc Micó-Carnero ^{1,2†}, Cristina Maroto-Serrat ^{1,2}, Araní Casillas-Ramírez ^{3,4*} and Carmen Peralta ^{1,2*}

¹ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, 08036, Barcelona, Spain.

² Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain.

³ Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria, IMSS-BIENESTAR, 87087 Ciudad Victoria, Mexico.

⁴ Facultad de Medicina de Matamoros, Universidad Autónoma de Tamaulipas, 87300 Matamoros, Mexico.

†: These authors contributed equally to this work

‡: These authors contributed equally to this work

* Correspondence: cperalta@recerca.clinic.cat; aranyrc@yahoo.com

Abstract: Herein, we investigated the role of Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) in hepatic damage and liver regeneration in rats undergoing partial hepatectomy under vascular occlusion (PH+I/R) in the presence of type 2 diabetes mellitus (T2DM). Our results revealed reduced hepatic VEGFA protein levels after PH+I/R with T2DM. Administration of exogenous VEGFA (PH+I/R+VEGFA group) resulted in exacerbated hepatic necrosis and dysfunction, with no significant changes in inflammation, apoptosis or liver regeneration compared to PH+I/R. Inhibition of endogenous VEGFA with a VEGFR2 antagonist (PH+ I/R+ anti-VEGFR2 group) led to similar hepatic damage and inflammation as the PH+I/R group, but promoted liver regeneration via the Pi3k/Akt pathway. Pharmacological modulation of VEGFA did not affect hepatic VEGFB levels. Administration of VEGFB (PH+ I/R+ VEGFB group) increased hepatic necrosis without affecting liver functionality, apoptosis or regeneration. Low hepatic VEGFA and VEGFB protein levels in PH+I/R with T2DM may be influenced by intestine and adipose tissue. In conclusion, the detrimental effects of exogenous VEGFA are due to exacerbated hepatic necrosis, while inhibition of endogenous VEGFA improved liver regeneration, likely through the Pi3k/Akt pathway. Therefore, inhibiting endogenous VEGFA could be a highly protective strategy to promote liver regeneration in PH under vascular occlusion and T2DM conditions.

Citation: To be added by editorial staff during production.

Keywords: partial hepatectomy; ischemia-reperfusion; VEGFA; VEGFB; pathological liver

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Liver damage induced after a warm ischemia-reperfusion (I/R) period is clinically relevant since it is unavoidable in major liver surgeries such as liver transplantation (LT) [1] or partial hepatectomy (PH) [2], and it is accompanied by regenerative and hepatic failure [3,4]. Regarding PH+I/R, among the patients that require this surgical procedure, more than 20% present steatosis, a condition which is expected to increase in the next years as well as other metabolic disorders related, like type 2 diabetes mellitus (T2DM) [5–7]. It is reported that metabolic disorders related with hepatic steatosis are associated with an increase in the morbidity and mortality after major liver resections [8–10]. This condition makes the study of those pathologies in the context of PH+I/R a scientific and clinical need.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Giamila Fantuzzi,
University of Illinois Chicago, United States

REVIEWED BY
Hirofumi Hirao,
Kyoto University, Japan
Maria Pini,
Alira Health, United States

*CORRESPONDENCE
Carmen Peralta
✉ cperalta@recerca.clinic.cat

RECEIVED 05 April 2023
ACCEPTED 11 July 2023
PUBLISHED 01 August 2023

CITATION
Casillas-Ramírez A, Micó-Carnero M,
Sánchez-González A, Maroto-Serrat C,
Trostchansky A and Peralta C (2023)
NO–IL-6/10–IL-1 β axis: a new pathway
in steatotic and non-steatotic liver
grafts from brain-dead donor rats.
Front. Immunol. 14:1178909.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1178909

COPYRIGHT
© 2023 Casillas-Ramírez, Micó-Carnero,
Sánchez-González, Maroto-Serrat,
Trostchansky and Peralta. This is an open-
access article distributed under the terms of
the [Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

NO–IL-6/10–IL-1 β axis: a new pathway in steatotic and non-steatotic liver grafts from brain-dead donor rats

Araní Casillas-Ramírez^{1,2}, Marc Micó-Carnero³,
Alfredo Sánchez-González¹, Cristina Maroto-Serrat³,
Andrés Trostchansky⁴ and Carmen Peralta^{3*}

¹Department of Teaching and Research Sub-Direction, Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria “Bicentenario 2010”, Ciudad Victoria, Mexico, ²Facultad de Medicina e Ingeniería en Sistemas Computacionales de Matamoros, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Matamoros, Mexico, ³Department of Liver, Digestive System and Metabolism, Institut d’Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain, ⁴Departamento de Bioquímica and Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Introduction: Brain death (BD) and steatosis are both risk factors for organ dysfunction or failure in liver transplantation (LT)

Material and methods: Here, we examine the role of interleukin 6 (IL-6) and IL-10 in LT of both non-steatotic and steatotic liver recovered from donors after brain death (DBDs), as well as the molecular signaling pathways underlying the effects of such cytokines.

Results: BD reduced IL-6 levels only in nonsteatotic grafts, and diminished IL-10 levels only in steatotic ones. In both graft types, BD increased IL-1 β , which was associated with hepatic inflammation and damage. IL-6 administration reduced IL-1 β only in non-steatotic grafts and protected them against damage and inflammation. Concordantly, IL-1 β inhibition via treatment with an IL-1 receptor antagonist caused the same benefits in non-steatotic grafts. Treatment with IL-10 decreased IL-1 β only in steatotic grafts and reduced injury and inflammation specifically in this graft type. Blockading the IL-1 β effects also reduced damage and inflammation in steatotic grafts. Also, blockade of IL-1 β action diminished hepatic cAMP in both types of livers, and this was associated with a reduction in liver injury and inflammation, then pointing to IL-1 β regulating cAMP generation under LT and BD conditions. Additionally, the involvement of nitric oxide (NO) in the effects of interleukins was evaluated. Pharmacological inhibition of NO in LT from DBDs prompted even more evident reductions of IL-6 or IL-10 in non-steatotic and steatotic grafts, respectively. This exacerbated the already high levels of IL-1 β seen in LT from DBDs, causing worse damage and inflammation in both graft types. The administration of NO donors to non-steatotic grafts potentiated the beneficial effects of endogenous NO, since it increased IL-6 levels, and reduced IL-1 β , inflammation, and damage. However, treatment with NO donors in steatotic grafts did not modify IL-10 or IL-1 β levels, but induced more injurious effects than the induction of BD alone, characterized by increased nitrotyrosine, lipid peroxidation, inflammation, and hepatic damage.



Review

Effects of Gut Metabolites and Microbiota in Healthy and Marginal Livers Submitted to Surgery

Marc Micó-Carnero ^{1,†}, Carlos Rojano-Alfonso ^{1,†}, Ana Isabel Álvarez-Mercado ^{2,3,4}, Jordi Gracia-Sancho ^{5,6}, Araní Casillas-Ramírez ^{7,8,‡} and Carmen Peralta ^{1,*,‡}¹ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; mico@clinic.cat (M.M.-C.); rojano@clinic.cat (C.R.-A.)² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Escuela de Farmacia, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain; analvarezmercado@gmail.com³ Institut of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Center of Biomedical Research, University of Granada, 18016 Granada, Spain⁴ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs, GRANADA, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, 18014 Granada, Spain⁵ Liver Vascular Biology Research Group, Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory IDIBAPS, 03036 Barcelona, Spain; Jordi.gracia@idibaps.org⁶ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), 08036 Barcelona, Spain⁷ Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria "Bicentenario 2010", Ciudad Victoria 87087, Mexico; arany@yahoo.com⁸ Facultad de Medicina e Ingeniería en Sistemas Computacionales de Matamoros, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Matamoros 87300, Mexico

* Correspondence: cperalta@clinic.cat

† These authors equally contributed to this work.

‡ These authors equally contributed to this work.



Citation: Micó-Carnero, M.; Rojano-Alfonso, C.; Álvarez-Mercado, A.I.; Gracia-Sancho, J.; Casillas-Ramírez, A.; Peralta, C. Effects of Gut Metabolites and Microbiota in Healthy and Marginal Livers Submitted to Surgery. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 44. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms22010044>

Received: 13 November 2020

Accepted: 20 December 2020

Published: 22 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Microbiota is defined as the collection of microorganisms within the gastrointestinal ecosystem. These microbes are strongly implicated in the stimulation of immune responses. An unbalanced microbiota, termed dysbiosis, is related to the development of several liver diseases. The bidirectional relationship between the gut, its microbiota and the liver is referred to as the gut–liver axis. The translocation of bacterial products from the intestine to the liver induces inflammation in different cell types such as Kupffer cells, and a fibrotic response in hepatic stellate cells, resulting in deleterious effects on hepatocytes. Moreover, ischemia-reperfusion injury, a consequence of liver surgery, alters the microbiota profile, affecting inflammation, the immune response and even liver regeneration. Microbiota also seems to play an important role in post-operative outcomes (i.e., liver transplantation or liver resection). Nonetheless, studies to determine changes in the gut microbial populations produced during and after surgery, and affecting liver function and regeneration are scarce. In the present review we analyze and discuss the preclinical and clinical studies reported in the literature focused on the evaluation of alterations in microbiota and its products as well as their effects on post-operative outcomes in hepatic surgery.

Keywords: microbiota; liver transplantation; partial hepatectomy; liver surgery; ischemia-reperfusion

1. Introduction

Liver transplantation (LT) faces an urgent problem due to the shortage of liver grafts available for transplant. With the aim of resolving this problem, the criteria for discarding liver grafts have been changed. Thus, organs with diseases such as steatosis and positive hepatitis B or C have been used in LT [1]. Liver steatosis is a key factor when evaluating donor livers because of the high prevalence (30% in cadaveric and 20% in living donors) of negatively affecting recipient outcomes [1]. Thus, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a common cause of liver rejection [2]. However, it is known that these types of



Review

A Potential Route to Reduce Ischemia/Reperfusion Injury in Organ Preservation

Marc Micó-Carnero ¹, Mohamed Amine Zaouali ², Carlos Rojano-Alfonso ¹, Cristina Maroto-Serrat ¹, Hassen Ben Abdennebi ^{2,†} and Carmen Peralta ^{1,*,†}

¹ Institut of Biomedical Research August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain

² Laboratory of Human Genome and Multifactorial Diseases (LR12ES07), Faculty of Pharmacy, University of Monastir, Monastir 5000, Tunisia

* Correspondence: cperalta@recerca.clinic.cat; Tel.: (+34)-932-275-400

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The pathophysiological process of ischemia and reperfusion injury (IRI), an inevitable step in organ transplantation, causes important biochemical and structural changes that can result in serious organ damage. IRI is relevant for early graft dysfunction and graft survival. Today, in a global context of organ shortages, most organs come from extended criteria donors (ECDs), which are more sensitive to IRI. The main objective of organ preservation solutions is to protect against IRI through the application of specific, nonphysiological components, under conditions of no blood or oxygen, and then under conditions of metabolic reduction by hypothermia. The composition of hypothermic solutions includes osmotic and oncotic buffering components, and they are intracellular (rich in potassium) or extracellular (rich in sodium). However, above all, they all contain the same type of components intended to protect against IRI, such as glutathione, adenosine and allopurinol. These components have not changed for more than 30 years, even though our knowledge of IRI, and much of the relevant literature, questions their stability or efficacy. In addition, several pharmacological molecules have been the subjects of preclinical studies to optimize this protection. Among them, trimetazidine, tacrolimus and carvedilol have shown the most benefits. In fact, these drugs are already in clinical use, and it is a question of repositioning them for this novel use, without additional risk. This new strategy of including them would allow us to shift from cold storage solutions to cold preservation solutions including multitarget pharmacological components, offering protection against IRI and thus protecting today's more vulnerable organs.

Keywords: ischemia reperfusion injury; IRI; organ transplantation; cold storage solution; organ preservation; steatosis; ECD grafts; trimetazidine; carvedilol; tacrolimus



Citation: Micó-Carnero, M.; Zaouali, M.A.; Rojano-Alfonso, C.; Maroto-Serrat, C.; Ben Abdennebi, H.; Peralta, C. A Potential Route to Reduce Ischemia/Reperfusion Injury in Organ Preservation. *Cells* **2022**, *11*, 2763. <https://doi.org/10.3390/cells11172763>

Academic Editor: Rita Carini

Received: 13 June 2022

Accepted: 1 September 2022

Published: 5 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Nowadays, organ transplantation provides the best available solution and is the clinically accepted treatment for end-stage organ failure including end-stage renal disease (ESRD) and liver failure [1]. In this context, the goal of organ preservation is to maintain grafts in viable conditions outside the body, while being transferred from the donor to the recipient. This step inevitably leads to the pathophysiological process of ischemia/reperfusion injury (IRI) [2].

IRI has been shown to be an important contributor to early graft dysfunction (EGD), specifically to renal delayed graft function and early allograft dysfunction in liver [3–6]. In addition, this initial EGD has a negative impact on long-term survival [7,8]. Meanwhile, the increasing number of patients on waiting lists for organ transplantation has obliged transplant teams to consider organs from so-called extended criteria donors (ECDs). However, such organs present increased risk of EGD after transplantation due to their heightened vulnerability to IRI [9–13].



Review

Role of FGF15 in Hepatic Surgery in the Presence of Tumorigenesis: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?

Albert Caballeria-Casals ^{1,†}, Marc Micó-Carnero ^{1,†}, Carlos Rojano-Alfonso ¹, Cristina Maroto-Serrat ², Araní Casillas-Ramírez ^{3,4}, Ana I. Álvarez-Mercado ^{5,6,7}, Jordi Gracia-Sancho ^{8,9,*} and Carmen Peralta ^{1,*}

¹ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; acabalca31@alumnes.ub.edu (A.C.-C.); mico@clinic.cat (M.M.-C.); rojano@clinic.cat (C.R.-A.)

² Aplicacions i Muntatge Torelló SL (AMT), 08570 Torelló, Spain; cristina.maroto@uvic.cat

³ Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria "Bicentenario 2010", Ciudad Victoria 87087, Mexico; acasillas@docentes.uat.edu.mx

⁴ Facultad de Medicina e Ingeniería en Sistemas Computacionales de Matamoros, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Matamoros 87300, Mexico

⁵ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Escuela de Farmacia, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain; alvarezmercado@ugr.es

⁶ Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Center of Biomedical Research, University of Granada, 18016 Armilla, Spain

⁷ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, 18014 Granada, Spain

⁸ Liver Vascular Biology Research Group, Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory IDIBAPS, 03036 Barcelona, Spain

⁹ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), 08036 Barcelona, Spain

* Correspondence: Jordi.gracia@idibaps.org (J.G.-S.); cperalta@clinic.cat (C.P.)

† These authors equally contributed to this work.



Citation: Caballeria-Casals, A.; Micó-Carnero, M.; Rojano-Alfonso, C.; Maroto-Serrat, C.; Casillas-Ramírez, A.; Álvarez-Mercado, A.I.; Gracia-Sancho, J.; Peralta, C. Role of FGF15 in Hepatic Surgery in the Presence of Tumorigenesis: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Cells* **2021**, *10*, 1421. <https://doi.org/10.3390/cells10061421>

Academic Editors: Antoni Wiedlocha and Malgorzata Zakrzewska

Received: 26 March 2021

Accepted: 4 June 2021

Published: 7 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The pro-tumorigenic activity of fibroblast growth factor (FGF) 19 (FGF15 in its rodent orthologue) in hepatocellular carcinoma (HCC), as well as the unsolved problem that ischemia-reperfusion (IR) injury supposes in liver surgeries, are well known. However, it has been shown that FGF15 administration protects against liver damage and regenerative failure in liver transplantation (LT) from brain-dead donors without tumor signals, providing a benefit in avoiding IR injury. The protection provided by FGF15/19 is due to its anti-apoptotic and pro-regenerative properties, which make this molecule a potentially beneficial or harmful factor, depending on the disease. In the present review, we describe the preclinical models currently available to understand the signaling pathways responsible for the apparent controversial effects of FGF15/19 in the liver (to repair a damaged liver or to promote tumorigenesis). As well, we study the potential pharmacological use that has the activation or inhibition of FGF15/19 pathways depending on the disease to be treated. We also discuss whether FGF15/19 non-pro-tumorigenic variants, which have been developed for the treatment of liver diseases, might be promising approaches in the surgery of hepatic resections and LT using healthy livers and livers from extended-criteria donors.

Keywords: hepatocellular carcinoma; liver transplantation; ischemia-reperfusion injury; liver surgery; fibroblast growth factor

1. Introduction

Currently, liver transplantation (LT) remains an unsolved problem in clinical practice, not only due to the lack of donor grafts but also because of the risk factors of liver dysfunction or failure that show steatotic livers (present in 30% of total liver grafts) [1] or livers from a brain-dead (BD) donor (the 80% of deceased donors) [2]. BD negatively affects the hepatic function following transplantation [3,4], and livers with steatosis are more susceptible to ischemia-reperfusion (IR) injury, thus negatively affecting liver function and



New Insights Into the Role of Autophagy in Liver Surgery in the Setting of Metabolic Syndrome and Related Diseases

Ana Isabel Álvarez-Mercado^{1,2,3†}, Carlos Rojano-Alfonso^{4†}, Marc Micó-Carnero⁴, Albert Caballeria-Casals⁴, Carmen Peralta^{4*†} and Arani Casillas-Ramírez^{5,6*†}

OPEN ACCESS

Edited by:

William T. Festuccia,
University of São Paulo, Brazil

Reviewed by:

William K. K. Wu,
Chinese University of Hong Kong,
China
Shengmin Yan,
Tulane University, United States

*Correspondence:

Carmen Peralta
cperalta@clinic.cat
Arani Casillas-Ramírez
aranyrc@yahoo.com

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular Biochemistry,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 20 February 2021

Accepted: 23 April 2021

Published: 01 June 2021

Citation:

Álvarez-Mercado AI,
Rojano-Alfonso C, Micó-Carnero M,
Caballeria-Casals A, Peralta C and
Casillas-Ramírez A (2021) New
Insights Into the Role of Autophagy
in Liver Surgery in the Setting
of Metabolic Syndrome and Related
Diseases.
Front. Cell Dev. Biol. 9:670273.
doi: 10.3389/fcell.2021.670273

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology II, School of Pharmacy, Granada, Spain, ² Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Biomedical Research Center, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Granada, Spain,

³ Instituto de Investigación Biosanitaria Ibs. GRANADA, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Granada, Spain,

⁴ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, ⁵ Hospital Regional de Alta

Especialidad de Ciudad Victoria "Bicentenario 2010", Ciudad Victoria, Mexico, ⁶ Facultad de Medicina e Ingeniería en

Sistemas Computacionales de Matamoros, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Matamoros, Mexico

Visceral obesity is an important component of metabolic syndrome, a cluster of diseases that also includes diabetes and insulin resistance. A combination of these metabolic disorders damages liver function, which manifests as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). NAFLD is a common cause of abnormal liver function, and numerous studies have established the enormously deleterious role of hepatic steatosis in ischemia-reperfusion (I/R) injury that inevitably occurs in both liver resection and transplantation. Thus, steatotic livers exhibit a higher frequency of post-surgical complications after hepatectomy, and using liver grafts from donors with NAFLD is associated with an increased risk of post-surgical morbidity and mortality in the recipient. Diabetes, another MetS-related metabolic disorder, also worsens hepatic I/R injury, and similar to NAFLD, diabetes is associated with a poor prognosis after liver surgery. Due to the large increase in the prevalence of MetS, NAFLD, and diabetes, their association is frequent in the population and therefore, in patients requiring liver resection and in potential liver graft donors. This scenario requires advancement in therapies to improve postoperative results in patients suffering from metabolic diseases and undergoing liver surgery; and in this sense, the bases for designing therapeutic strategies are in-depth knowledge about the molecular signaling pathways underlying the effects of MetS-related diseases and I/R injury on liver tissue. A common denominator in all these diseases is autophagy. In fact, in the context of obesity, autophagy is profoundly diminished in hepatocytes and alters mitochondrial functions in the liver. In insulin resistance conditions, there is a suppression of autophagy in the liver, which is associated with the accumulation of lipids, being this a risk factor for NAFLD. Also, oxidative stress occurring in hepatic I/R injury promotes autophagy. The present review aims to shed some light on the role

Review

Insights into Growth Factors in Liver Carcinogenesis and Regeneration: An Ongoing Debate on Minimizing Cancer Recurrence after Liver Resection

Ana I. Álvarez-Mercado ^{1,2,3,*}, Albert Caballeria-Casals ^{4,†}, Carlos Rojano-Alfonso ⁴, Jesús Chávez-Reyes ⁵, Marc Micó-Carnero ⁴, Alfredo Sanchez-Gonzalez ⁶, Araní Casillas-Ramírez ^{5,6}, Jordi Gracia-Sancho ^{7,8} and Carmen Peralta ^{4,*}

- ¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain
 - ² Institute of Nutrition and Food Technology, Biomedical Research Center, University of Granada, 18016 Armilla, Spain
 - ³ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, 18014 Granada, Spain
 - ⁴ Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury Department, Institut de Recerca Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; acabalca31@alumnes.ub.edu (A.C.-C.); rojano@clinic.cat (C.R.-A.); mico@clinic.cat (M.M.-C.)
 - ⁵ Facultad de Medicina e Ingeniería en Sistemas Computacionales Matamoros, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Matamoros 87300, Mexico; jesus.chavez@uat.edu.mx (J.C.-R.); acasillas@docentes.uat.edu.mx (A.C.-R.)
 - ⁶ Teaching and Research Department, Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria “Bicentenario 2010”, Ciudad Victoria 87087, Mexico; asg_4@live.com
 - ⁷ Liver Vascular Biology Research Group, Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS Biomedical Research Institute, CIBEREHD, 03036 Barcelona, Spain; Jordi.gracia@idibaps.org
 - ⁸ Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), 08036 Barcelona, Spain
- * Correspondence: alvarezmercado@ugr.es (A.I.A.-M.); cperalta@clinic.cat (C.P.)
 † Ana I. Álvarez-Mercado and Albert Caballeria-Casals contributed equally to this work.



Citation: Álvarez-Mercado, A.I.; Caballeria-Casals, A.; Rojano-Alfonso, C.; Chávez-Reyes, J.; Micó-Carnero, M.; Sanchez-Gonzalez, A.; Casillas-Ramírez, A.; Gracia-Sancho, J.; Peralta, C. Insights into Growth Factors in Liver Carcinogenesis and Regeneration: An Ongoing Debate on Minimizing Cancer Recurrence after Liver Resection. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1158. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091158>

Academic Editor: Yoku Hayakawa

Received: 19 July 2021
 Accepted: 1 September 2021
 Published: 4 September 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Hepatocellular carcinoma has become a leading cause of cancer-associated mortality throughout the world, and is of great concern. Currently used chemotherapeutic drugs in the treatment of hepatocellular carcinoma lead to severe side effects, thus underscoring the need for further research to develop novel and safer therapies. Liver resection in cancer patients is routinely performed. After partial resection, liver regeneration is a perfectly calibrated response apparently sensed by the body’s required liver function. This process hinges on the effect of several growth factors, among other molecules. However, dysregulation of growth factor signals also leads to growth signaling autonomy and tumor progression, so control of growth factor expression may prevent tumor progression. This review describes the role of some of the main growth factors whose dysregulation promotes liver tumor progression, and are also key in regenerating the remaining liver following resection. We herein summarize and discuss studies focused on partial hepatectomy and liver carcinogenesis, referring to hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor, and epidermal growth factor, as well as their suitability as targets in the treatment of hepatocellular carcinoma. Finally, and given that drugs remain one of the mainstay treatment options in liver carcinogenesis, we have reviewed the current pharmacological approaches approved for clinical use or research targeting these factors.

Keywords: liver cancer; liver resection; growth factors; regeneration; hepatocyte growth factor; insulin-like growth factor-1; epidermal growth factor



OPEN ACCESS

EDITED AND REVIEWED BY
Angel Lanas,
University of Zaragoza, Spain*CORRESPONDENCE
Carmen Peralta
cperalta@recerca.clinic.catRECEIVED 30 October 2023
ACCEPTED 06 November 2023
PUBLISHED 17 November 2023CITATION
Micó-Carnero M, Trostchansky A and Peralta C
(2023) Editorial: Pathological livers in the
surgery of hepatic resections and liver
transplantation, volume II.
Front. Med. 10:1330122.
doi: 10.3389/fmed.2023.1330122COPYRIGHT
© 2023 Micó-Carnero, Trostchansky and
Peralta. This is an open-access article
distributed under the terms of the Creative
Commons Attribution License (CC BY). The use,
distribution or reproduction in other forums is
permitted, provided the original author(s) and
the copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic practice.
No use, distribution or reproduction is
permitted which does not comply with these
terms.

Editorial: Pathological livers in the surgery of hepatic resections and liver transplantation, volume II

Marc Micó-Carnero^{1,2}, Andrés Trostchansky³ and
Carmen Peralta^{1*}¹Department of Liver, Digestive System and Metabolism, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain, ²Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ³Departamento de Bioquímica and Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

KEYWORDS

liver transplantation, ischemia reperfusion (I/R) injury, partial hepatectomy, steatosis, liver surgery

Editorial on the Research Topic

Pathological livers in the surgery of hepatic resections and liver transplantation, volume II

Deceased organ donation consists of both donation after circulatory death (CD) and donation after brain death (BD) (1). The majority of liver transplants (~80%) involve organs from BD donors, with 4–20% originating from CD donors (2). Both CD and BD result in significant hemodynamic alterations, mesenteric microcirculation hypoperfusion, and warm hepatic ischemia, culminating in inflammation and cell damage, ultimately leading to deleterious effects on the liver grafts used for transplantation (3, 4).

To reduce transplant waiting lists, the use of marginal liver grafts could expand the pool of available organs by using deceased donors. Marginal livers can be classified into two different categories: those with a higher risk of impaired function (e.g., those from older patients, people who are steatotic, diabetic donors, and split livers, among others), and grafts carrying the risk of infection or malignancy for the recipient (e.g., donors with viral infections or cancer) (5). This topic is of clinical and scientific interest since there will soon be an increased need for liver grafts from marginal donors to alleviate transplant waiting lists and because of the prevalence of metabolic disorders in liver resections.

There is an urgent demand for therapeutic, surgical, and technological strategies to alleviate the detrimental effects of BD and CD on liver grafts, improve the tolerance of marginal livers to ischemia/reperfusion (I/R) injury, and address regenerative failure in partial hepatectomies and liver transplants (6). Despite numerous studies, the influence of each variable related to marginal donors on graft function, recipient survival, and post-surgical outcomes in major liver surgeries remains under investigation due to controversial results (7). Furthermore, the molecular mechanisms underlying the harmful effects of BD and CD on transplanted liver grafts are being studied and more studies have to be performed to report new signal pathways involved in this process (2, 8, 9). Understanding the common molecular signaling pathways that underlie various liver pathologies, including BD and CD, as well as their role in hepatic I/R, is crucial for clinical practice. Discussions and studies in this field are essential for developing effective interventions to enhance postoperative outcomes for marginal livers undergoing transplantation or resection and deceased organ donation. These advances would not only alleviate transplant waiting lists by enabling the use of grafts from extended criteria donors but also lead to improved outcomes for pathological livers undergoing resection, thereby enhancing the clinical outlook for liver surgery in the future.

