



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Protección de hígados patológicos frente a la lesión y al fallo en la regeneración asociado a la cirugía hepática

Carlos Rojano Alfonso

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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.



FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ  
PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOTECNOLOGIA

# **Protección de hígados patológicos frente a la lesión y al fallo en la regeneración asociado a la cirugía hepática**

Carlos Rojano Alfonso

2024





FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOTECNOLOGIA

2020- 2024



INSTITUT D'INVESTIGACIONS  
BIOMÈDIQUES AUGUST PI I SUNYER



HOSPITAL CLÍNIC  
DE BARCELONA

# **Protección de hígados patológicos frente a la lesión y al fallo en la regeneración asociado a la cirugía hepática**

Memoria presentada por Carlos Rojano Alfonso para optar al título de doctor por la  
Universidad de Barcelona.

La presente Tesis doctoral ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Carmen  
Peralta Uroz y de la Dra. Araní Casillas Ramírez

Dra. Carmen Peralta Uroz  
Directora

Dra. Araní Casillas Ramírez  
Directora

Carlos Rojano Alfonso  
Doctorando

Dra. Josefa Badía Palacín  
Tutora



*Todo pasa y todo queda,*

*Pero lo nuestro es pasar*

*Pasar haciendo caminos*

*Caminos sobre el mar*

**Antonio Machado**



## Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Carmen Peralta por haberme dado la oportunidad de realizar la presente Tesis Doctoral y por haber sido una fuente de inspiración por la que guiarme. Gracias por haber estado siempre disponible ante cualquier problema o duda surgida durante este periodo y por la paciencia mostrada. Finalmente, muchas gracias por haberme dado las herramientas para poder cumplir con los objetivos marcados y haberme guiado a desarrollar mi pensamiento crítico y mis capacidades dentro del laboratorio. De igual forma, muchas gracias a la Dra. Araní Casillas por haber estado también siempre disponible a ayudar, colaborar y enseñar de forma gentil y en todo momento a pesar de las dificultades que representa dirigir una tesis a distancia. Por otra parte, no me quiero olvidar de la tutora y coordinadora del programa de doctorado, la Dra. Josefa Badia, quien también ha sido vital en la consecución de la presente tesis, a quien le debo un agradecimiento por la ayuda y amabilidad mostrada y la rápida solución a los problemas que fueron apareciendo en este tiempo.

Gracias también a toda la gente que ha estado presente en el laboratorio durante estos años. Gracias a la Dra. Mónica Jiménez por la enseñanza, siempre de buenas formas. De ti aprendí una gran parte de las cosas que he tenido que realizar en este lugar y eres un ejemplo a seguir. Gracias Paco, Albert, Marga y Marina por la ayuda prestada cuando ha sido necesaria y por los buenos momentos pasados. Cris, gracias por haber sido no solo una compañera de trabajo, sino una amiga con la que he podido compartir tanto momentos buenos como no tan buenos. Finalmente, muchas gracias a Marc, mi compañero de tesis con el que empiezo y acabo esta etapa. Difícilmente podría imaginarme haber tenido un compañero mejor.

Gracias a toda la gente del CEK por haber hecho que haya un buen ambiente en nuestra planta y por la ayuda prestada. Gracias a Esther y Loreto por vuestra ayuda desinteresada y el aprendizaje recibido cuando llegué a este edificio, sois unas grandes personas a las que siempre desearé lo mejor. Gracias al grupo de la Dra. Affó por haber compartido la última fase de esta etapa. Gracias al grupo del Dr. Claria, por haber sido nuestros vecinos durante tanto tiempo y por haber no solo ayudado cuando lo hemos necesitado, sino por el buen ambiente que desprendéis y del que nos habéis hecho partícipes. No querría dejarme tampoco a los grupos que también nos han ayudado durante este tiempo (el grupo del Dr. Gracia, del Dr. Morales, entre otros). Muchas gracias a la gente del biobanco y del estabulario por el buen trato recibido, su simpatía y su buen hacer. No quisiera dejarme a Pepa, cuya tarea no es sencilla, asegurarse

que todo funcione correctamente en la planta 3, y no podría pensar en una persona mejor para hacerla.

Quisiera agradecer también a la Generalitat de Catalunya, de quien recibí la beca PERIS PIF-Salut para poder realizar la presente Tesis Doctoral y a los trabajadores del IDIBAPS que ayudaron a conseguirla.

Gracias a toda la gente externa a este edificio con la que he podido trabajar durante estos años: Silvina, Alfredo y demás colaboradores.

Llegados a este punto, quisiera dar mi agradecimiento a la familia y amigos.

Muchas gracias a la gente del Gramenet, mi segunda familia, tanto en sentido figurado como literal, los cuales han sido un punto de apoyo y una vía de escape cuando ha sido necesario.

Muchas gracias a la gente del Vila Olímpica, por los buenos momentos vividos en el fútbol, en el ajedrez, en las vacaciones..., y con los que espero seguir acumulando experiencias.

Muchas gracias a los Charangos, con los que he tenido la suerte de coincidir y seguir coincidiendo. Gracias a todos, por vuestros consejos, los buenos momentos y vuestro apoyo en los momentos difíciles, donde habéis demostrado ser los mejores. Gracias a Kike, por haber estado manteniendo el contacto y por los consejos recibidos, a pesar de que la vida te llevara a comer *Fish and Chips*. Gracias Arnau, por los buenos momentos pasados y las risas aseguradas durante todas estas noches, que espero que se mantengan durante mucho tiempo. Gracias a Joel, por ser como eres y por todos los viajes, las fiestas y los momentos inolvidables que hemos vivido. Gracias Ulises, por ser lo más parecido a un hermano que he tenido. Tengo la gran suerte de haberte conocido y espero que la vida nunca llegue a separar nuestros caminos.

Finalmente, gracias a mi familia, que tiene que aguantarme siempre, con las dificultades que eso conlleva, durante toda mi vida y, en particular, durante el tiempo que he estado realizando el doctorado. Y en especial, gracias a mi familia cercana. Gracias a mis perras Luna y Ela, por no dejarme dormir por las noches y recordarme que me tengo que levantar por las mañanas. Gracias Rodolfo, por estar siempre dispuesto a ser incordiado por mí, tus consejos de vida y el trato increíble que has tenido siempre conmigo. Gracias papa, por tener que aguantarme en casa y por toda la ayuda que me has brindado siempre, y por enseñarme a ser fuerte. Gracias Alba, por ser mi hermana y por ser el espejo en el que reflejarse, por estar siempre ahí, tanto en las buenas como en las malas, sin ti no estaría escribiendo esto. Y, por último, estas últimas

líneas son para ti, mama. No has podido ver ni el principio ni el final de este periodo de mi vida, pero me sigues haciendo mejor persona y me ayudas a levantarme cuando me caigo.

En definitiva, gracias a todos los que han hecho esto posible.



## Resumen

El hígado es un órgano vital para el organismo por la multitud de funciones que desarrolla. Cuando se compromete su actividad, puede ser necesario recurrir a una cirugía mayor hepática. La resección hepática, asociada generalmente a la eliminación macroscópica de tumores, aprovecha la capacidad del hígado para regenerarse. No obstante, esta regeneración está comprometida en diversas condiciones patológicas, como son la obesidad, el alcoholismo o la diabetes (T2DM), que están experimentando un auge en su prevalencia en la sociedad. En enfermedades hepáticas avanzadas, el trasplante hepático es la técnica que permite una mayor supervivencia en la práctica clínica. En la actualidad, la mayoría de los donantes de hígados patológicos provienen de donantes con muerte cerebral, asociada a un mayor daño del injerto provocando, a su vez, una mayor posibilidad de disfunción hepática o fallo primario del injerto tras la cirugía. Por otro lado, debido a la problemática en las listas de espera, se ha de recurrir a la utilización de tales injertos hepáticos procedentes de donantes de criterio extendido, es decir, con condiciones patológicas que afectan al trasplante hepático negativamente, incrementando las probabilidades de disfunción primaria del injerto o la necesidad de retrasplante, entre otras consecuencias. Entre las condiciones adversas más comunes, se encuentra la esteatosis, la diabetes o el alcoholismo. En ambas cirugías, es de especial relevancia el daño por isquemia y reperusión, incrementado sus efectos adversos cuando el hígado se encuentra en condiciones anómalas.

Entre los posibles candidatos a disminuir el daño por isquemia-reperusión de estas cirugías, se encuentran los factores de crecimiento vascular endotelial A y B (VEGFA y VEGFB) y la hormona de crecimiento (GH), factores que hemos analizado en la presente Tesis Doctoral. Para ello, se ha establecido un modelo preclínico de resección hepática bajo oclusión vascular en presencia de T2DM, en el que se ha observado un aumento del daño hepático y fallo en la regeneración, asociado a bajas tasas de supervivencia. Este efecto negativo se vio exacerbado por la administración exógena de VEGFA y VEGFB, y fue parcialmente revertido a través de un aumento en la regeneración hepática con un inhibidor de la acción de VEGFA. Por otra parte, se estableció un modelo preclínico de enfermedad hepática asociada a alcohol (ALD) en donantes de injertos hepáticos procedentes de muerte cerebral (MC), seguido de isquemia fría de 24 horas y perfusión normotérmica *ex vivo* o trasplante hepático. En estos modelos *ex vivo* e *in vivo*, se observó como el efecto beneficioso resultante de la administración de GH y VEGFB en donantes desaparecía tras la isquemia fría (CI). No obstante, los efectos protectores resultantes de la administración de VEGFA exógeno en donantes se mantuvieron tras someter a los injertos

hepáticos a un periodo de isquemia fría de 24 horas seguido de una perfusión normotérmica *ex vivo* o trasplante. Tales efectos beneficiosos se reflejaron en una reducción en la lesión hepática, mejoras en la regeneración y un aumento de la supervivencia de los receptores con injertos hepáticos con ALD procedentes de donantes con MC.

Los resultados obtenidos a partir de la presente Tesis Doctoral son de relevancia clínica y social y permitirán contribuir al desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas tanto en las cirugías hepáticas de las resecciones con hígados patológicos debido a la presencia de T2DM como en el trasplante de injertos hepáticos procedentes de donantes con criterio extendido debido a la presencia de ALD e isquemia prolongada de 24 horas.

## Abstract

If the activity of the liver is compromised, a major liver surgery might be required. Hepatic resection, usually used for tumour removal, relies on the liver's special regenerative capability. However, this regeneration is compromised in pathological conditions like obesity, alcoholism, or diabetes (T2DM), which are increasingly prevalent in society. In advanced liver diseases, liver transplantation is often the best option for the survival of the patient. Currently, brain-dead donors are the most common donors for liver transplant, but brain death increases graft damage and the risk of liver dysfunction or primary graft failure post-surgery. Due to critical shortage of organ donors, extended criteria donor grafts with pathological conditions (such as steatosis, diabetes, or alcoholism) must be used. However, such adverse conditions increase the risk of primary graft dysfunction or re-transplantation risks.

Among the candidates that may decrease the damage associated with ischemia-reperfusion, there are the vascular endothelial growth factors A and B (VEGFA and VEGFB) and the growth hormone (GH), which we analysed in this Thesis. For that, a preclinical hepatic resection model under vascular occlusion with T2DM was established, showing increased liver damage, regeneration failure and an increase in mortality. This negative effect was worsened by the exogenous administration of VEGFA and VEGFB, but partially reversed (reflected in improved liver regeneration) with an inhibitor of the VEGFA action. Also, a preclinical model of alcohol-associated liver disease (ALD) from brain-dead donors followed by 24-hour cold ischemia and *ex vivo* normothermic perfusion or liver transplantation was carried out. In these *ex vivo* and *in vivo* models, the beneficial effect of GH and VEGFB administration in donors disappeared after cold ischemia. However, the protective effects of exogenous VEGFA administration in donors remained after 24-hour cold ischemia followed by *ex vivo* normothermic perfusion and in liver transplantation. These beneficial effects were noticed by a reduction in liver injury, improved regeneration, and increased survival of the recipients of the liver grafts.

The findings of this Doctoral Thesis are clinically and socially relevant, contributing to the development of pharmacological strategies in hepatic surgeries for pathological livers with T2DM and from extended criteria donors with ALD.



## Abreviaciones

|        |                                                                                  |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------|
| ADH    | Alcohol deshidrogenasa                                                           |
| ADN    | Ácido desoxirribonucleico                                                        |
| ADNc   | Ácido desoxirribonucleico complementario                                         |
| AFP    | $\alpha$ -fetoproteína                                                           |
| ALD    | Enfermedad hepática relacionada con el alcohol                                   |
| ALDH   | Aldehído deshidrogenasa                                                          |
| ALT    | Alanina aminotransferasa                                                         |
| AMPK   | Proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMP)                         |
| ARN    | Ácido ribonucleico                                                               |
| ARNm   | Ácido ribonucleico mensajero                                                     |
| AST    | Aspartato aminotransferasa                                                       |
| ATP    | Adenosina trifosfato                                                             |
| BDNF   | Factor neurotrófico derivado del cerebro                                         |
| BMP    | Proteínas morfogénicas óseas                                                     |
| BSA    | Albúmina de suero bovino                                                         |
| C3     | Caspasa 3                                                                        |
| C8     | Caspasa 8                                                                        |
| CI     | Isquemia fría                                                                    |
| CI/R   | Isquemia fría y perfusión en el sistema de perfusión normotérmica <i>ex vivo</i> |
| c-Met  | Receptor c-MET                                                                   |
| CYP2E1 | Citocromo P450 2E1                                                               |
| DAMPs  | Patrones moleculares asociados al daño                                           |
| Db     | Diabetes                                                                         |
| DMSO   | Dimetilsulfóxido                                                                 |

|               |                                                                                |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| ELISA         | Ensayo inmunoenzimático                                                        |
| FGF15         | Factor de crecimiento de fibroblastos 15                                       |
| FGF19         | Factor de crecimiento de fibroblastos 19                                       |
| GDF           | Factor de diferenciación de crecimiento                                        |
| GH            | Hormona de crecimiento                                                         |
| GHR           | Receptor de hormona de crecimiento                                             |
| GHRH          | Hormona liberadora de hormona de crecimiento                                   |
| H&E           | Hematoxilina y eosina                                                          |
| HCC           | Hepatocarcinoma                                                                |
| HE            | Encefalopatía hepática                                                         |
| HFD           | Dieta alta en grasas                                                           |
| HGF           | Factor de crecimiento de hepatocitos                                           |
| HIF1 $\alpha$ | Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$                                        |
| HRP           | Peroxidasa de rábano                                                           |
| HSC           | Células estrelladas hepáticas                                                  |
| HTAB          | Bromuro de hexadeciltrimetilamonio                                             |
| I/R           | Isquemia/Reperfusión                                                           |
| IBM-C         | Índice de Barthel Modificado Coreano                                           |
| ID            | Proteínas inhibidoras de la unión/diferenciación del ácido desoxirribonucleico |
| ID1           | Proteína inhibidora de unión al ácido desoxirribonucleico 1                    |
| IGF1          | Factor de crecimiento insulínico                                               |
| IL            | Interleucina                                                                   |
| IL1           | Interleucina 1                                                                 |
| IL10          | Interleucina 10                                                                |
| IL1 $\beta$   | Interleucina 1 beta                                                            |
| IL6           | Interleucina 6                                                                 |
| Jak           | Quinasa Janus                                                                  |

|          |                                                     |
|----------|-----------------------------------------------------|
| KC       | Células de Kupffer                                  |
| KHB      | Tampón de bicarbonato de Krebs-Henseleit            |
| Ki67     | Antígeno Ki67                                       |
| LDH      | Lactato deshidrogenasa                              |
| Ln       | <i>Lean</i>                                         |
| LPC      | Células progenitoras hepáticas                      |
| LPS      | Lipopolisacáridos                                   |
| LR       | Regeneración hepática                               |
| LSECs    | Células endoteliales sinusoidales del hígado        |
| MAFLD    | Enfermedad del hígado graso asociada al metabolismo |
| Mapk/Erk | Proteínas quinasas activadas por mitógenos          |
| MASH     | Esteatohepatitis asociada al metabolismo            |
| MC       | Muerte cerebral                                     |
| MDA      | Malondialdehído                                     |
| MEOS     | Sistema oxidativo microsomal del etanol             |
| MMP9     | Metaloproteasa de matriz 9                          |
| MPO      | Mieloperoxidasa                                     |
| NAD      | Nicotinamida adenina dinucleótido                   |
| NADH     | Nicotinamida adenina dinucleótido reducido          |
| NADPH    | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato           |
| NEP      | Norepinefrina                                       |
| NF-κB    | Factor nuclear Kappa B                              |
| NO       | Óxido nítrico                                       |
| O. C. T  | <i>Optimal Cutting Temperature</i>                  |
| ONT      | Organización nacional de trasplantes                |
| PBS      | Tampón fosfato salino                               |
| PCNA     | Antígeno nuclear de proliferación celular           |

|               |                                                                             |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| PH            | Hepatectomía parcial                                                        |
| PI3K          | Fosfoinositol 3 quinasa                                                     |
| PKB o AKT     | Proteína quinasa b                                                          |
| PLC $\gamma$  | Fosfolipasa C gamma                                                         |
| PPAR $\alpha$ | Receptor activado por proliferadores de peroxisomas $\alpha$                |
| qPCR          | Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa                            |
| rcGH          | Hormona de crecimiento recombinante de pollo                                |
| RD            | Retinopatía diabética                                                       |
| rhGH          | Hormona de crecimiento recombinante humana                                  |
| ROS           | Especies reactivas de oxígeno                                               |
| sFLT1         | Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 1 soluble            |
| SHVE          | Exclusión vascular hepática selectiva                                       |
| STAT3         | Transductor de señal y activador de transcripción 3                         |
| Stz           | Estreptozocina                                                              |
| T2DM          | Diabetes mellitus de tipo 2                                                 |
| TBA           | Ácido tiobarbitúrico                                                        |
| TCA           | Ácido tricloroacético                                                       |
| TGF $\beta$   | Factor de crecimiento tumoral $\beta$                                       |
| TH            | Trasplante hepático                                                         |
| THVE          | Exclusión vascular hepática total                                           |
| TMB           | Tetrametilbencidina                                                         |
| TNF $\alpha$  | Factor de necrosis tumoral $\alpha$                                         |
| TTR           | Transtiretina                                                               |
| TUNEL         | Técnica de marcaje de extremos con transferasa terminal de deoxinucleotidil |
| UW            | Solución de preservación de la Universidad de Wisconsin                     |
| VEGF          | Factor de crecimiento vascular endotelial                                   |
| VEGFA         | Factor de crecimiento vascular endotelial A                                 |

|              |                                                          |
|--------------|----------------------------------------------------------|
| VEGFB        | Factor de crecimiento vascular endotelial B              |
| VEGFR1       | Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 1 |
| VEGFR2       | Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 2 |
| Wnt          | Wingless e Int                                           |
| WNT2         | Wingless e Int 2                                         |
| $\alpha$ SMA | Actina muscular lisa $\alpha$                            |



## Índice

|                                                                                                                                                       |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resumen.....                                                                                                                                          | xi    |
| Abstract .....                                                                                                                                        | xiii  |
| Abreviaciones.....                                                                                                                                    | xv    |
| <br>Introducción .....                                                                                                                                | <br>1 |
| Relevancia de las resecciones hepáticas en la clínica .....                                                                                           | 1     |
| Relevancia clínica del trasplante hepático .....                                                                                                      | 2     |
| Lesión por isquemia-reperfusión hepática .....                                                                                                        | 4     |
| Definición y relevancia clínica .....                                                                                                                 | 4     |
| Mecanismos implicados en la lesión por isquemia-reperfusión.....                                                                                      | 4     |
| Factores que inciden en los resultados postoperatorios de la cirugía hepática.....                                                                    | 7     |
| Diabetes.....                                                                                                                                         | 7     |
| Mecanismos implicados en la diabetes y en la lesión por isquemia-reperfusión hepática..                                                               | 8     |
| La lesión por isquemia-reperfusión asociada al trasplante en injertos hepáticos<br>procedentes de donantes con muerte cerebral .....                  | 9     |
| Mecanismos implicados en la lesión por la muerte cerebral y la isquemia-reperfusión.....                                                              | 9     |
| Regeneración hepática.....                                                                                                                            | 9     |
| Definición y relevancia clínica de la regeneración en la cirugía hepática .....                                                                       | 9     |
| Mecanismos generales de la regeneración hepática. ....                                                                                                | 11    |
| Efecto de la isquemia-reperfusión sobre la regeneración hepática .....                                                                                | 15    |
| Enfermedad hepática relacionada con el alcohol. ....                                                                                                  | 16    |
| Definición y relevancia clínica .....                                                                                                                 | 16    |
| Mecanismos implicados en el daño en hígados con enfermedad hepática relacionada con<br>alcoholismo .....                                              | 18    |
| Relación entre ALD y daño por I/R .....                                                                                                               | 19    |
| Importancia clínica de la resección hepática en hígados con diabetes .....                                                                            | 19    |
| Mecanismos de acción implicados en modelos experimentales de resección hepática con<br>oclusión vascular y diabetes.....                              | 19    |
| Importancia clínica del trasplante hepático con donantes procedentes de muerte cerebral y<br>con enfermedad hepática relacionada con el alcohol ..... | 20    |
| Mecanismos que podrían estar implicados en el trasplante hepático en presencia de ALD y<br>MC .....                                                   | 21    |
| GH, VEGFA y VEGFB en cirugía hepática .....                                                                                                           | 22    |
| GH.....                                                                                                                                               | 22    |

|                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| VEGFA.....                                                                                                                                                                                   | 28 |
| VEGFB.....                                                                                                                                                                                   | 36 |
| Objetivos .....                                                                                                                                                                              | 41 |
| Material y métodos .....                                                                                                                                                                     | 43 |
| Hepatectomía parcial con oclusión vascular.....                                                                                                                                              | 43 |
| Animales de experimentación.....                                                                                                                                                             | 43 |
| Anestesia .....                                                                                                                                                                              | 44 |
| Procedimiento quirúrgico .....                                                                                                                                                               | 44 |
| Diseño experimental .....                                                                                                                                                                    | 45 |
| Recogida de muestras y determinaciones .....                                                                                                                                                 | 47 |
| Máquina de perfusión normotérmica <i>ex vivo</i> .....                                                                                                                                       | 48 |
| Animales de experimentación.....                                                                                                                                                             | 48 |
| Anestesia .....                                                                                                                                                                              | 49 |
| Procedimiento quirúrgico .....                                                                                                                                                               | 49 |
| Diseño experimental .....                                                                                                                                                                    | 53 |
| Recogida de muestras y determinaciones .....                                                                                                                                                 | 54 |
| Trasplante hepático.....                                                                                                                                                                     | 55 |
| Procedimiento quirúrgico .....                                                                                                                                                               | 55 |
| Diseño experimental .....                                                                                                                                                                    | 57 |
| Recogida de muestras y determinaciones .....                                                                                                                                                 | 58 |
| Técnicas.....                                                                                                                                                                                | 59 |
| Determinaciones bioquímicas.....                                                                                                                                                             | 59 |
| Técnicas de biología molecular e histoquímica.....                                                                                                                                           | 67 |
| Análisis estadísticos.....                                                                                                                                                                   | 69 |
| Resultados.....                                                                                                                                                                              | 70 |
| Caracterización del hígado en un modelo preclínico de diabetes de tipo 2 y supervivencia tras un procedimiento de hepatectomía parcial bajo oclusión vascular .....                          | 70 |
| Estudio del efecto de la modulación de la familia de factores de crecimiento VEGF en ratas con diabetes de tipo 2 tras un procedimiento de hepatectomía parcial bajo oclusión vascular ..... | 72 |
| Investigación de la vía de señalización de la GH en un modelo preclínico de perfusión hepática <i>ex vivo</i> en ratas con enfermedad hepática asociada a alcohol .....                      | 85 |
| Supervivencia de receptores con injertos hepáticos con ALD sometidos a 24 horas de isquemia fría procedentes de donantes con muerte cerebral.....                                            | 92 |
| Discusión .....                                                                                                                                                                              | 93 |

|                    |     |
|--------------------|-----|
| Conclusiones ..... | 101 |
| Bibliografía ..... | 103 |
| Anexo .....        | 125 |



## Introducción

El hígado es un órgano vital para el organismo debido a la múltiple cantidad de funciones en las que está implicado, como la síntesis de proteínas, el metabolismo de macronutrientes o la detoxificación del organismo (Trefts, Gannon, and Wasserman 2017). Por este motivo, ante la diversidad de enfermedades hepáticas que comprometen la salud del órgano, tanto agudas como crónicas (Devlin and O'Grady 1999), es necesario encontrar una solución que permita mantener esta actividad hepática.

## Relevancia de las resecciones hepáticas en la clínica

La resección hepática es una técnica quirúrgica que consiste en la eliminación de una sección del hígado, utilizada en enfermedades hepáticas, principalmente tumores, pudiendo ser tanto primarios (si el tumor se origina en el propio órgano) como secundarios (tumores que provienen de otro tejido originalmente) (Maki and Hasegawa 2022; Søreide and Deshpande 2021). Esta cirugía pretende eliminar la lesión a nivel macroscópico, teniendo en cuenta la capacidad que tiene el hígado para recuperar tanto su masa como su funcionalidad.

A pesar de que la hepatectomía parcial (PH, por su nombre en inglés partial hepatectomy) es una cirugía bastante segura, el hígado es un órgano altamente vascularizado. Esto implica que la resección de una parte de este podría llevar a una hemorragia grave, aumentando la mortalidad y morbilidad asociadas a la cirugía. La hemorragia es, de hecho, uno de los principales riesgos asociados a la cirugía (Bodur et al. 2021). Debido a esto, han aparecido múltiples técnicas para disminuir el flujo sanguíneo (técnicas de oclusión vascular) total o parcialmente durante la operación (Mownah and Aroori 2023).

Entre estas técnicas, la más estudiada y utilizada actualmente en la práctica clínica es la maniobra de Pringle. Esta técnica, descrita inicialmente a inicios del siglo XX, consiste en ocluir la tríada portal (formada por la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar), a través de la compresión del ligamento hepatoduodenal. Aunque disminuye el sangrado durante la hepatectomía, no lo evita completamente, ya que este puede ocurrir por las venas hepáticas (Mobarak et al. 2022; Mownah and Aroori 2023).

Debido a posibles impedimentos y complicaciones a la hora de realizar esta técnica, (pudiendo variar la localización o extensión de la lesión, entre otros), además de los efectos adversos

asociados a esta técnica, se ha estudiado el uso de otras técnicas, como la exclusión vascular hepática total (THVE, por su nombre en inglés total hepatic vascular exclusion) o la exclusión vascular hepática selectiva (SHVE, por su nombre en inglés selective hepatic vascular exclusion) (Fu et al. 2009; van Gulik et al. 2007; Mobarak et al. 2022).

En el caso de la THVE, además de la maniobra de Pringle, también se impide el flujo por la vena cava inferior tanto por arriba como por debajo del hígado. Esto permite disminuir el sangrado, pero aumenta los problemas hemodinámicos derivados de impedir el flujo en una región más extensa (van Gulik et al. 2007; Mobarak et al. 2022).

En la SHVE, no se coloca un *clamp* en la vena cava inferior, sino que se colocan *clamps* en las venas hepáticas, controlando el flujo que entra y sale del hígado, disminuyendo los problemas hemodinámicos con respecto a la THVE. Por otra parte, en este caso, la cirugía presenta una mayor dificultad y se pueden lastimar las venas hepáticas, llevando finalmente a una mayor hemorragia que en los casos anteriores (Fu et al. 2009; Mobarak et al. 2022).

En cualquier caso, todas estas técnicas sirven para reducir el flujo de sangre, ya sea de forma total o parcial, y mejorar el resultado postoperatorio. Sin embargo, la interrupción del flujo sanguíneo también provoca efectos negativos en las fases posteriores a la cirugía, entre los que cabe mencionar el daño por isquemia-reperfusión y la congestión intestinal, así como el fallo en la regeneración hepática (Carmen Peralta, Jiménez-Castro, and Gracia-Sancho 2013).

Finalmente, es necesario destacar que si la resección hepática bajo oclusión vascular afecta negativamente a hígados no patológicos, aún son más evidentes los efectos nocivos cuando se realiza la cirugía en hígados patológicos, como los que presentan esteatosis (acumulación de lípidos en el hígado) (Bujaldon et al. 2019), o desórdenes relacionados con el alcohol (Okamura et al. 2018) o la diabetes (Qingshan Li et al. 2017), ya que tales tipos de hígados toleran poco la lesión inducida por la isquemia-reperfusión y los fallos en la regeneración son más evidentes debido a sus condiciones patológicas.

## **Relevancia clínica del trasplante hepático**

El trasplante hepático (TH), generalmente ortotópico (es decir, de un organismo diferente del receptor del órgano) es una técnica quirúrgica que se emplea cuando no se encuentran medidas terapéuticas alternativas y cuando la esperanza de vida de la persona es inferior si no se somete al trasplante (Burra et al. 2016).

Esta técnica ha ido evolucionando desde sus inicios a mediados del siglo pasado, cuando era una práctica experimental, hasta la actualidad, llegando a ser una cirugía realizada habitualmente y con una tasa de supervivencia elevada (Burra et al. 2016). Esto se debe, al refinamiento de las técnicas quirúrgicas, la mejora de los fármacos utilizados (especialmente en el caso de los inmunosupresores), la mejora de las soluciones de preservación o el manejo de las complicaciones posteriores, entre otros (Burra et al. 2016).

No obstante, siguen existiendo varios problemas por solucionar. En primer lugar, hay una mayor demanda que oferta de hígados, lo cual implica una larga lista de espera para trasplantes y que una gran cantidad de pacientes fallezcan antes de poder acceder a la cirugía (Burra et al. 2018). En España, a pesar de que se tiene una de las mayores tasas tanto de donación como de trasplante por cápita, la lista de pacientes que esperan para someterse a la cirugía sigue siendo elevada (ONT 2023). Por este motivo, se necesita una serie de mejoras para paliar en la medida de lo posible este problema. Esto implica optimizar los recursos disponibles: en primer lugar, mediante la continua mejora del procedimiento asociado al TH (mejorando, entre otros, la farmacología utilizada según el estado del paciente, la técnica quirúrgica y el manejo del postoperatorio), con la finalidad de evitar en la medida de lo posible complicaciones posteriores evitables que lleven a la necesidad de un retrasplante (Neuberger 2004) y, en segundo lugar, utilizando hígados procedentes de donantes con criterio extendido, es decir, utilizar injertos hepáticos que se encuentran en condiciones clínicas subóptimas que suponen un mayor riesgo tanto para la cirugía como para el resultado postoperatorio, como es el caso de injertos hepáticos esteatósicos, diabéticos o de donantes alcohólicos, y que normalmente no son considerado aptos para el trasplante por sus condiciones patológicas (M. B. Jiménez-Castro, Gracia-Sancho, and Peralta 2015; Montalti et al. 2004; ONT 2023).

Además, de la misma forma que en la resección hepática, los órganos sometidos al proceso del TH requieren de un proceso de isquemia-reperfusión (I/R), siendo esta una de las principales causas tanto de disfunción primaria como de fallo primario del injerto (Carmen Peralta, Jiménez-Castro, and Gracia-Sancho 2013). Además, las condiciones patológicas de los hígados procedentes de donantes con criterio extendido presentan un riesgo mayor de disfunción o fallo del injerto hepático (M. B. Jiménez-Castro, Gracia-Sancho, and Peralta 2015).

## **Lesión por isquemia-reperfusión hepática**

### **Definición y relevancia clínica**

La lesión por isquemia-reperfusión es un fenómeno bifásico (ocurriendo, en primer lugar, la isquemia y, en segundo lugar, la reperfusión), en el que hay una reducción del flujo sanguíneo en un órgano, en este caso al hígado, que provoca una condición de hipoxia (isquemia). Esto provoca daño celular, que se incrementa tras restablecer el flujo (reperfusión). Como se ha mencionado previamente, la lesión es inherente a las cirugías mayores hepáticas (PH y TH) y es relevante tanto en mortalidad como en morbilidad postoperatorias (Cornide-Petronio et al. 2020; Mónica B. Jiménez-Castro et al. 2019; Carmen Peralta, Jiménez-Castro, and Gracia-Sancho 2013), motivo por el cual ha sido objeto de estudio a lo largo del tiempo.

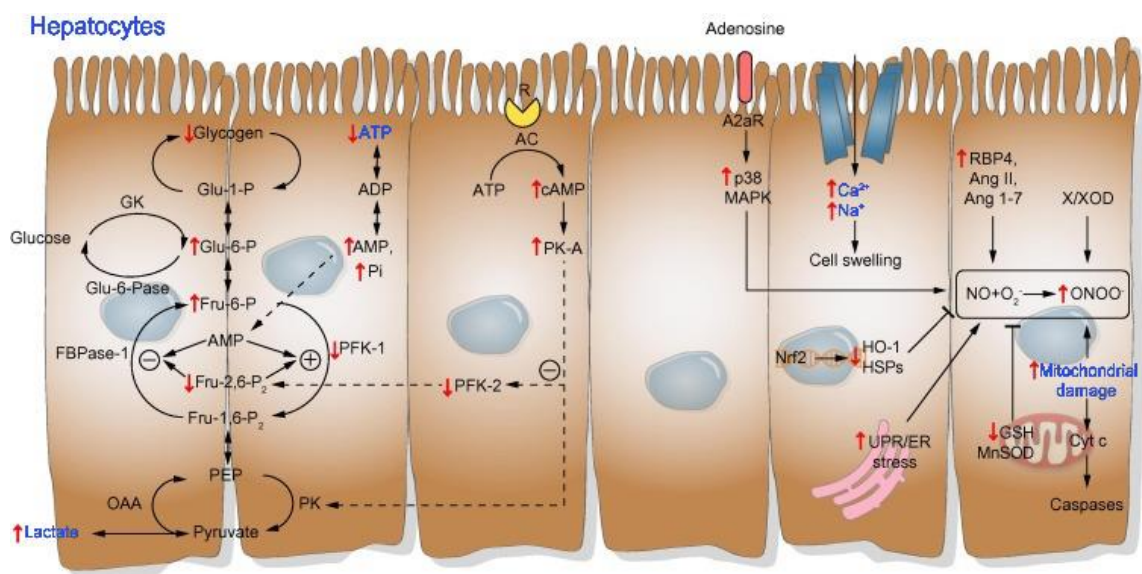
En el daño por I/R hepático hay una gran variedad de mecanismos, factores y tipos celulares implicados. Estas células se podrían dividir en dos grupos, las que forman parte del tejido hepático: hepatocitos, células endoteliales sinusoidales del hígado (LSEC, por su nombre en inglés Liver Sinusoidal Endothelial Cells), células de Kupffer (KC, por su nombre en inglés Kupffer cells) y células estrelladas hepáticas (HSC, por su nombre en inglés hepatic stellate cells); y las que vienen de la sangre: plaquetas, neutrófilos y macrófagos (Carmen Peralta, Jiménez-Castro, and Gracia-Sancho 2013).

Los mecanismos, factores y tipos celulares implicados en el daño por I/R varían en función del tipo de isquemia. Esta se puede dividir según varias características: atendiendo a la temperatura (fría, si se realiza a temperaturas inferiores a la del organismo; o caliente, si se realiza a la misma temperatura que la del organismo); la extensión (total o parcial) y su duración (el tiempo puede variar de minutos a horas o, incluso, días). Estos mecanismos, factores y tipos celulares diversos hacen que la obtención de una técnica o fármaco que pueda ser aplicable en todos los casos relacionados con este procedimiento sea una tarea mucho más difícil, y de ahí que la lesión inducida por isquemia-reperfusión en el trasplante hepático y en las resecciones hepáticas y, especialmente en el caso de presentar los hígados condiciones patológicas, sigue siendo un problema sin resolver en la práctica clínica.

### **Mecanismos implicados en la lesión por isquemia-reperfusión**

Los principales tipos celulares afectados durante el proceso de I/R son los hepatocitos (Figura 1), los cuales también representan la mayoría del parénquima hepático (alrededor del 80%) (Davies, Reynolds, and Stamataki 2018). Tras la isquemia, las células no reciben oxígeno. Esto hace que las mitocondrias no puedan realizar la respiración aeróbica, ya que el O<sub>2</sub> es el aceptor final de electrones de este proceso. Al disminuir la respiración aeróbica, los niveles de adenosina

trifosfato (ATP) disminuyen. Para compensar este hecho, aumenta la glicólisis para incrementar los niveles de ATP a través de la respiración anaeróbica (fermentación), que no requiere oxígeno. No obstante, esto conlleva una serie de problemas asociados, como son el aumento de los niveles de lactato, alteraciones de pH y alteración de homeostasis de iones como  $H^+$ ,  $Na^+$  o  $Ca^{2+}$ . Estos cambios provocan estrés oxidativo y daño en la célula (Gasbarrini et al. 1992; C. Peralta et al. 2000). Por tanto, al ser el hepatocito una célula metabólicamente demandante por las funciones que desarrolla (metabolismo, síntesis de proteínas o detoxificación, entre otros) (Kalra et al. 2024), se ve gravemente perjudicado.



**Figura 1.** Esquema de los mecanismos relacionados con el daño por isquemia-reperfusión en hepatocitos. Adaptado de: (Carmen Peralta, Jiménez-Castro, and Gracia-Sancho 2013)

A pesar de que los hepatocitos son los principales afectados, el efecto negativo de la I/R se da también en otros tipos celulares. En el caso de las LSECs, especialmente cuando se produce la isquemia fría, experimentan edema y un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS, por su nombre en inglés Reactive Oxygen Species) (Huet et al. 2004). Las ROS, cuando se encuentran en niveles elevados en la célula, acaban alterando macromoléculas celulares (cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas o lípidos, entre otros), dañando la célula, promoviendo la disfunción metabólica y un incremento de la respuesta inflamatoria, que acaba llevando a la muerte celular (Z. Chen et al. 2020). En el caso de las KC, estas se activan a partir de factores como los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, por su nombre en inglés Damage Associated Molecular Pattern). Esto hace que aumente la secreción de ROS y la inflamación, a partir de la secreción de citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ , por su nombre en inglés Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) o la interleucina  $1\beta$  (IL $1\beta$ ) (Dai et al. 2021;

Huang et al. 2011), la cual, a su vez, promueve que los neutrófilos que vienen de la sangre secreten ROS y proteasas, aumentando aún más el estrés y daño celulares (Perry et al. 2011). Finalmente, cabe mencionar el papel de las plaquetas, al secretar, en respuesta al proceso por I/R, factores como el factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF $\beta$ , por su nombre en inglés Tumor Growth Factor  $\beta$ ) o el óxido nítrico (NO, por su nombre en inglés nitric oxide) (Jaeschke 2003), implicado en la lesión de LSECs (Sindram et al. 2000), incrementando aún más la disfunción endotelial.

Una vez se recupera el flujo sanguíneo en la reperfusión, el daño causado por la isquemia no se revierte, ya que tras reintroducir el O<sub>2</sub> a los tejidos isquémicos se produce un aumento de ROS. Estos ROS están mayormente provocados por las mitocondrias de las células hepáticas. Como se ha mencionado previamente, los hepatocitos son células metabólicamente muy activas, y tienen elevados niveles de mitocondrias, por lo tanto, es de esperar que estas células se vean negativamente afectadas durante la reperfusión (Caraceni et al. 2005). Además, otros tipos celulares también se ven afectados por la reperfusión, como las LSECs (Jia et al. 2023), y se eleva el entorno proinflamatorio, provocado por las KC, las plaquetas y los neutrófilos (Kaltenmeier et al. 2022).

Además de la importancia que tienen estos mecanismos y tipos celulares implicados en el daño por la I/R, es importante tener en cuenta que estos mismos mecanismos y los tipos celulares afectados pueden variar en función de los diversos tipos de isquemia:

- **Según la temperatura a la que se realiza la isquemia.** La isquemia caliente ocurre durante la resección hepática en su totalidad y en algunos momentos del TH. En este caso, principalmente se encuentra afectado el hepatocito (Ikeda et al. 1992). Como se ha indicado previamente, el impedimento de circulación sanguínea impide la respiración aeróbica, bajan los niveles de ATP y el hepatocito activa mecanismos de compensación que alteran la homeostasis y aumentan el estrés oxidativo, pudiendo llevar incluso a muerte celular. En el caso de la isquemia fría, la cual ocurre durante la mayoría del TH, los hepatocitos pueden llegar a ser viables durante un tiempo más largo, a pesar de que tampoco se evita el estrés y daño celular (Mochida et al. 1994). No obstante, en este caso, las LSECs son las que se ven especialmente afectadas tras la reperfusión (Bilzer and Gerbes 2000). Esto provoca fallos microcirculatorios, que son la principal causa de disfunción o fallo primario tras el trasplante.
- **Según la extensión de la isquemia.** Durante una isquemia total, se impide la circulación de la sangre por todo el tejido hepático. En este caso, no solamente se encuentra

afectado el hígado por los procesos de I/R, sino que el daño se extiende a otros tejidos. Tal es el caso del intestino, en el cual se produce una congestión (Cannistrà et al. 2016). Debido a este motivo, se emplea en múltiples ocasiones la isquemia parcial, es decir, impedir el flujo sanguíneo a una parte del tejido, permitiendo que este siga estando presente en una parte del hígado. No obstante, esta solución provoca un mayor flujo de sangre por el tejido que queda sin estar isquémico y, tras la cirugía, también provoca que el flujo sanguíneo normal tarde más en recuperarse que en el caso de la isquemia total (Hayashi et al. 1986).

- **Según el tiempo de la isquemia.** Según la isquemia, puede variar tanto la cantidad de estrés y daño como los mecanismos implicados. Por ejemplo, durante la resección hepática, si hay una isquemia caliente de 60 minutos, aparece una lesión celular reversible. No obstante, si la isquemia dura más tiempo (2 o 3 horas), se ha observado que hay daños irreversibles (González-Flecha, Cutrin, and Boveris 1993). Además, el efecto del tiempo de isquemia también se ve afectado por el tipo de hígado. En hígados patológicos, como los esteatósicos, hay una menor tolerancia al tiempo de isquemia (Massip-Salcedo et al. 2007).

Para el TH, el tiempo de isquemia es tan relevante que se considera al periodo isquémico como un predictor de disfunción del injerto tras la cirugía, al aumentar gradualmente el riesgo de eventos negativos durante el periodo de la misma (Pan et al. 2018).

En resumen, los mecanismos de daño hepático y los tipos celulares implicados son variables según los tipos de isquemia, dificultando de esta forma el establecimiento de una estrategia eficaz y universal que pueda ser utilizada para todas las situaciones clínicas.

## Factores que inciden en los resultados postoperatorios de la cirugía hepática

### Diabetes

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica y progresiva. Está caracterizada por una hiperglicemia prolongada, debido a la pérdida de la vía de señalización de la insulina. Se distinguen dos tipos de diabetes: de tipo 1 y de tipo 2. La diabetes de tipo 1 se caracteriza por la destrucción de las células beta pancreáticas, responsables de la síntesis de insulina, por parte del sistema inmune. En la diabetes de tipo 2 (T2DM), la cual representa más del 90% de pacientes con diabetes, el páncreas no es capaz de producir los niveles suficientes de insulina, debido generalmente a una resistencia periférica a la insulina y/ o a niveles insuficientes de insulina (Ahmad et al. 2022; Arneth, Arneth, and Shams 2019).

### *Diabetes de tipo 2*

La diabetes de tipo 2 se caracteriza por una insensibilidad a los niveles de insulina y a la incapacidad de las células beta de producir los niveles necesarios de hormona. Es una enfermedad progresiva, ya que se inicia en un estado prediabético, donde los niveles de glucosa en sangre son más elevados de lo normal, aunque inferiores al estado diabético. Si no se solventa este problema, puede progresar a la diabetes de tipo 2. En este estadio, el cuerpo no puede secretar la suficiente cantidad de insulina, y el páncreas padece una sobreactivación que acaba llevando a la destrucción de células beta, incrementando aún más el problema (Ruze et al. 2023; Y. Zhang, Shen, and Wang 2022). La prevalencia de la diabetes de tipo 2 es de alrededor del 10% de la población, y se encuentra en aumento, junto a otros desórdenes metabólicos estrechamente relacionados, como la obesidad o la enfermedad del hígado graso asociada al metabolismo (MAFLD, por su nombre en inglés Metabolic Associated Fatty Liver Disease, también llamada non-alcoholic fatty liver disease or NAFLD) (Islam et al. 2023; Tanase et al. 2020).

### **Mecanismos implicados en la diabetes y en la lesión por isquemia-reperfusión hepática**

Durante la diabetes, hay un estado inflamatorio crónico y un aumento del estrés celular (Desai, Sanap, and Bhonde 2020; Pickup 2004). Esto se debe, entre otros, a la hiperglicemia persistente, la cual provoca el aumento de citoquinas proinflamatorias y del estrés oxidativo, lo cual retroalimenta a la propia hiperglicemia (Dungan, Braithwaite, and Preiser 2009). Además, la resistencia a insulina provoca un estado catabólico en el que hay un aumento de la lipólisis y una disminución de la glicólisis. Adicionalmente, se produce una infiltración de células inmunitarias en el tejido adiposo, provocando una liberación de citoquinas proinflamatorias (como TNF $\alpha$  o IL1 $\beta$ ) generando, a su vez, una mayor resistencia a insulina. Además, en este estado, el tejido adiposo secreta más ácidos grasos libres a la sangre, activando al sistema inmune y promoviendo más la inflamación, lo cual provoca, una vez más, un incremento de la resistencia a insulina (Pickup 2004). Una gran cantidad de factores asociados a la T2DM son similares a los que se originan durante la I/R, como el estrés oxidativo y el aumento de la inflamación sistémicos. Esto implica que el daño hepático tras el proceso de I/R en organismos con estas patologías puede aumentar en comparación a un hígado sano. Además, cabe destacar que la esteatosis, presente en la mayor parte de pacientes que cursan con T2DM (Marušić et al. 2021; Tanase et al. 2020), es un factor estrechamente relacionado con el daño por I/R.

### **La lesión por isquemia-reperfusión asociada al trasplante en injertos hepáticos procedentes de donantes con muerte cerebral**

Los injertos hepáticos sometidos a trasplante pueden provenir a partir de dos tipos de donantes cadavéricos: tras una muerte circulatoria debido a una parada cardíaca y tras una muerte cerebral irreversible (MC). El 80% de los injertos donantes susceptibles de ser trasplantados provienen de hígados de donantes con MC (Mónica B. Jiménez-Castro et al. 2017).

La muerte cerebral afecta negativamente al hígado en el donante antes de extraer el injerto hepático del donante, y tales efectos nocivos son exacerbados cuando se someten a un periodo de isquemia fría y son implantados en el receptor. (S. Chen et al. 2020). Estos efectos, además, cambiarán de gravedad en función de la duración de la MC (Dziodzio, Biebl, and Pratschke 2014).

Entre estos efectos negativos que ocurren en el donante, se encuentran la disminución del flujo sanguíneo, la disrupción en la señalización hormonal, la infiltración de neutrófilos o el incremento de la síntesis de citoquinas. El conjunto de estos procesos afecta negativamente tanto al daño por I/R de los injertos hepáticos como a la propia cirugía del trasplante en general, disminuyendo la supervivencia (S. Chen et al. 2020).

### **Mecanismos implicados en la lesión por la muerte cerebral y la isquemia-reperfusión**

Entre los mecanismos por los cuales la MC exagera el daño inducido por I/R, se encuentra el aumento de citoquinas proinflamatorias del hígado, como IL1b y TNF $\alpha$ . Adicionalmente, se observa un aumento de infiltración de neutrófilos asociado a un incremento del estrés inflamatorio, debido a un aumento de las ROS. Además de la necrosis, la muerte cerebral puede promover la muerte celular por apoptosis. Esto implica una exacerbación de la inflamación y del daño del tejido tras el proceso de I/R, aumentando las posibilidades de disfunción hepática o fallo primario tras el trasplante y, en consecuencia, la mortalidad y la morbilidad (Dziodzio, Biebl, and Pratschke 2014; Mónica B. Jiménez-Castro et al. 2017).

## **Regeneración hepática**

### **Definición y relevancia clínica de la regeneración en la cirugía hepática**

La regeneración hepática (LR, por su nombre en inglés Liver Regeneration) representa la capacidad del hígado para recuperarse tras un daño agudo o crónico con la finalidad de recuperar su masa y/o función. El daño puede deberse, generalmente, a un agente dañino o a procedimientos que impliquen una elevada muerte celular, generalmente cirugías hepáticas, entre la que destaca la hepatectomía parcial. Tal es el alcance de esta regeneración hepática que es posible regenerarse completamente a partir de una pequeña cantidad restante tras la

cirugía (Elias-Miró et al. 2014). No obstante, este proceso requiere mucha energía y, en el caso del ser humano, puede tardar meses (Yagi et al. 2020).

Es importante destacar que la regeneración hepática no implica la recuperación del tejido hepático anatómicamente igual al original, sino que se debe más bien a un mecanismo de compensación que proviene del tejido hepático restante (Wu et al. 2023). Otro factor importante a tener en cuenta es que, según la cantidad de tejido extirpado, en el caso de una hepatectomía parcial, la recuperación de la masa del tejido se dará por procesos diferentes. Por ejemplo, se conoce que, tras una hepatectomía del 30%, los hepatocitos experimentan procesos de hipertrofia, pero no de división celular, que si se observa en hepatectomías del 70% (Yagi et al. 2020). Por ello, es importante considerar el porcentaje de resección en los estudios relacionados con esta cirugía.

Existen diferentes células implicadas en la regeneración hepática, aunque los hepatocitos son las principales células implicadas en la regeneración, algo lógico, ya que representan la mayor parte del tejido hepático. Los hepatocitos generalmente se encuentran en un estado quiescente en un organismo adulto. Aun así, son capaces de entrar en el ciclo celular si reciben el estímulo proliferativo necesario (Ozaki 2020).

Además de los hepatocitos, otras células del hígado están involucradas en la regeneración hepática, como las células progenitoras hepáticas (LPC, por su nombre en inglés liver progenitor cells), que son capaces de diferenciarse tanto en hepatocitos como en células del conducto biliar, aunque se encuentren en menor medida en el tejido hepático (Nishii et al. 2018). Otras células residentes del tejido hepático involucradas en la regeneración hepática son las LSECs (B.-S. Ding et al. 2010) o las KC (L. Li et al. 2023), las cuales participan en la secreción de factores de crecimiento que actúan sobre los hepatocitos, como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por su nombre en inglés hepatocyte growth factor) o el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGFA, por su nombre en inglés vascular endothelial growth factor A)(DeLeve 2013; Takeishi et al. 1999; Yagi et al. 2020). Asimismo, también están implicadas células sanguíneas que van a parar al órgano, como las plaquetas (Lesurtel et al. 2006) o los macrófagos (Campana et al. 2021).

Seguidamente, es fundamental mencionar el papel de tejidos extrahepáticos en los procesos de regeneración del hígado, como son el páncreas, el intestino o el tejido adiposo:

- En el caso del páncreas, este es capaz de secretar hormonas y factores de crecimiento, como la insulina, la cual está relacionada con la regeneración hepática por su papel como inductora de la proliferación de los hepatocitos (Kimura and Ogihara 1997).
- En el caso del intestino, teniendo en cuenta el eje hígado-intestino, diferentes trabajos reportados en la literatura indican que el intestino es un componente importante que colabora en la regeneración hepática (Cornell 1985; Micó-Carnero et al. 2021), a través de la secreción de diversos factores, como los factores de crecimiento de fibroblastos 15 y 19 (FGF15/19, por sus nombres en inglés fibroblast growth factor 15/19) (Qiang Li et al. 2018).
- En el caso del tejido adiposo, se ha reportado un papel de las adipocitoquinas en la regeneración hepática, además de su participación en la obtención de energía necesaria tras la cirugía (Elias-Miró et al. 2014).

La aparición de factores negativos que alteren regeneración hepática puede provocar que ésta no se realice correctamente, o incluso llevar a un fallo en la regeneración. Entre estos factores, se conoce que son muy importantes el daño por I/R (Zdujic et al. 2024) y enfermedades tanto hepáticas (Valdecantos et al. 2018) como sistémicas, especialmente las que están relacionadas con el metabolismo (Qingshan Li et al. 2017).

### **Mecanismos generales de la regeneración hepática.**

Como se ha mencionado previamente, la LR es un proceso que implica varios órganos y tipos celulares, en el que aparecen una serie de factores y vías de señalización que se acoplan en el tiempo (Figura 2). Por este motivo, es imprescindible una regulación precisa en tiempo y espacio. La LR se divide en tres fases: iniciación, proliferación y terminación. A continuación, las veremos con más detalle.

## Mecanismos implicados en la regeneración hepática tras resección hepática

| Iniciación                    | Proliferación   | Terminación  |
|-------------------------------|-----------------|--------------|
| Alteraciones hemodinámicas    | Vía de Hippo    | TGF- $\beta$ |
| Angiogénesis                  | Vía de Pi3k-Akt | Activinas    |
| Vía de Notch                  | HGF             | BMP          |
| Vía de Wnt/ $\beta$ -catenina |                 |              |
| IL-6                          |                 |              |
| TNF- $\alpha$                 |                 |              |
| HGF                           |                 |              |

**Figura 2.** Representación esquemática de los mecanismos implicados en las diferentes fases de la regeneración hepática.

### Fase de iniciación

En un principio, la mayoría de los hepatocitos están quiescentes, y rara vez están en fase de mitosis. Por lo tanto, cuando se requiere que se produzca la regeneración hepática tras la hepatectomía parcial, es importante la secreción de señales de proliferación que provoquen la entrada en el ciclo celular de los hepatocitos (Ozaki 2020). Entre los principales factores implicados en la fase de iniciación, se encuentran la interleucina 6 (IL6), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , por su nombre en inglés tumor necrosis factor  $\alpha$ ) y el HGF. Además, cabe mencionar otros procesos y vías relevantes, como alteraciones hemodinámicas, angiogénesis, la vía de Notch o la vía de señalización Wntless e Int (Wnt) y  $\beta$ -catenina.

- **IL-6.** Es una citoquina secretada por las KC. Participa también en proliferación, diferenciación o supervivencia (Naseem, Hussain, and Manzoor 2018).
- **TNF- $\alpha$ .** Es un factor de crecimiento secretado por las KC. Entre los numerosos procesos celulares en los que está implicado, activa el factor nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B, por su nombre en inglés Nuclear Factor Kappa B) (Wajant, Pfizenmaier, and Scheurich 2003), el cual, a su vez, activa IL-6 (Libermann and Baltimore 1990), promoviendo la LR.
- **HGF.** Además de formar parte en la fase de iniciación de la LR, también es importante en la fase de proliferación. Es la principal citoquina involucrada en la proliferación de los hepatocitos. Además, está implicado en la proliferación de otras células, como las células epiteliales o endoteliales. Entre sus funciones, se encuentran la protección y supervivencia celular a partir de su unión al receptor c-MET (c-Met). Entre las vías que

activa, se encuentran la de fosfoinositol 3 quinasa (Pi3k, por su nombre en inglés phosphoinositide 3 kinase) y proteína quinasa b (Pkb o Akt, por su nombre en inglés Protein kinase B) o la de la quinasa Janus (Jak, por su nombre en inglés Janus kinase) junto al transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3) (Zhao et al. 2022). Centrado en el hepatocito, actúa de forma paracrina promoviendo la síntesis de ADN y la mitosis (Scheving et al. 2002). Proviene tanto del tejido hepático, sintetizado por los mismos hepatocitos, KC, LSECs y células estrelladas, o de tejidos extrahepáticos, especialmente en las fases iniciales de la LR.

- **Alteraciones hemodinámicas.** Tras la resección hepática, aumenta el flujo portal al hígado restante respecto a lo que había previamente a la cirugía. Esto provoca, entre otros efectos, un aumento de la disponibilidad en el hígado de factores circulatorios derivados de otros tejidos. Además, se produce la tensión de cizallamiento (o *shear stress*), el cual, a través de receptores como el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 2 (VEGFR2, por su nombre en inglés vascular endotelial growth factor receptor 2) y proteínas como la proteína inhibidora de unión al ADN 1 (Id1, por su nombre en inglés Inhibitor of DNA Binding 1), induce la proliferación de las LSECs (Y. Sato et al. 1997) y, por lo tanto, la angiogénesis.
- **Angiogénesis.** La angiogénesis es un proceso fundamental en la regeneración hepática (Uda et al. 2013). Las LSECs secretan varios factores de crecimiento y de supervivencia celular, como HGF o óxido nítrico (B.-S. Ding et al. 2010) .
- **Vía de Notch.** Esta vía es de las primeras en activarse tras la hepatectomía. Entre las proteínas reguladas por esta vía, está el factor inducible por hipoxia 1α (HIF1α, por su nombre en inglés Hypoxia inducible factor1α), el cual, a su vez, induce la síntesis de factores implicados en la LR, como el VEGFA (Ahluwalia and Tarnawski 2012; Y. Li et al. 2020).
- **Vía de Wnt/β-catenina.** Actúa sobre la proliferación y diferenciación de los hepatocitos (B.-S. Ding et al. 2010).

### **Fase de proliferación**

Una vez se dan las señales de iniciación de la LR, los hepatocitos proceden a replicar el ADN y proliferar para recuperar la masa celular perdida. En este proceso, varias proteínas y vías están implicadas. Entre estas vías, destacan la vía de Hippo, la vía de Pi3k-Akt y la vía de HGF.

- **Vía de Hippo.** Está involucrada en la regulación del tamaño del órgano a través de YAP/TAZ. Además de regular señales de proliferación y supervivencia, también tiene funciones de homeostasis y metabolismo (Driskill and Pan 2021).
- **Vía de Pi3k-Akt.** Pi3k es una proteína regulada por múltiples factores, como es el VEGFA (Bujaldon et al. 2019). Al ser activada, se desencadena la activación de una cascada de vías de señalización, como es el caso de Akt a través de la proteína quinasa 1 dependiente de la proteína 3 fosfoinositada (PDK1, por su nombre en inglés 3-phosphoinositide-dependent protein kinase) (Dieterle et al. 2014). Akt participa en múltiples procesos, como la regulación del ciclo celular, la proliferación, la apoptosis, la angiogénesis o el metabolismo (Manning and Toker 2017). En el hígado, promueve la proliferación de los hepatocitos (Zhong et al. 2019).
- **HGF.** Como se ha dicho previamente, participa tanto en la iniciación como en la proliferación (Zhao et al. 2022).

### **Fase de terminación**

Una vez el hígado recupera su masa y funcionalidad, se debe evitar que haya un crecimiento descontrolado y que pare en el momento indicado. Para ello, la superfamilia de TGF- $\beta$  es la principal encargada, pudiendo distinguirse, a su vez el TGF- $\beta$ , las activinas y las proteínas morfogénicas óseas (BMP, por su nombre en inglés bone morphogenetic proteins).

- **TGF- $\beta$ .** Es un potente inhibidor de la proliferación de los hepatocitos, relacionado con el bloqueo del ciclo celular (Dixon et al. 1999). Entre los reguladores de TGF- $\beta$  se encuentran el factor de diferenciación de crecimiento (GDF, por su nombre en inglés Growth Differentiation Factor) (W. Wang et al. 2019) o la simvastatina (Fang, He, and Luan 2017), promoviendo o inhibiendo su función, respectivamente.
- **Activinas.** Las activinas se pueden encontrar de tres formas: activina A, activina B o activina AB. Entre otros, la secreción de activina A por las células endoteliales inhibe la proliferación de los hepatocitos (Date et al. 2000).
- **BMP.** Dentro de la familia de las BMPs, se encuentran tanto proliferativas (BMP-7) (Cui et al. 2022) como anti-proliferativas (BMP-2 o BMP-4)(Do et al. 2012; C.-P. Xu et al. 2006).

Además, es importante destacar la necesidad de un metabolismo adecuado, ya que este será imprescindible para recuperar el tamaño normal a partir del tejido remanente tras una resección. Los tipos celulares principales relacionados con el metabolismo son los hepatocitos y las LSECs (Le Roy et al. 2018).

En los primeros estadios tras la PH, se produce una serie de cambios hormonales que incrementan la gluconeogénesis y la glicogenólisis. Esta glucosa, además, se utiliza para la vía de las pentosas fosfato para obtener nicotiamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), necesaria para la síntesis de lípidos y ADN (Valdecantos et al. 2018). Además, el metabolismo lipídico se encuentra aumentado, ya que, entre otras acciones, permite la obtención de energía a partir de la  $\beta$ -oxidación y forman parte de las membranas celulares (Mendes-Braz et al. 2014).

### **Efecto de la isquemia-reperfusión sobre la regeneración hepática**

En un hígado sometido a una hepatectomía parcial, se requiere una serie de procesos para poder regenerar el tejido. No obstante, el daño por I/R, que es inevitable en la práctica clínica, afecta negativamente a este proceso de LR (Carmen Peralta, Jiménez-Castro, and Gracia-Sancho 2013).

Hay numerosas vías que se encuentran presentes tanto en la regeneración hepática como en el proceso de isquemia/reperfusión. No obstante, y de manera resumida, los efectos de la I/R sobre la regeneración se pueden dividir en efectos a nivel metabólico, efectos celulares y efectos sobre las vías de señalización.

- **Efectos a nivel metabólico.** El hígado requiere importantes niveles de energía para poder regenerar la masa hepática perdida. El desajuste producido tras la isquemia y la reperfusión, en el que se disminuyen los niveles energéticos debido a la disminución de los niveles de  $O_2$ , provoca una falta de energía en el tejido para que recupere su tamaño inicial.
- **Efectos sobre las células.** Tras la hepatectomía parcial, se pierde una gran cantidad de tejido hepático. Durante el proceso de I/R, también aparece la muerte celular, especialmente en hepatocitos y LSECs. La suma de ambos procesos reduce aún más la masa hepática disponible para la regeneración y la pérdida de células que pueden ejercer efectos beneficiosos sobre la regeneración. Por otra parte, se produce la activación de otras células que no hacen más que exacerbar los fallos en la regeneración hepática.
- **Efectos sobre vías de señalización.** La LR es un proceso muy regulado en espacio y tiempo. Esto implica que se requiere que los niveles de los factores implicados aumenten o disminuyan de forma coordinada según la fase de regeneración en la que se encuentre el órgano. La I/R altera la síntesis de diferentes factores implicados en la regeneración hepática, como es el caso de  $TNF\alpha$ , el cual es una citoquina proinflamatoria. A pesar de su papel en la regeneración hepática que ya hemos mencionado, si se encuentra en niveles demasiado elevados, provoca un entorno

proinflamatorio que acaba llevando a la muerte del tejido (Schwabe and Brenner 2006). Otro factor relacionado con la LR es el TGF $\beta$ , cuyo papel en la regeneración hepática aparece en la fase de terminación, mientras que la I/R hace que aumente sus niveles en los primeros instantes tras la LR, es decir, durante la fase de iniciación, una fase donde debe estar menos presente. Esto dificultan la correcta proliferación de hepatocitos y promueve la activación de fibroblastos, dando lugar a la fibrosis y disminuyendo, de esta forma, la capacidad funcional del órgano (F. Xu et al. 2016).

Por lo tanto, es importante el estudio de los procedimientos de PH e I/R de forma conjunta, ya que los resultados de los estudios de los procesos por separado pueden ser completamente distintos a cuando se combinan ambos dificultando, por consiguiente, la traslación de los resultados obtenidos en los estudios preclínicos a la práctica clínica que, como se ha señalado previamente, en multitud de ocasiones requiere de técnicas de oclusión vascular cuyo procedimiento de I/R es inevitable. Además, al estar afectados tanto los procesos de I/R como de LR por la posibilidad de que los hígados que han de someterse a cirugía son patológicos, es importante el estudio de estas enfermedades en el contexto de los dos procesos tanto en la clínica como en la preclínica.

## **Enfermedad hepática relacionada con el alcohol.**

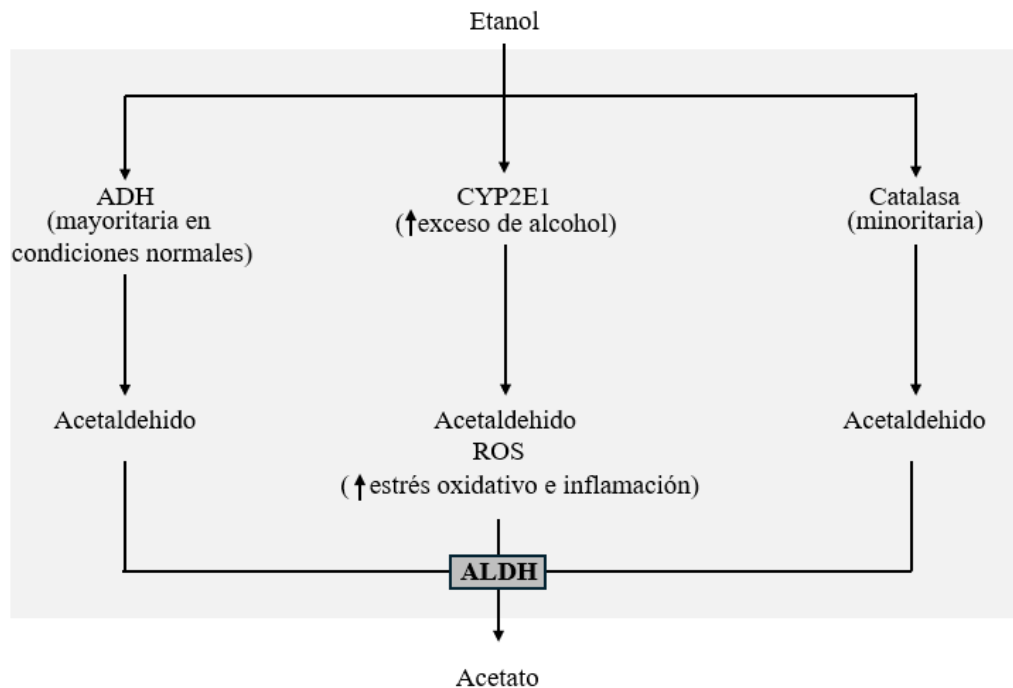
### **Definición y relevancia clínica**

La enfermedad hepática relacionada con el alcohol (o ALD, por su nombre en inglés Alcohol-Related Liver Disease), engloba una serie de enfermedades relacionadas con el consumo elevado de alcohol durante un tiempo sostenido. Estas enfermedades siguen una progresión, que puede ir desde la esteatosis hepática a esteatohepatitis (en la que, además de esteatosis, hay inflamación en el hígado), a fibrosis y, finalmente, a cirrosis y/o hepatocarcinomas (HCC). Una vez se reconoce la aparición del ALD, es de vital importancia solucionarlo lo antes posible, ya que en los primeros estadios el daño es reversible (Patel and Flamm 2023).

Hay dos órganos principalmente afectados por el consumo de alcohol: el intestino y el hígado. El intestino se ve afectado debido a que el consumo de alcohol afecta directamente al epitelio intestinal, disminuyendo la integridad de la mucosa y, por ende, aumentando la permeabilidad del órgano y permitiendo la entrada en la sangre de productos microbianos, como los lipopolisacáridos (LPS). Por otra parte, el hígado se ve afectado, ya que es el encargado de metabolizar el etanol del organismo (Thursz and Lingford-Hughes 2023).

En el hígado, el alcohol se metaboliza principalmente en los hepatocitos, pudiendo hacerse de tres formas (Figura 3):

- A través de la alcohol deshidrogenasa (ADH), localizada en el citoplasma, que utiliza la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) como cofactor. La ADH cataliza el paso de etanol a acetaldehído, el cual es altamente tóxico por su capacidad de impedir la síntesis de ADN. Esta es la vía principal de metabolización del alcohol.
- A través del sistema oxidativo microsomal del etanol (MEOS, por su nombre en inglés microsomal ethanol-oxidizing system) en el retículo endoplasmático, que requiere el citocromo P450 2E1 (CYP2E1), el cual oxida etanol a acetaldehído, generando ROS y provocando, por tanto, estrés oxidativo e inflamación. Esta vía no es muy relevante en situaciones normales, aunque se encuentra considerablemente activada en condiciones de consumo excesivo de alcohol, ya que la concentración de CYP2E1 está aumentada.
- A través de la catalasa de los peroxisomas. Esta es una vía minoritaria. También permite el paso de etanol a acetaldehído.



**Figura 3.** Esquema de los distintos mecanismos de metabolización del etanol en el hígado.

Finalmente, el acetaldehído pasa a acetato gracias a la aldehído deshidrogenasa (ALDH), la cual se encuentra en la mitocondria de los hepatocitos. Este acetato pasará a la sangre, donde se acabará oxidando y pasando a formarse dióxido de carbono en tejidos extrahepáticos (S.-Y. Liu, Tsai, and Hsu 2021).

Respecto a la epidemiología, la ALD es una enfermedad que se encuentra en aumento, además de representar un factor de riesgo tanto en enfermedades agudas como en enfermedades crónicas, siendo uno de los principales causantes de la cirrosis, además de ser una de las principales causas de enfermedad hepática que se debe de considerar a la hora de tener que optar por el trasplante hepático (S.-Y. Liu, Tsai, and Hsu 2021; Thursz and Lingford-Hughes 2023).

### **Mecanismos implicados en el daño en hígados con enfermedad hepática relacionada con alcoholismo**

Mientras el consumo de alcohol se produzca en bajas concentraciones, este se metabolizará por la ADH, y éste pasará a acetato a partir de la ALDH. Este acetato se puede utilizar como fuente de energía para la lipogénesis o el ciclo de Krebs. Si el consumo de alcohol es elevado, este exceso de energía puede provocar obesidad y esteatosis (Thursz and Lingford-Hughes 2023).

Si hay un exceso de alcohol, la vía de la ADH está saturada, por lo que aumenta la concentración de CYP2E1. Además, disminuyen los niveles de ALDH, provocando un aumento de la concentración de acetaldehído en el tejido, dañando a las mitocondrias celulares (Buchanan and Sinclair 2021). Por otra parte, tanto el etanol como el acetaldehído disminuyen la expresión de adiponectina, STAT3 y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, por su nombre en inglés AMP-activated protein kinase), receptor activado por proliferadores de peroxisomas  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ , por su nombre en inglés Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ) y sus dianas, provocando la peroxidación de lípidos y llevando a la acumulación de lípidos en el hígado (J. Liu 2014; Seitz et al. 2018). Adicionalmente, la actividad de CYP2E1 incrementa los niveles de ROS (Harjumäki, Pridgeon, and Ingelman-Sundberg 2021). Por otra parte, el acetaldehído, que se encuentra aumentado, también provoca la disminución de los niveles de glutatión, principal mecanismo antioxidante de las células. Estos procesos llevan a la consecución de un aumento aún más exacerbado del estrés oxidativo (Averill-Bates 2023).

Finalmente, como se ha indicado previamente, el consumo de alcohol también afecta a la barrera intestinal, facilitando el paso de sustancias nocivas del intestino a la sangre, como el LPS, el cual puede llegar al hígado y dañar los hepatocitos (Kong et al. 2019), además de promover la inflamación a partir del aumento de expresión de citoquinas proinflamatorias como el TNF $\alpha$  o la interleucina 1 (IL1) (Niederreiter and Tilg 2018). Además, este daño hepático genera la activación de las células estrelladas, que promoverán la secreción de TGF $\beta$  (Dewidar et al. 2019), el cual, está implicado en la síntesis de colágeno, que acaba llevando a la fibrosis del tejido.

### **Relación entre ALD y daño por I/R**

Entre muchos otros mecanismos, el daño por I/R está relacionado con un aumento de citoquinas proinflamatorias, el aumento de ROS y la afectación de los hepatocitos, especialmente en las mitocondrias, al desacoplar la respiración aeróbica. El efecto del alcohol afecta a todos estos procesos y, por lo tanto, provoca que el daño tras la I/R sea mucho mayor.

Por este motivo, además de su posible efecto sobre la funcionalidad del hígado en estadios donde la fibrosis está presente de forma significativa en el órgano, el consumo de alcohol es un factor de riesgo para las cirugías hepáticas. Tal es así que se ha observado que el consumo de alcohol reduce la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial (Okamura et al. 2018). Además, mientras mayor sea el consumo de alcohol del donante, menor podrá ser utilizado el injerto hepático en cuestión para el trasplante, debido al daño previamente explicado (ONT 2023).

### **Importancia clínica de la resección hepática en hígados con diabetes**

En diferentes estudios se ha indicado cómo la diabetes supone un factor de riesgo importante en procedimientos quirúrgicos, entre los que se encuentra la resección hepática (Francés et al. 2011; Le Roy et al. 2018). En el caso de la resección, la presencia de T2DM supone además un aumento del riesgo de aparición de complicaciones posteriores tras la cirugía e incluso insuficiencia hepática, pudiendo provocar la muerte del paciente. Asimismo, la presencia de T2DM está asociada con un mayor tiempo de estancia hospitalaria (Qingshan Li et al. 2017)

Pacientes con HCC y T2DM tienen un peor pronóstico comparados con los que no tienen T2DM. Esto es un problema debido a que hay estudios que muestran como la T2DM tiene una elevada prevalencia en pacientes con HCC y, a su vez, aumenta la incidencia de HCC en individuos con infecciones crónicas debidas a virus, como el de la hepatitis B o el de la hepatitis C. Además, la T2DM está asociada a la progresión de la MAFLD, la cual lleva a cirrosis y/o a HCC. Por este motivo, el seguimiento de los pacientes es un requerimiento esencial al someterlos a una hepatectomía parcial si presentan T2DM (Yang et al. 2022).

### **Mecanismos de acción implicados en modelos experimentales de resección hepática con oclusión vascular y diabetes**

A pesar de que no se han encontrado modelos experimentales de resección hepática con oclusión vascular en modelos animales de diabetes de tipo 2, atendiendo a la patogénesis de la diabetes de tipo 2 y a las observaciones en la práctica clínica, es posible inferir los posibles

riesgos que pueden sufrir hígados procedentes de individuos con diabetes y los malos pronósticos tras la cirugía.

Desde nuestro punto de vista, en primer lugar, al ser el hígado el principal encargado de mantener la homeostasis de las principales vías metabólicas (lípidos, carbohidratos y proteínas), y al estar la homeostasis afectada durante la T2DM, es de esperar que esta desregulación se encuentre aumentada. Además, esta desregulación afectará a la regeneración hepática, ya que requiere de un correcto metabolismo para poder realizarse. Por otra parte, la esteatosis asociada a la T2DM también incrementa el riesgo de sufrir efectos adversos tras la cirugía (Bujaldon et al. 2019; Elias-Miró et al. 2014). Igualmente, la hiperglicemia característica de la enfermedad, como se ha mencionado previamente, provoca un estado inflamatorio crónico, un aumento de la respuesta inmune y un aumento del estrés celular (Behrends et al. 2010), además de estar relacionada, por sí misma, con un mayor daño de los hepatocitos tras una resección hepática (Han et al. 2014). Sumando esto al propio daño de la hepatectomía parcial, se espera que haya un mayor riesgo de disfunción hepática en cirugía en modelos preclínicos de PH bajo oclusión vascular en presencia de T2DM respecto a modelos preclínicos de cirugía en la cual no se presente la enfermedad, lo cual se correlacionaría con los resultados observados en la práctica clínica. La única forma de poder establecer dianas de posible acción terapéutica que puedan ser aplicadas en la práctica clínica para mejorar los resultados postoperatorios y la calidad de vida del paciente son las investigaciones encaminadas a evaluar el por qué la presencia de T2DM es un importante factor de riesgo en la cirugía hepática de las resecciones y, además, en modelos preclínicos que mimeticen al máximo posible las condiciones clínicas.

### **Importancia clínica del trasplante hepático con donantes procedentes de muerte cerebral y con enfermedad hepática relacionada con el alcohol**

Se han realizado varios estudios sobre la ALD, una de las principales causantes de indicación para la realización del trasplante hepático (Branagan and Norvell 2024; Gitto et al. 2020; Hernández-Évole et al. 2024; Neuberger 2004). Y, en consonancia con tales observaciones, de acuerdo a la organización nacional de trasplantes (ONT), el alcoholismo es uno de los factores que se observan a la hora de extraer el injerto del donante ya que, como se ha comentado previamente, la cantidad de alcohol consumido (por los consiguientes efectos nocivos en el hígado) es relevante a la hora de poder realizar el trasplante (ONT 2023). Por otro lado, no se han realizado estudios respecto al uso de donantes de injertos hepáticos con ALD en el trasplante hepático.

Además de no haber estudios que expliquen cómo afecta la presencia de ALD en el donante en los resultados postrasplante, tampoco existen ni estudios preclínicos ni clínicos que expliquen los efectos de la muerte cerebral en presencia de ALD, siendo los donantes con la muerte cerebral los más prevalentes en el contexto de los donantes cadavéricos en el caso del TH.

Esto representa un vacío en el conocimiento de especial relevancia, considerando la prevalencia de la ALD en la sociedad y los efectos de estos procesos mencionados en la viabilidad del órgano para el TH, en los resultados postrasplante y en la calidad de vida del paciente trasplantado.

### **Mecanismos que podrían estar implicados en el trasplante hepático en presencia de ALD y MC**

El ALD aumenta el daño por I/R debido a la generación de ROS, la disminución de la respuesta oxidativa y al aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias. Esto provocaría un mayor daño al injerto hepático donante y al receptor, ya que la I/R durante la cirugía es inevitable. Por otra parte, la MC también provoca un aumento del daño en el injerto debido a la alteración hormonal, el aumento de la inflamación, estrés oxidativo e infiltración de neutrófilos en el tejido, entre muchos otros factores. Por lo tanto, la suma de estos dos procesos se espera que provoque un mayor daño en el injerto hepático, por lo que el estudio exhaustivo de los mecanismos afectados y la búsqueda de dianas terapéuticas para el establecimiento de estrategias protectoras en el TH procedente de donantes con muerte cerebral y en presencia de ALD, con la finalidad de mejorar la viabilidad del injerto hepático antes de extraerlo del donante y mantener tal protección tras su extracción del donante y ser sometido a trasplante, serían vitales para poder pensar en emplear, de forma segura, hígados de donantes procedentes de muerte cerebral y en presencia de ALD.

A continuación, se explicarán los factores en los que se ha basado la presente Tesis Doctoral, teniendo en cuenta sus acciones y su posible implicación en las condiciones quirúrgicas de TH procedentes de muerte cerebral y con presencia de ALD en los donantes y en PH con presencia de T2DM. Estamos hablando de la hormona de crecimiento (GH, por su nombre en inglés growth hormone), el VEGFA y el factor de crecimiento vascular endotelial B (VEGFB, por su nombre en inglés vascular endothelial growth factor B).

## GH, VEGFA y VEGFB en cirugía hepática

### GH

#### *Generalidades de la GH*

La GH es una hormona peptídica de 22 kDa sintetizada en la hipófisis. Actúa sobre una gran variedad de tejidos, regulando procesos relacionados con el crecimiento, a través de su unión al receptor de hormona de crecimiento (GHR). Esta activación promueve, a su vez, la señalización del factor de crecimiento insulínico (IGF1, por su nombre en inglés insulin-like growth factor 1), al estimular la síntesis y secreción de esta hormona por parte de los hepatocitos. El IGF1 es una proteína estrechamente relacionada con la GH ya que, además de encontrarse regulada por esta, es su principal mediador (De Palo et al. 2001) y comparten una gran variedad de funciones. Además, hay una importante serie de genes interdependientes involucrados en esta vía de señalización, como la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH, por su nombre en inglés growth hormone releasing hormone), que actúa como un agonista de GH, o la somatostatina, la cual es una antagonista. Además de su papel necesario en el crecimiento, la GH es esencial para la homeostasis del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, ya que tiene como diana al hígado, al tejido adiposo y al músculo, los principales reguladores del metabolismo de lípidos y carbohidratos (Donato et al. 2021; Møller and Jørgensen 2009).

En el caso del hígado, principal encargado del mantenimiento de la homeostasis, se ha estudiado ampliamente el papel de la GH y su uso (Møller and Jørgensen 2009; Moseley and Phillips 2000).

#### *Enfermedades hepáticas en las que la GH ha sido relevante clínicamente*

##### **Obesidad y MAFLD**

Entre las enfermedades hepáticas en las que se ha visto relacionada la GH, se encuentra el MAFLD y la obesidad (Tabla 1). En pacientes con estas enfermedades, se han observado niveles bajos de GH en plasma, no correlacionados con los niveles de IGF1, ya que se han encontrado concentraciones de IGF1 tanto disminuidas como elevadas en comparación a la población sana (Scacchi, Pincelli, and Cavagnini 1999; L. Xu et al. 2012). Esta relación entre la GH y la obesidad se puede explicar por su función en la lipólisis. Además, la administración de esta hormona (de diferentes formas; recombinante o como análogos, entre otras) ha resultado útil tanto en pacientes como en modelos preclínicos. Tal es así que, en adultos con obesidad, tratamientos con análogos de GH asociados, a su vez, a un incremento de IGF1, disminuyeron los porcentajes de grasa, y en MAFLD incluso se llegó a disminuir los niveles de transaminasas. Además, la GH disminuyó la inflamación hepática, la esteatosis y la fibrosis en pacientes con deficiencia de GH y con esteatohepatitis asociada al metabolismo (MASH, por su nombre en inglés metabolic

associated steatohepatitis, también llamada non-alcoholic steatohepatitis o NASH) (Nishizawa et al. 2012; Xue et al. 2022). En modelos preclínicos basados en hiperlipidemia, el tratamiento con un recombinante de GH provocó un aumento de IGF1, disminuyó la inflamación, la esteatosis macrovesicular y la fibrosis, además de disminuir la expresión de IL-1 $\beta$  (Jang et al. 2020). Por otra parte, también se observaron efectos beneficiosos tras la administración de IGF1 (Sobrevals et al. 2010). Por lo tanto, el papel de GH, junto a IGF-1, puede beneficiar en enfermedades metabólicas relacionadas con la obesidad. Sin embargo, hay resultados contradictorios respecto al papel de estas proteínas en la fibrosis, al haber diversos estudios que indican que se relacionan con una disminución de la misma (Jang et al. 2020; Nishizawa et al. 2012, 2016; Sobrevals et al. 2010) mientras que otros estudios reportan que la GH induce un aumento de la fibrosis, lo cual estaría ejerciendo, por lo tanto, efectos negativos en el hígado (Alisi et al. 2018; Chishima et al. 2017).

### **Infección viral**

En pacientes de virus causantes de hepatitis, se han observado niveles bajos de GH e IGF1 (Plöckinger et al. 2007). Además, se observó que la administración de GH mejoró la sintomatología de pacientes de hepatitis B (H.-G. Ding et al. 2005). No obstante, es necesario un estudio más profundo del papel de la GH en este tipo de patologías debido a los resultados tan limitados que existen.

### **Colangiopatías y lesiones hepáticas colestásicas**

Existen contradicciones en relación al papel de la GH en las citadas patologías. Las colangiopatías son trastornos del conducto biliar que se caracterizan por la reacción ductular y la fibrosis hepática (K. Sato et al. 2019). Mientras que algunos artículos discuten como positivo el papel de GH/IGF1 en la lesión colestásica, al disminuir los niveles de proteínas relacionadas con la fibrosis, como la actina muscular lisa  $\alpha$  ( $\alpha$ SMA, por su nombre en inglés  $\alpha$  smooth muscle actin) (K. Wang et al. 2016), otros indican que pueden promover la proliferación de colangiocitos y contribuir a la fibrosis hepática (Alvaro et al. 2005).

### **Regeneración hepática y tumores**

Como la GH está implicada en la proliferación de los hepatocitos, es necesaria una regulación de la GH con el fin de evitar la hiperplasia y la hipertrofia del tejido, pudiendo llegar a provocar, en última instancia, cáncer. En un estudio, se observó que un aumento en la expresión de GH incrementó la inflamación hepática y promovió el desarrollo de HCC (Piazza et al. 2020). Además, en ensayos clínicos de pacientes con HCC, se ha observado que niveles elevados de GH

están asociados a cirrosis y a un incremento de los niveles de  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), el cual es un marcador de HCC y, por consiguiente, en una disminución de la supervivencia (Kaseb et al. 2022). No obstante, de la misma forma que si no hay un control de los niveles de GH se incrementa el riesgo de padecer HCC, también se ha visto que la vía de señalización de la GH puede ser positiva en la regeneración hepática, debido a su papel disminuyendo el exceso de respuesta inflamatoria (Ishikawa et al. 2021) y la expresión de HGF, un importante factor que promueve la regeneración hepática y la recuperación del órgano (Ekberg et al. 1992). Además, se ha visto que sus acciones son positivas en modelos de trasplante hepático (Z. Wang et al. 2011). Por lo tanto, la GH puede ser beneficiosa en determinados contextos relacionados con la proliferación hepática, aunque su regulación es de gran dificultad y de vital importancia.

#### *Cirugía hepática. Lesión por isquemia-reperfusión y regeneración*

Varios estudios preclínicos han demostrado el papel de la GH en la regeneración hepática tras la PH. Como se ha mencionado previamente, la administración de GH es capaz de disminuir la respuesta inflamatoria. Además, se ha visto que disminuye la respuesta inmune tras la hepatectomía, la cual se ha demostrado que genera apoptosis en el tejido hepático (Ishikawa et al. 2021). Por otro lado, el tratamiento de GH puede incrementar la expresión de HGF y la síntesis de ADN tras la PH, estimulando, por lo tanto, la regeneración y la recuperación de la función hepática (Asakawa et al. 1989; Ekberg et al. 1992). En consonancia a estos estudios, se realizó un modelo de animal transgénico deficiente en GH, en el que se observó una disminución de la LR, reforzando la idea de su participación en la LR tras la PH (Pennisi et al. 2004).

Se ha investigado el papel de la GH en procesos de I/R de varios órganos a nivel clínico y preclínico. En modelos animales de isquemia intestinal y renal, se observó que los efectos beneficiosos resultantes de la administración de GH se debían, en gran parte, a la activación de IGF1 (Haglund et al. 1998; Matejka and Bengtsson 1998). Además, varios estudios clínicos señalaron que la administración de GH mejoró el resultado postoperatorio tras la isquemia cerebral (Song et al. 2012; Szarka et al. 2021). Este efecto sobre la isquemia cerebral también fue observado en estudios preclínicos, donde se observó que el efecto beneficioso de la administración de GH no solamente se debía a través de su actividad sobre IGF1, sino que también se ejerció, a través del aumento de Pi3k/Akt, una disminución de mediadores proinflamatorios (como TNF $\alpha$  o IL1 $\beta$ ), además de un aumento de la expresión de otros factores neurotróficos o angiogénicos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por su nombre en inglés brain derived neurotrophic factor) o el VEGFA (Alba-Betancourt et al. 2013; Baltazar-Lara et al. 2022). Estos resultados siguen la línea de los resultados obtenidos en uno de

los modelo de trasplante, en el cual la GH participaba en la proliferación de los colangiocitos y la angiogénesis (Z. Wang et al. 2011).

Teniendo en cuenta tales observaciones, podía ser esperable que la administración de GH también ejerciera efectos beneficiosos en el trasplante hepático procedentes de donantes con muerte cerebral. No obstante, este no fue el caso, ya que en un estudio preclínico realizado por nuestro grupo se observó que la administración de GH no mejoró la lesión hepática, sino que, incluso, la empeoró, ya que provocó el aumento del estrés oxidativo y de la inflamación en injertos hepáticos esteatósicos y no esteatósicos. Y tales efectos perjudiciales de la GH se ejercieron mediante una reducción en la actividad de la vía de Pi3k-Akt, una de las principales vías de señalización que promueven la supervivencia y proliferación celular (Álvarez-Mercado et al. 2019). En consecuencia, teniendo en cuenta todos los resultados mencionados, se hace constar la dualidad entre el efecto beneficioso o perjudicial de la hormona en función de la condiciones patológicas y quirúrgicas.

Se desconoce el papel y mecanismos de acción de la GH en isquemia-reperfusión y en presencia de enfermedad hepática relacionada con el alcohol. Lo único que hay reportado es en relación con la GH y el alcohol. Se ha descrito en un estudio clínico una correlación entre los niveles de GH en sangre y una disminución de la función hepática en pacientes alcohólicos, asociado también a una disminución de IGF1 (Santolaria et al. 1995). No obstante, en otro estudio realizado recientemente en el que se administró GH a pacientes con enfermedad hepática crónica, entre los que se encontraban pacientes con cirrosis debida a alcohol, no se pudo determinar si tenía un papel beneficioso o negativo. Esto es así porque su administración aumentó la capacidad anabólica y aumentó la oxidación lipídica, pero provocó también un aumento de resistencia a insulina y ascitis. Además, tampoco se encontró un efecto del tratamiento en la función hepatocelular (Wallace et al. 2002).

**Tabla 1.** Revisión bibliográfica de los efectos de la GH en: enfermedades y cirugías hepáticas, isquemia y alcoholismo.

| Factor estudiado              | Resultados                                                                                                                                   | Referencias                                                |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| GH                            | En pacientes obesos y con MAFLD: ↓GH en plasma                                                                                               | (Scacchi, Pincelli, and Cavagnini 1999)(L. Xu et al. 2012) |
| GH                            | En pacientes con MASH y deficiencia de GH<br>Administración de GH → ↓transaminasas, esteatosis y fibrosis hepática                           | (Nishizawa et al. 2012)                                    |
| GH recombinante humana (rhGH) | En pacientes obesidad y MAFLD:<br>Administración de rhGH → ↑IGF1, ↓transaminasas e inflamación                                               | (Xue et al. 2022)                                          |
| rhGH                          | En un modelo preclínico de hiperlipidemia:<br>Administración de rhGH → ↑IGF1, ↓esteatosis, inflamación (IL-1β)                               | (Jang et al. 2020)                                         |
| GH                            | Estudio observacional:<br>↑GH ↓IGF1 → Progresión de MAFLD                                                                                    | (Chishima et al. 2017)                                     |
| GH                            | En pacientes con infección crónica de virus de la hepatitis C: ↓GH, IGF1                                                                     | (Plöckinger et al. 2007)                                   |
| rhGH                          | En pacientes con hepatitis B crónica:<br>Administración de rhGH+lactulosa → ↑IGF1, albúmina, ↓disfunción hepática                            | (H.-G. Ding et al. 2005)                                   |
| GH                            | En modelo preclínico de lesión colestática: GH → ↓apoptosis, fibrosis                                                                        | (K. Wang et al. 2016)                                      |
| GH                            | En colangiocitos: GH → ↑IGF1 → ↑Proliferación colangiocitos                                                                                  | (Alvaro et al. 2005)                                       |
| Sobreexpresión de GH          | En modelo preclínico con sobreexpresión de GH:<br>↑ GH → ↑hipertrofia e hiperplasia de hepatocitos, inflamación crónica, HCC                 | (Piazza et al. 2020)                                       |
| GH                            | ↑GH en pacientes con HCC → ↑fibrosis, AFP, ↓supervivencia                                                                                    | (Kaseb et al. 2022)                                        |
| Deficiencia de GH             | En modelos preclínicos deficientes de GH<br>PH → ↑inflamación, apoptosis, ↓supervivencia,                                                    | (Ishikawa et al. 2021)                                     |
| GH                            | Tras PH en modelos preclínicos sin hipófisis:<br>Administración de GH → ↑HGF, síntesis de ADN                                                | (Ekberg et al. 1992)                                       |
| rhGH                          | En TH+ ligación arteria hepática en modelos preclínicos:<br>Administración de rhGH → ↓ apoptosis colangiocitos, ↑proliferación, VEGF, VEGFR2 | (Z. Wang et al. 2011)                                      |

**Tabla 1** (continuación). Revisión bibliográfica de los efectos de la GH en: enfermedades y cirugías hepáticas, isquemia y alcoholismo.

| Factor estudiado                | Resultados                                                                                                                                                                                  | Referencias                   |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| hGH                             | En modelos preclínicos de PH:<br>hGH→↑IGF1, albúmina, mitosis                                                                                                                               | (Asakawa et al. 1989)         |
| Deficiencia de GH               | En modelo preclínico de PH:<br>↓GH→↓proliferación, supervivencia                                                                                                                            | (Pennisi et al. 2004)         |
| GH                              | En modelo preclínico de isquemia intestinal:<br>Administración de GH→↑IGF1, ↓catabolismo tras I/R intestinal                                                                                | (Haglund et al. 1998)         |
| GH                              | En modelo preclínico de isquemia aguda renal:<br>Administración de GH→Ligero ↑IGF1, peso, supervivencia                                                                                     | (Matejka and Bengtsson 1998)  |
| GH                              | En pacientes tras daño cerebral traumático:<br>Administración de GH→↑función cerebral                                                                                                       | (Szarka et al. 2021)          |
| rhGH                            | En pacientes tras un accidente cerebrovascular:<br>Administración de rhGH→↑Índice de Barthel Modificado Coreano (IBM-C) (nivel de independencia para realizar actividades diarias), ↓fatiga | (Song et al. 2012)            |
| GH recombinante de pollo (rcGH) | En cultivos celulares de neuronas de cerebelo de pollo en condiciones de hipoxia e hipoglicemia:<br>Administración de rcGH→↑Pi3k, Akt, ↓caspasa 3                                           | (Alba-Betancourt et al. 2013) |
| rcGH                            | En modelo preclínico de isquemia en cerebelo:<br>Administración de rcGH→ ↑IGF1, VEGFA, BDNF, ↓TNFα, IL1β                                                                                    | (Baltazar-Lara et al. 2022)   |
| GH                              | Modelo preclínico de MC+TH:<br>Administración de GH→↑Inflamación, estrés oxidativo, ↓Pi3k/Akt, supervivencia                                                                                | (Álvarez-Mercado et al. 2019) |
| GH                              | En pacientes cirróticos alcohólicos: ↑GH, ↓IGF1, función hepática                                                                                                                           | (Santolaria et al. 1995)      |
| rhGH                            | En pacientes con enfermedad hepática crónica:<br>Administración de rhGH→↑IGF1, oxidación lipídica, tasa metabólica, resistencia a insulina, edema, ascitis                                  | (Wallace et al. 2002)         |

## VEGFA

### *Generalidades*

El VEGFA es una glicoproteína de 40 kDa de la familia de los factores de crecimiento vasculares endoteliales (VEGF, por su nombre en inglés Vascular Endothelial Growth Factor) (Lal, Puri, and Rodrigues 2018; Melincovici et al. 2018). La función principal de esta proteína es la angiogénesis, siendo el principal factor de crecimiento encargado de la misma (Melincovici et al. 2018). Estos efectos relacionados con la angiogénesis implican la proliferación celular de células endoteliales, regulación de la apoptosis o el reclutamiento de células inflamatorias. Por su papel en la angiogénesis, se ha descrito su papel en diversos tejidos, como el tejido adiposo (Zafar et al. 2017), el páncreas (Staels et al. 2019), el hígado (Bujaldon et al. 2019) o el intestino (F. Zhang et al. 2018). Además de su expresión en células endoteliales, el VEGFA se encuentra en otros tipos celulares, como los miofibroblastos (Chintalgattu, Nair, and Katwa 2003), los adipocitos o los hepatocitos (Bujaldon et al. 2019). Se han observado 9 isoformas, siendo la principal la isoforma VEGF165. Puede unirse tanto al receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 1 (VEGFR1, por su nombre en inglés vascular endothelial growth factor 1, también llamado fms related tyrosine kinase 1 o flt1) como al VEGFR2, con una afinidad mayor por VEGFR1. Sin embargo, en condiciones normales, el efecto de VEGFA se explica a través de su unión a VEGFR2, actuando VEGFR1 como una especie de regulador negativo ya que, a través de este receptor, VEGFA no produce la suficiente activación de la vía de señalización del receptor (Lal, Puri, and Rodrigues 2018). Al unirse a VEGFR2, el VEGFA actúa sobre diversos procesos, entre los que se encuentran la proliferación, la supervivencia o la vasodilatación, a través de la activación de diversas proteínas, entre las que destacan Pi3k, la fosfolipasa C gamma (PLC $\gamma$ , por su nombre en inglés phospholipase-C gamma) o Id1 (Maycas et al. 2015; Wu et al. 2023). A su vez, el VEGFA está regulado por una gran variedad de procesos y factores de crecimiento, como la inflamación (Carmeliet 2005), la hipoxia (Pugh and Ratcliffe 2003), el estrés oxidativo (Ushio-Fukai and Nakamura 2008) o TGF $\beta$  (Ferrara and Kerbel 2005). El papel de VEGFA se ha observado en una multitud de órganos, como en el tejido adiposo (Jin et al. 2018), en el corazón, promoviendo la angiogénesis junto al VEGFB en infarto de miocardio (Lv et al. 2018) o en el cerebro, donde se ha visto un efecto neuroprotector tras episodios de isquemia aguda (Mărgăritescu, Pirici, and Mărgăritescu 2011).

Finalmente, es de especial relevancia su papel en la diabetes (Tabla 2), ya que ejerce efectos protectores en procesos asociados, como la obesidad y la resistencia a insulina en el tejido adiposo (Elias et al. 2012) o problemas cardiovasculares (Dariushnejad et al. 2023), además de estar involucrado en la vascularización del páncreas y en la proliferación de las células beta

responsables, como se ha indicado previamente, de la síntesis de insulina (Brissova et al. 2006; Staels et al. 2019). Sin embargo, varios estudios también han sugerido su papel en varias complicaciones derivadas de la enfermedad, como en el edema macular diabético (Urias et al. 2017; Wells et al. 2016) o la retinopatía diabética (L. Liu, Gao, and Yao 2024).

#### *Enfermedades hepáticas en las que VEGFA ha sido relevante clínicamente*

Debido a su papel central en procesos angiogénicos, el VEGFA está relacionado con diferentes enfermedades relacionadas con alteraciones en la vascularización de los tejidos y su implicación se resume a continuación:

#### **Hepatitis viral crónica**

En una enfermedad hepática crónica como es el caso de la hepatitis viral crónica, el órgano sufre un estado inflamatorio y fibrogénico. En las hepatitis virales crónicas, la angiogénesis patológica tiene un efecto dual, ya que puede contribuir a la reparación del tejido y a la regeneración hepática tras el daño pero, a su vez, puede estar relacionado a un mayor riesgo de HCC y progresión de la fibrosis (Fernández et al. 2009; Medina et al. 2004).

#### **MAFLD y T2DM**

El MAFLD es la enfermedad metabólica crónica del hígado más prevalente en la actualidad, y se espera que haya un aumento en los próximos años. Está relacionada estrechamente con la T2DM, ya que, entre otros, generalmente van acompañadas de obesidad y resistencia a insulina. En los estados iniciales de la enfermedad, se caracteriza por la acumulación de lípidos en los hepatocitos, llevando a la MAFLD, el cual es reversible. Posteriormente, esta enfermedad puede avanzar a la MASH, en la cual también hay inflamación. Posteriormente, puede llegar a aparecer fibrosis, llevando finalmente a cirrosis o HCC (Marušić et al. 2021). Durante la progresión de la enfermedad, la angiogénesis ocupa un papel importante, entre otros motivos, debido a su relación con la inflamación. Por este motivo, VEGFA está relacionado con la progresión del MAFLD (Coulon et al. 2011). Además, tal y como se ha mencionado anteriormente, es de especial relevancia el papel del VEGFA en diabetes y en las complicaciones derivadas de la citada patología. El VEGFA ejerce efectos protectores en la obesidad y la resistencia a insulina en el tejido adiposo (Elias et al. 2012). Y se conoce que tanto la obesidad como el tejido adiposo son claves y determinan los resultados postoperatorios tras la cirugía de las resecciones hepáticas.

## Cirrosis hepática

En enfermedades hepáticas crónicas como la cirrosis, hay un continuo estado inflamatorio y fibrogénico. Esto lleva a condiciones de hipoxia, provocando el aumento de factores angiogénicos, como el VEGFA. En estas condiciones, la angiogénesis patológica de los hígados cirróticos no ayuda a la mejora del estado del órgano, ya que contribuye a la progresión de la fibrosis, llevando a insuficiencia hepática y/o hepatocarcinomas (Corpechot et al. 2002; Coulon et al. 2011).

### *Cirugía hepática. Lesión por isquemia-reperfusión y regeneración*

Debido al papel del VEGFA en la angiogénesis, se han reportado varios estudios relacionados entre el factor de crecimiento y el cáncer. En este caso, se ha relacionado tanto con la metástasis como con la aparición de HCC (Tamagawa et al. 2008). En el crecimiento de tumores, es necesaria la angiogénesis, debido a que las células tumorales que se forman requieren el aporte de nutrientes y de oxígeno. Por este motivo, se ha asociado el VEGFA con la progresión del tumor en pacientes de cáncer (Poon et al. 2001; Poon, Fan, and Wong 2001). No obstante, la angiogénesis también es imprescindible para la regeneración hepática y, especialmente, el VEGFA es un factor necesario para la regeneración hepática (X. Wang et al. 2019), siendo este un potenciador de la misma. Al ser procesos en los que se requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos, la regulación del crecimiento tumoral o de la regeneración hepática tienen algunos mediadores claves similares, entre los que se encuentra el VEGFA (Tamagawa et al. 2008). Además, se ha visto como el VEGFA puede ayudar a la proliferación del hígado o la disminución de la muerte celular en el tejido hepático tras la PH bajo oclusión vascular (Bujaldon et al. 2019). En este estudio preclínico se observó que la administración del VEGFA en hígados sanos disminuía el daño hepático y el estrés oxidativo y aumentaba la regeneración a través de la vía de  $Id1$ -Wnt2, derivando en un aumento de la supervivencia tras la cirugía hepática. No obstante, este efecto beneficioso no se observó en hígados esteatósicos, debido a un aumento de los niveles de sFlt1 (la forma soluble de Flt1), el cual, como se ha indicado previamente, se une a VEGFA, impidiendo que llegue al hígado y realice su función a través del VEGFR2. Este hecho no solo impedía que VEGFA ejerciera su función en el hígado, sino que aumentaba el daño y el estrés oxidativo aún más que lo que hacía la PH bajo oclusión vascular por sí misma, disminuyendo drásticamente la regeneración y la supervivencia. No obstante, al administrar de forma conjunta un inhibidor de sFlt1 junto al VEGFA en ratas con hígado esteatósico, se observó una protección del hígado esteatósico y los efectos beneficiosos del VEGFA, que se ejercieron a través de la vía de señalización  $Pi3k$ -Akt. Esto fue así porque, al administrar un inhibidor de sFlt1, el VEGFA no fue secuestrado por sFlt1 y, por consiguiente, el VEGFA llegó al hígado esteatósico

para protegerlo frente a los efectos nocivos sobre el daño y el fallo en la regeneración hepática asociados a la PH bajo oclusión vascular (Bujaldon et al. 2019).

En el trasplante hepático, en un estudio se administró VEGFA, combinado con células precursoras endoteliales derivadas de la médula ósea, a un modelo ortotópico de TH con la finalidad de disminuir el daño por I/R asociado a esta cirugía. Se observó una disminución de la muerte celular (tanto apoptosis como necrosis) y un aumento de la angiogénesis y factores proliferativos, como el HGF (Cao et al. 2017). Siguiendo en la misma línea, en otro estudio preclínico, se describió cómo el papel de VEGFA para trasplantes hepáticos provenientes de donantes de muerte cerebral era beneficioso, a través de su regulación de la vía de Nrg1-Pak1 (Micó-Carnero et al. 2022).

Al ser el VEGFA, como se ha comentado, un factor implicado en la angiogénesis y estar regulado, entre otros, por el HIF1 $\alpha$  (factor asociado a la hipoxia), la isquemia provoca un aumento del VEGFA, con la finalidad de mejorar la reperusión del tejido isquémico, permitiendo que el oxígeno llegue antes al tejido. Estas observaciones se han reportado en estudios de procesos isquémicos en varios órganos, como el cerebro (Kaya et al. 2005; Mărgăritescu, Pirici, and Mărgăritescu 2011; White and Bix 2023) o el corazón (Oduk et al. 2018). Además, en modelos animales de I/R tanto en el caso de hígados esteatósicos como no esteatósicos, se ha demostrado un papel beneficioso de VEGFA en la disminución del daño por I/R (X. Wang et al. 2020)

#### *Papel y mecanismos del VEGFA en isquemia-reperusión con enfermedad hepática relacionada al alcohol*

No existen estudios que describan el papel y mecanismos de acción del VEGFA en isquemia-reperusión y en presencia de la enfermedad hepática relacionada con el alcohol. A continuación, se explica lo reportado en la bibliografía que está basado principalmente en la relación entre el VEGFA y el alcohol.

Se ha observado un aumento de la concentración de VEGFA tanto en la clínica como en modelos animales de ALD debido, entre otros, al estrés oxidativo y a la hipoxia (ambos factores regulan la expresión de VEGFA), relacionadas con el avance de la patología. En uno estudio preclínico, donde se utilizaba un modelo de daño agudo debido a alcohol que se realizó en pez cebra (Changwen Zhang, Ellis, and Yin 2016), se estableció que la inhibición de la señalización de VEGFA mejoró la patología, ya que el VEGFA estaba implicado en la interacción entre las HSC (células estrelladas hepáticas) y los hepatocitos, dando lugar a esteatosis, entre otros efectos adversos. No obstante, no se observó efecto sobre la fibrosis ocasionada por el consumo de

etanol y la posterior activación de las HSCs. En otro estudio en ratas con ALD, se observaron niveles de VEGFA aumentados con respecto a ratas control, debido a la presencia de estrés oxidativo e hipoxia. Asimismo, este aumento en los niveles de VEGFA se relacionó con un aumento en la inflamación y la esteatosis hepática (R. Luo et al. 2021). También se han observado niveles elevados de VEGFA en pacientes crónicos con ALD, pero no se asociaron a un mayor daño ni a otros posibles efectos adversos asociados, como ascitis o encefalopatía hepática (HE) (Kasztelan-Szczerbinska et al. 2014).

**Tabla 2.** Revisión bibliográfica de los efectos del VEGFA en: enfermedades y cirugías hepáticas, diabetes, isquemia y alcoholismo.

| Factor estudiado        | Resultado                                                                                                                                                                                                                    | Referencia                  |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| VEGFA, VEGFB            | En un modelo preclínico de infarto de miocardio:<br>Estimulación del nervio vago → ↑VEGFA, VEGFB → ↑angiogénesis, reparación del corazón →<br>↑función coronaria                                                             | (Lv et al. 2018)            |
| VEGFA                   | En modelo preclínico de T2DM:<br>En corazón:<br>Ejercicio → ↑VEGFA, VEGFR2 → ↑NO, pAkt → ↑angiogénesis cardiaca, ↑insulina                                                                                                   | (Dariushnejad et al. 2023)  |
| Deficiencia de VEGFA    | En un modelo preclínico con deficiencia de VEGFA en células β:<br>↓VEGFA → ↓densidad y tamaño islotes, ↓secreción de insulina                                                                                                | (Brissova et al. 2006)      |
| Anti-VEGFA              | En estudio clínico sobre edema macular diabético:<br>Anti-VEGFA → ↑agudeza visual                                                                                                                                            | (Wells et al. 2016)         |
| VEGFA                   | En células endoteliales microvasculares humanas: Transtiretina(TTR) → ↓VEGFA, Pi3k, p-Akt → ↓proliferación, angiogénesis, ↑apoptosis → ↓retinopatía diabética (RD)<br>En modelo preclínico de RD:<br>TTR → ↓progresión de RD | (L. Liu, Gao, and Yao 2024) |
| Sobreexpresión de VEGFA | En ratones transgénicos en los con ↑VEGFA en el tejido adiposo: ↑sensibilidad a insulina, termogénesis, ↓inflamación                                                                                                         | (Elias et al. 2012)         |
| VEGFA                   | En modelo preclínico de cirrosis: fibrosis ↔ VEGFA                                                                                                                                                                           | (Corpechot et al. 2002)     |
| VEGFA                   | En un modelo preclínico de I/R (70%) + metástasis de cáncer de colon:<br>I/R → ↑VEGFA → ↑metástasis                                                                                                                          | (Tamagawa et al. 2008)      |

**Tabla 2** (continuación). Revisión bibliográfica de los efectos del VEGFA en: enfermedades y cirugías hepáticas, diabetes, isquemia y alcoholismo.

| Factor estudiado | Resultado                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Referencia                                    |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| VEGFA            | En pacientes sometidos a PH de HCC: VEGFA↔metástasis, estadio avanzado de HCC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | (Poon et al. 2001)                            |
| VEGFA            | En modelo preclínico de PH:<br>VEGFA↔LR, ↓daño                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | (X. Wang et al. 2019)                         |
| VEGFA            | En modelo preclínico de PH+I/R:<br>Administración de VEGFA en animales sanos→↑Id1/Wnt2→↑LR, supervivencia, ↓estrés oxidativo, infiltración de neutrófilos, transaminasas<br>En animales obesos: VEGFA→↑estrés oxidativo, infiltración de neutrófilos, transaminasas, LR, supervivencia debido a ↑sFLT1<br>En animales obesos: VEGFA+ anti-sFLT1→↑Pi3k/Akt→↑LR, supervivencia, ↓estrés oxidativo, infiltración de neutrófilos, transaminasas | (Bujaldon et al. 2019)                        |
| VEGFA            | En modelo preclínico de TH:<br>Administración de VEGFA+ células precursoras endoteliales→↓apoptosis, necrosis, ↑angiogénesis, HGF                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | (Cao et al. 2017)                             |
| VEGFA            | En modelo preclínico de MC+TH:<br>En animales sanos: NRG1→PAK1→VEGFA<br>anti-NRG1→↓NRG1→↓PAK1→↓VEGFA→↑daño hepático, inflamación, ↓LR                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | (Micó-Carnero et al. 2022)                    |
| VEGFA            | En cerebro de pacientes tras un accidente cerebrovascular isquémico:<br>VEGFA↔protección neuronal y glial                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | (Mărgăritescu, Pirici, and Mărgăritescu 2011) |

**Tabla 2** (continuación). Revisión bibliográfica de los efectos del VEGFA en: enfermedades y cirugías hepáticas, diabetes, isquemia y alcoholismo.

| Factor estudiado  | Resultado                                                                                                                                   | Referencia                            |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| VEGFA             | En modelo preclínico de isquemia cerebral:<br>Administración de VEGFA → ↑p-Akt, ↓apoptosis                                                  | (White and Bix 2023)                  |
| VEGFA             | En modelo preclínico de infarto de miocardio:<br>Administración de nanopartículas con VEGF → ↑ recuperación tras infarto                    | (Oduk et al. 2018)                    |
| VEGFA             | En modelo preclínico de I/R:<br>Administración de anti-metaloproteasa de matriz-9<br>(MMP9) → ↓MMP9 → ↑VEGFA → ↓necrosis                    | (X. Wang et al. 2020)                 |
| Ligandos de VEGFA | En modelo preclínico de daño hepático agudo por alcohol:<br>Administración de Anti-VEGFR1/VEGFR2 → ↓proliferación HSC, fibrosis, esteatosis | (Changwen Zhang, Ellis, and Yin 2016) |
| VEGFA             | En modelo preclínico de ALD:<br>Ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de VEGFA ↔ ALD, esteatosis, inflamación                                 | (R. Luo et al. 2021)                  |
| VEGFA             | En pacientes con ALD:<br>VEGFA ↔ ALD                                                                                                        | (Kasztelan-Szczerbinska et al. 2014)  |

## VEGFB

### *Generalidades*

El VEGFB es una proteína de 22 kDa. Forma parte de la familia de los VEGF. A pesar de ser de la misma familia que el VEGFA, no está involucrado de forma directa en la angiogénesis, aunque está relacionado con el mantenimiento de la vasculatura. Además, se ha observado su papel en el metabolismo, ya que está relacionado con el transporte de ácidos grasos y la protección de diversos órganos ante el estrés celular, debido a sus propiedades antioxidantes (R. Chen et al. 2019; Lal, Puri, and Rodrigues 2018). Presenta dos isoformas, siendo la más común VEGFB167. Al unirse a su receptor, el VEGFR1, compartido con VEGFA, activa su cascada de señalización, a través de Pi3k/Akt, la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (Mapk/Erk, por su nombre en inglés mitogen-activated protein kinases) o PLCγ, entre otros (Koch and Claesson-Welsh 2012; Weddell, Chen, and Imoukhuede 2018). Además, a través de su unión a VEGFR1, desplaza a VEGFA, aumentando su unión a VEGFR2, provocando, indirectamente, un mayor efecto de VEGFA (Lal, Puri, and Rodrigues 2018). El papel de VEGFB se ha observado en una multitud de tipos celulares, como en endotelio (Zafar et al. 2017) o los mioblastos (Ling et al. 2021). Además, se ha visto un efecto del factor de crecimiento en condiciones patológicas de diversos órganos, como en cerebro (Ishrat et al. 2018), tejido adiposo (Jin et al. 2018) o corazón (Kivelä et al. 2014; Koch and Claesson-Welsh 2012; Lv et al. 2018; Shen et al. 2018)

De la misma forma que en el caso de VEGFA, el papel de VEGFB ha sido un objeto de estudio recurrente en diabetes, tanto en la clínica como en la preclínica (Tabla 3). Esto se debe a que, mientras en varios estudios se destaca su papel protector y, por lo tanto, una mejora de la condición, otros estudios sugieren que su expresión va acompañada de un incremento de complicaciones asociadas a la enfermedad (Carmeliet, Wong, and De Bock 2012; Zafar et al. 2017). Por ejemplo, en un estudio en ratones en los que se hacía un *knockdown* de VEGFB, se mejoraba el metabolismo lipídico y la resistencia a insulina (X. Luo et al. 2022). Otro resultado similar se observó tras la delección de VEGFB en células beta pancreáticas, aumentando, a su vez, la secreción de insulina (Ning et al. 2020). Además, otros estudios indican sus efectos negativos basados en el transporte de lípidos, promoviendo su acumulación y la lipotoxicidad (Zafar et al. 2017). Finalmente, en otro estudio en ratas con dieta alta en grasas (HFD, por su nombre en inglés high fat diet) se observó que su inhibición mejoró la sensibilidad a insulina (Hagberg et al. 2012). Además, se ha evidenciado la relación entre VEGFB y la enfermedad de riñón diabética (Falkevall et al. 2017). Por el contrario, se ha observado que el VEGFB tiene efectos protectores ya que mejora la intolerancia a glucosa y el metabolismo lipídico (Zafar et al. 2017). Además,

una reducción en los niveles de VEGFB en procesos de hiperglucemia prolongada, como ocurre con la diabetes, está asociada a una mayor mortalidad celular en tejido de miocardio (Lal et al. 2017).

#### *Enfermedades hepáticas en las que VEGFB ha sido relevante clínicamente*

Debido a su papel en el transporte de lípidos, además de actuar a través de vías de señalización relacionadas con la supervivencia y proliferación celular, especialmente en el endotelio, se ha visto su implicación en diversas enfermedades hepáticas. Además, por su unión a VEGFR1, lo cual provoca un aumento de la actividad de VEGFA, también se encuentra relacionada de forma indirecta en la actividad de VEGFA. De cualquier forma, se destaca su participación en:

#### **MAFLD y T2DM**

Como se ha mencionado previamente, el VEGFB está relacionado con el transporte de lípidos y una de sus dianas de acción es el tejido adiposo. Mientras que se ha reportado que su inhibición en varios modelos preclínicos de MAFLD disminuyó la esteatosis y la inflamación y resistencia del tejido adiposo a la insulina (Falkevall et al. 2023; X. Luo et al. 2022; Ning et al. 2020), otro estudio indicó que la actividad de VEGFB a través de VEGFR1 mejoró la vascularización, la señalización de la vía de la insulina y la función general del tejido adiposo (Robciuc et al. 2016). En línea con estudios que indican un papel beneficioso del VEGFB, por ejemplo, mejorando la intolerancia a glucosa y el metabolismo lipídico (Zafar et al. 2017), se ha observado que la reducción de VEGFB está asociada a una disminución del AMPK, provocando un aumento de la resistencia a insulina y la disminución de la oxidación de ácidos grasos, empeorando la patología (R. Li et al. 2022) mientras que, tras ser administrado, el VEGFB participó en el aumento de AMPK y la oxidación lipídica (Hu et al. 2021). Debido a esta disparidad de resultados, no se ha determinado de forma clara si el papel de VEGFB es positivo o negativo para la MAFLD ni para la T2DM.

#### **Fibrosis**

Entre otros mecanismos, la participación del VEGFB en la fibrosis se puede deber a la unión al receptor VEGFR1, dando lugar a un aumento de la biodisponibilidad de VEGFA que, como se ha indicado previamente, puede estar asociado a la progresión de la fibrosis.

#### *Cirugía hepática. Lesión por isquemia-reperfusión y regeneración*

Además de que el aumento de VEGFB está asociado a una mayor actividad de VEGFA, su actividad sobre la supervivencia de diversos tipos celulares puede estar asociada a procesos tumorales (Kanda et al. 2008). No obstante, teniendo en cuenta su actividad sobre la

supervivencia del endotelio, imprescindible en la regeneración hepática, además de su papel como antioxidante, podría ser beneficioso para la misma (R. Chen et al. 2019).

No se han encontrado estudios que relacionen VEGFB con muerte cerebral y su posible relación con el procedimiento de I/R asociado tanto a las resecciones hepáticas como al trasplante. Y de la misma forma, no existen estudios concretos que definan la relación entre VEGFB y ALD. No obstante, se ha observado que VEGFB puede ejercer efectos protectores en patologías causadas por la isquemia. En la presente tesis presentamos su papel en resecciones hepáticas bajo oclusión vascular y en presencia de diabetes y describimos, además, sus efectos en el trasplante hepático con injertos procedentes de donantes con muerte cerebral y en presencia de ALD.

**Tabla 3.** Revisión bibliográfica de los efectos del VEGFB en: enfermedades y cirugías hepáticas, diabetes, isquemia y alcoholismo.

| Factor estudiado                | Resultado                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Referencia                          |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| VEGFA, VEGFB                    | En un modelo preclínico de infarto de miocardio:<br>Estimulación del nervio vago → ↑ VEGFA, VEGFB → ↑ angiogénesis, reparación del corazón → ↑ función coronaria                                                                                                                                                                                     | (Lv et al. 2018)                    |
| Anti-VEGFB                      | En un modelo preclínico de diabetes:<br>Administración de anti-VEGFB → ↓ captación de lípido, ↑ captación de glucosa en músculo → ↑ sensibilidad a insulina, ↓ muerte de células β pancreáticas                                                                                                                                                      | (Carmeliet, Wong, and De Bock 2012) |
| Deficiencia en VEGFB            | En un modelo preclínico con deficiencia de VEGFB:<br>↓ VEGFB → ↓ VEGFR1, ↑ VEGFR2, VEGFA, ↑ insulina, metabolismo lípidos                                                                                                                                                                                                                            | (X. Luo et al. 2022)                |
| Deficiencia de VEGFB            | En un modelo preclínico con deficiencia de VEGFB en células β pancreáticas: ↑ secreción insulina                                                                                                                                                                                                                                                     | (Ning et al. 2020)                  |
| Deficiencia de VEGFB/anti-VEGFB | Varios modelos preclínicos:<br>Deleción de VEGFB en ratones db/db:<br>↓ VEGFB → ↓ lípido ectópico, ↑ absorción glucosa muscular<br>En ratones db/db:<br>Administración de anti-VEGFB → ↑ función células β, ↓ dislipidemia<br>En ratas con HFD:<br>Administración de anti-VEGFB → ↑ sensibilidad a insulina, ↑ absorción glucosa muscular y cardiaca | (Hagberg et al. 2012)               |
| Anti-VEGFB                      | En modelo preclínico y en la clínica:<br>VEGFB ↔ enfermedad renal diabética (ERD)<br>En modelo preclínico de ERD:<br>Administración de anti-VEGFB → ↑ sensibilidad insulina, ↓ disfunción renal                                                                                                                                                      | (Falkevall et al. 2017)             |

**Tabla 3** (continuación). Revisión bibliográfica de los efectos del VEGFB en: enfermedades y cirugías hepáticas, diabetes, isquemia y alcoholismo.

| Factor estudiado        | Resultado                                                                                                                                                                                             | Referencia              |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| VEGFB                   | En modelo preclínico de diabetes:<br>En cardiomiocitos que provienen de ratas diabéticas:<br>↑glucosa→↑VEGFB→↑supervivencia cardiomiocitos<br>Hiperglicemia crónica→ ↓VEGFB, ↑VEGFR1→↑ muerte celular | (Lal et al. 2017)       |
| Anti-VEGFB              | En modelo preclínico diabético:<br>Anti-VEGFB→↓VEGFB→↓esteatosis hepática, lipólisis en tejido adiposo, resistencia a insulina                                                                        | (Falkevall et al. 2023) |
| Sobreexpresión de VEGFB | En modelo preclínico de obesidad y resistencia a insulina con sobreexpresión de VEGFB:<br>↑VEGFB→↑vascularización, función del tejido adiposo, metabolismo, ↓inflamación                              | (Robciuc et al. 2016)   |
| Deficiencia de VEGFB    | En modelo preclínico de NAFLD con deficiencia de VEGFB:<br>↓VEGFB→↑resistencia a insulina, NAFLD score, ↓AMPK, oxidación ácidos grasos                                                                | (R. Li et al. 2022)     |
| VEGFB                   | En modelo preclínico de HFD:<br>Administración de VEGFB→ ↓obesidad, hiperlipidemia, ↑AMPK                                                                                                             | (Hu et al. 2021)        |
| VEGFB                   | En la clínica:<br>VEGFB↔crecimiento HCC, metástasis                                                                                                                                                   | (Kanda et al. 2008)     |

## Objetivos

A continuación, se describen los antecedentes e hipótesis que han derivado en el planteamiento de los objetivos de la presente Tesis Doctoral.

En la práctica clínica de cirugías hepáticas mayores es inherente el daño por isquemia-reperfusión. Este daño se encuentra aumentado cuando los hígados se encuentran en condiciones patológicas, como es el caso de la diabetes de tipo 2 y de la enfermedad hepática relacionada con alcohol. Por este motivo, el objetivo de la presente Tesis Doctoral es el estudio del daño hepático relacionado con procedimientos de isquemia-reperfusión en hígados patológicos y la determinación de posibles estrategias farmacológicas para disminuir este daño. A partir de este objetivo general, en la presente Tesis Doctoral, se han tenido en cuenta los antecedentes que se detallan a continuación:

- Diversos estudios clínicos han asociado a la diabetes de tipo 2 con un peor pronóstico en pacientes sometidos a resección hepática (Qingshan Li et al. 2017; Yang et al. 2022). Por otra parte, a pesar de que no se han realizado procedimientos de PH+I/R en modelos preclínicos de T2DM, se ha reportado que tanto la esteatosis (Elias-Miró et al. 2014) (Bujaldon et al. 2019) como la hiperglicemia (Han et al. 2014) empeoran la regeneración hepática. Nuestra primera hipótesis es que las ratas con diabetes de tipo 2 podrían tener menor tolerancia a un procedimiento de hepatectomía parcial bajo oclusión vascular. Por este motivo, se ha establecido como **objetivo 1:**

**Caracterizar un modelo preclínico de ratas con diabetes de tipo 2 sometidas a un procedimiento de hepatectomía parcial bajo oclusión vascular y determinar los efectos de la cirugía en el daño y la regeneración hepática.**

- Por otro lado, varios estudios señalan el papel beneficioso de VEGFA en procesos relacionados con obesidad (Elias et al. 2012) e isquemia (X. Wang et al. 2020), asociados a la cirugía hepática. Además, en un modelo preclínico de PH+I/R se observó un efecto beneficioso de la administración de la molécula (Bujaldon et al. 2019). Por este motivo, nuestra segunda hipótesis es que el VEGFA podría ejercer un papel importante en los procesos de regeneración hepática en ratas con diabetes del tipo 2 tras una

hepatectomía parcial bajo oclusión vascular. Así pues, el **objetivo 2** de la presente Tesis Doctoral ha sido:

**Determinar el papel de VEGFA sobre la lesión, la inflamación y la regeneración hepática y sus mecanismos de acción subyacentes en la hepatectomía parcial bajo oclusión vascular en ratas con diabetes de tipo 2.**

- El consumo de alcohol tiene un efecto negativo sobre la funcionalidad del hígado (Buchanan and Sinclair 2021). Por otra parte, el daño asociado al procedimiento de MC afecta negativamente al trasplante hepático (Mónica B. Jiménez-Castro et al. 2017). La suma de ambos procesos, aunque no se ha estudiado, se espera que sea negativa para el hígado donante, aumentando el riesgo de disfunción primaria tras el TH y disminuyendo la supervivencia. Por tal motivo, consideramos que un injerto hepático obtenido a partir de un donante con enfermedad hepática asociada al alcohol tras un proceso de muerte cerebral podría representar un factor de riesgo en el trasplante hepático, aumentando el daño y la disfunción hepáticos, siendo nuestro **objetivo 3**:

**Establecer un modelo preclínico de enfermedad hepática asociada a alcohol y observar el efecto de esta enfermedad en modelos preclínicos de perfusión *ex vivo* y trasplante hepático tras un procedimiento de muerte cerebral.**

- Por otra parte, resultados previos del grupo han demostrado un efecto protector de GH en un modelo preclínico de MC en injertos hepáticos donantes con ALD a través de un aumento de VEGFB y VEGFA en el intestino. Este papel protector observado tras la administración de GH podría desaparecer una vez se extrae o aísla el injerto, al perder la interacción entre intestino e hígado. Por otra parte, la administración de VEGFB o VEGFA en un modelo preclínico de MC en injertos hepáticos donantes con ALD también disminuye el daño hepático y mejora la funcionalidad del tejido. Por este motivo, consideramos que el eje GH-VEGFB/VEGFA podría disminuir el daño y la disfunción hepáticos en donantes de injertos hepáticos con enfermedad hepática asociada al alcohol sometidos a trasplante. Por consiguiente, se establece como **objetivo 4** de la Tesis Doctoral:

**Investigar el papel del eje GH-VEGFB/VEGFA sobre la lesión y regeneración hepática en animales de experimentación con enfermedad hepática asociada a alcohol tras un procedimiento de muerte cerebral en un modelo de perfusión *ex vivo* y en trasplante hepático.**

## Material y métodos

### Hepatectomía parcial con oclusión vascular

#### Animales de experimentación

Para realizar los estudios relacionados con la hepatectomía parcial bajo oclusión vascular, se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley (Charles River, París, Francia). Estas ratas fueron estabuladas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, donde se mantuvieron en condiciones ambientales constantes, con temperaturas de entre 21° y 22°, humedad relativa de 70% y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Durante toda su estancia, las ratas fueron alimentadas ad-libitum.

Tras la llegada de las ratas, cuya edad era de entre 8 y 9 semanas, se esperó durante una semana antes de incluirlas en ningún procedimiento para permitir su aclimatación. Posteriormente, los animales fueron separados en dos grupos, de los cuales un grupo recibió una dieta alta en grasas (HFD) para inducir obesidad (D12451, Research Diets Inc., New Brunswick, Nueva Jersey, con un 45% de calorías que proviene de lípidos), mientras que en el otro grupo las ratas se mantuvieron en una dieta estándar (2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Envigo, Indianápolis, Indiana, Estados Unidos). Tras 8 semanas, a las ratas con una dieta HFD se les indujo el estado de diabetes de tipo 2 mediante la administración de una dosis de estreptozocina (Stz) (HY-12753, MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, Estados Unidos), a una concentración de 30mg/Kg de rata, diluida en 1mL de tampón de citrato 0,1M con un pH de 4,5, por vía intravenosa. La Stz es un fármaco utilizado para la destrucción de células beta del páncreas, por lo que se emplea también para inducir el estado de diabetes de tipo 2 (Davidson et al. 2018; Holmes et al. 2015; Kowluru 2020). A las ratas con una dieta estándar, utilizadas como controles, se les administró 1mL del tampón de citrato con la misma composición que el utilizado para diluir la Stz. Tras 4 días, se confirmó el estado diabético de los animales a través de la medida de glucosa en sangre por tiras reactivas (Aviva Accu-Chek, Roche, Mannheim, Alemania). Si los niveles de glucosa eran superiores a 350 mg/dL, se consideró que las ratas eran diabéticas.

Este modelo animal de diabetes de tipo 2 cursa con obesidad, niveles normales de insulina e hiperglicemia persistente, características similares a lo que ocurre en la práctica clínica de estadios avanzados de la enfermedad (Holmes et al. 2015).

Una semana después de la inyección de Stz (en el modelo con diabetes de tipo 2) o el tampón de citrato (en los controles), las ratas fueron sometidas a un procedimiento de hepatectomía parcial bajo oclusión vascular.

Todos los procedimientos que se mencionan fueron realizados acorde a las directrices de la declaración de Helsinki y aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Barcelona y por la Generalitat de Catalunya (DAAM 9353). Además, se siguieron las normativas de la Unión Europea para experimentos con animales (Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de septiembre de 2010).

### Anestesia

Durante la cirugía, las ratas fueron anestesiadas por vía inhalatoria con isofluorano (Piramal Critical Care B.V., Voorschoten, Holanda). En primer lugar, se realizó la inducción de la anestesia con isofluorano al 4% y un flujo de oxígeno de 1 L/min. Posteriormente, las ratas se mantuvieron anestesiadas bajando la concentración de isofluorano al 2%, manteniendo el flujo constante de oxígeno. No obstante, estos valores son ligeramente variables, atendiendo siempre al estado anestésico en el que se observe al animal y comprobando parámetros como la respiración o movimientos reflejos.

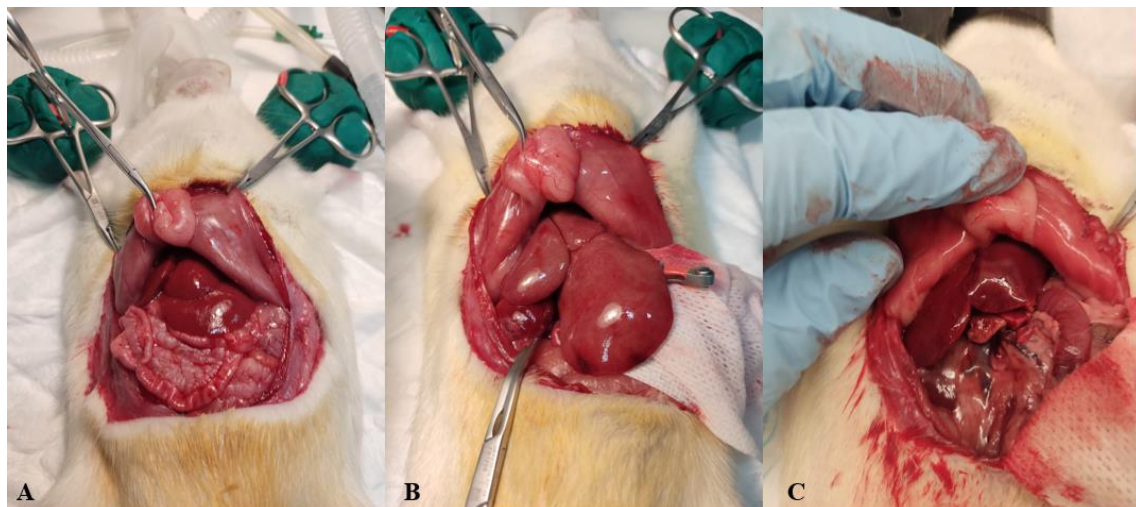
### Procedimiento quirúrgico

La hepatectomía parcial del 70% con oclusión vascular de 60 min (Figura 4) se realizó en base a un modelo descrito inicialmente por Selzner y colaboradores (Selzner, Camargo, and Clavien 1999), utilizado ampliamente en estudios preclínicos por la comunidad científica, ya que mimetiza los resultados de la práctica clínica de las resecciones hepáticas.

Tras inducir la anestesia de la rata, se rasuró el abdomen para evitar una posible contaminación tras la apertura que se iba a realizar después. La rata fue colocada en posición de decúbito supino sobre la mesa de operaciones e inmovilizada para evitar posibles movimientos durante la cirugía. Antes de la incisión, se le aplicó una solución de povidona yodada al área abdominal. Después, mediante un bisturí, se efectuó una incisión de alrededor de 5 centímetros en la línea media umbilical, partiendo desde el apéndice xifoides para poder acceder a la cavidad abdominal. Posteriormente, para poder optimizar la visibilidad del campo quirúrgico, se seccionaron los ligamentos hepáticos y se apartaron las vísceras, protegiéndolas con una gasa y administrando una solución de lactato de Ringer (Grifols, Barcelona, España) para mantenerlas humedecidas.

Inicialmente, se utilizó una pinza Satinsky, con la que se pinzó el lóbulo triangular para facilitar el aislamiento de la tríada portal. Seguidamente, se colocó un *clamp* microvascular en la ramificación portal que irriga los lóbulos mediano e izquierdo para realizar la isquemia parcial, que se mantuvo por 60 minutos. La isquemia parcial de los lóbulos mediano e izquierdo se realiza para disminuir la congestión intestinal, ya que el flujo portal se mantiene en los lóbulos caudados y derecho. Se procedió, en este momento, a ligar y extirpar el lóbulo triangular con sutura de seda 4/0 (Suturas Aragó, Barcelona, España) y el lóbulo izquierdo con sutura de seda 2/0 (Suturas Aragó, Barcelona, España).

Tras los 60 minutos de la isquemia, se procedió a la extracción del *clamp* microvascular, permitiendo así la reperusión del lóbulo mediano, el cual representa el 30% del volumen hepático y que es la parte de hígado remanente que queda presente en la rata, y se realizó la ligadura y extirpación de los lóbulos caudados y del lóbulo derecho con seda del 2/0. Finalmente, para concluir la intervención, se cerró el abdomen del animal mediante una sutura continua de la capa muscular y de la piel con sutura de seda del 2/0 y se volvió a aplicar povidona yodada sobre la zona abdominal.



**Figura 4.** Resección hepática bajo oclusión vascular. (A) Apertura de la rata. (B) Isquemia parcial. (C) Finalización de la hepatectomía.

## Diseño experimental

### Protocolo 1

Caracterización del hígado en el modelo de ratas con diabetes de tipo 2 y supervivencia tras un procedimiento de hepatectomía parcial bajo oclusión vascular.

#### Grupos:

- 1) Control de ratas diabéticas (n=6). Ratas diabéticas (Db) a las que se había dado una dieta alta en grasas y administrado una dosis baja de estreptozocina. Se realizó una incisión en la línea media umbilical y se diseccionaron los vasos del hilio hepático. Tras 5 horas, se recogieron las muestras.
- 2) Control de ratas sin diabetes (n=6). Ratas controles (o *Lean*, Ln) sin la enfermedad. Se realizó una incisión en la línea media umbilical y se diseccionaron los vasos del hilio hepático. Tras 5 horas, se recogieron las muestras.
- 3) Hepatectomía parcial+ isquemia/reperfusión (PH+I/R) (n=5 Ln, 9 Db). Ratas diabéticas y controles fueron sometidas a una hepatectomía parcial (del 70%) bajo oclusión vascular (proceso de isquemia) de 60 minutos, siguiendo la técnica reportada por Selzner y colaboradores (Selzner, Camargo, and Clavien 1999).

En los dos primeros grupos, se recogió plasma para hacer determinaciones de la concentración de insulina. Se utilizó sangre para determinar los niveles de glucosa. Se utilizó tejido hepático para realizar la histología, mediante tinciones de *Sirius Red*, Hematoxilina y Eosina y *Oil Red O*.

Para el grupo 3, en el que se quería comparar la supervivencia de las ratas diabéticas respecto a ratas control, se realizó la cirugía y se monitorizó la supervivencia, anotando el momento de defunción de los roedores durante 2 semanas tras la cirugía hepática, que fue el tiempo máximo de seguimiento del estudio.

#### Protocolo 2

Efecto de la modulación de la familia de factores de crecimiento VEGF en ratas con diabetes de tipo 2 sometidas a una hepatectomía parcial bajo oclusión vascular.

- 1) *Sham* (n=12, 6 Ln y 6 Db). Los animales fueron anestesiados. Posteriormente, se realizó una incisión en la línea media umbilical y diseccionaron los vasos del hilio hepático. Tras 5 horas, se recogieron las muestras.
- 2) Hepatectomía parcial + isquemia/reperfusión (PH+I/R) (n=6 Db). Las ratas fueron sometidas a una hepatectomía parcial (70%) bajo una oclusión vascular (proceso de isquemia) de 60 minutos, siguiendo la técnica reportada por Selzner y colaboradores (Selzner, Camargo, and Clavien 1999). Tras 4 horas de reperfusión, las ratas fueron sacrificadas y se recogieron muestras.
- 3) PH+ I/R+ VEGFA (n=6 Db). Igual que el grupo 2, pero a las ratas se les administró VEGFA 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico (100-20-100UG, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) a una concentración de 5µg/Kg por vía intravenosa.

- 4) PH+ I/R+ anti-VEGFR2 (n=6 Db). Igual que el grupo 2, pero a las ratas se les administró Vandetanib (orb61120, Biorbyt, Cambridge, Reino Unido), antagonista de VEGFR2, 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico a una concentración de 2,5 mg/Kg por vía intravenosa.
- 5) PH+ I/R+ VEGFB (n=6 Db). Igual que el grupo 2, pero a las ratas se les administró VEGFB 5 minutos antes del procedimiento quirúrgico, VEGFB (100-20B-100UG, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) a una concentración de 5µg/Kg por vía intravenosa.

Las condiciones del estudio (PH con 60 minutos de isquemia y 4 horas de perfusión) se establecieron basándose en los resultados de investigaciones previas y en hallazgos preliminares del grupo (Hide et al. 2016; Serafín et al. 2002). El tiempo de perfusión de 4 horas se encuentra en el intervalo en el cual se observa el pico máximo en los parámetros de daño hepático y, adicionalmente, este periodo permite mantener altas tasas de supervivencia. Además, los resultados preliminares indican que, tras 4 horas de perfusión, se presenta una mortalidad significativa. De hecho, todas las ratas diabéticas murieron durante las 30 horas posteriores a la cirugía. Por lo tanto, estas condiciones experimentales fueron consideradas las más apropiadas y fundamentales para nuestros objetivos del estudio, los cuales incluyen la evaluación del efecto de VEGFA sobre el daño hepático y el estudio de las posibles vías de señalización activadas por VEGFA en PH+ I/R en el contexto de la T2DM. Las dosis de los distintos fármacos se determinaron en base a estudios previos (Bujaldon et al. 2019) y a partir de resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo de investigación.

Se utilizó plasma para hacer determinaciones de transaminasas, sFLT1, bilirrubina e insulina. Se utilizó sangre para determinar los niveles de glucosa. Se utilizó tejido hepático para realizar análisis histológicos. Además, se utilizaron hígado, tejido adiposo e intestino para realizar las determinaciones bioquímicas correspondientes que se explicarán a continuación

### **Recogida de muestras y determinaciones**

Para los grupos experimentales del protocolo 2, con el animal anestesiado, se recogieron muestras de sangre y tejido hepático 4 horas después de la perfusión, o a las 5 horas tras la incisión en el grupo *Sham* (para dejar pasar aproximadamente el mismo tiempo tras la apertura del abdomen, considerando la hora de isquemia y las 4 horas de la perfusión). Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena cava inferior infrahepática. Posteriormente, se les añadió

una pequeña cantidad de heparina para evitar la coagulación y se dejaron a 4°C hasta su posterior centrifugación durante 15 minutos a 3000 rpm a 4°C para obtener el plasma. Este plasma fue congelado a -80°C hasta la realización de los correspondientes análisis.

Parte del tejido hepático se congeló inmediatamente después de su recolección utilizando nieve carbónica y se almacenó a -80°C hasta su posterior procesamiento. Adicionalmente, otra porción del tejido hepático se separó y se colocó en un casete de inclusión junto a O.C.T (por su nombre *Optimal Cutting Temperature*, 4583, Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Holanda), siendo posteriormente congelado a -80°C para poder realizar la tinción de *Oil Red O*. Finalmente, otra parte de tejido hepático se fijó en formol tamponado al 10% para su posterior inclusión en parafina, con el fin de obtener cortes para estudios histológicos y técnicas de inmunohistoquímica.

Se determinaron en plasma los niveles de transaminasas, bilirrubina, sFLT1 e insulina. En el hígado, se determinaron los siguientes parámetros bioquímicos: Concentración de malondialdehído (MDA), actividad de mieloperoxidasa (MPO), niveles proteicos de VEGFA, VEGFB, Id1, IL1 $\beta$ , Interleucina 10 (IL10), antígeno Ki-67 (Ki67), Pi3k, Pkb y Wnt2 y la actividad de las proteínas caspasa 3 (C3) y caspasa 8 (C8). Además de en hígado, se determinaron en tejido adiposo e intestino los niveles proteicos de VEGFA y VEGFB. Finalmente, se analizaron los niveles de ARNm en hígado e intestino de VEGFA y VEGFB, junto a los niveles de  $\beta$  actina, utilizada como control endógeno.

Además, mediante estudios histológicos, se evaluó la lesión por necrosis a través de la tinción por Hematoxilina-Eosina, niveles de antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, por su nombre en inglés *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), técnica de marcaje de extremos con transferasa terminal de deoxinucleotidil (TUNEL, por su nombre en inglés Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling), *Sirius Red* y *Oil Red O*.

## **Máquina de perfusión normotérmica *ex vivo***

### **Animales de experimentación**

Para los estudios relacionados con la máquina de perfusión normotérmica *ex vivo*, se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley (Charles River, París, Francia). Estas ratas fueron estabuladas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, donde se mantuvieron en condiciones ambientales constantes, con temperaturas de entre 21° y 22°, humedad relativa de 70% y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Durante toda su estancia, las ratas fueron alimentadas ad-libitum.

Se utilizaron ratas de entre 200 y 250 gramos. Se esperó una semana antes de incluirlas en ningún procedimiento para permitir su aclimatación. Todas las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar (2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Envigo, Indianápolis, Indiana, Estados Unidos). Posteriormente, a los grupos a los que se les iba a inducir la enfermedad hepática asociada a alcohol (ALD), se les administró *ad libitum* etanol en el agua (12% v/v) durante 6 semanas para inducir toxicidad crónica (Nevzorova et al. 2020; Radic et al. 2019). Después de las 6 semanas, se realizó un procedimiento de muerte cerebral (MC), tal y como se explica a continuación.

Todos los procedimientos que se mencionan fueron realizados acorde a las directrices de la declaración de Helsinki y aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Barcelona y por la Generalitat de Catalunya (DAAM 9353). Además, se siguieron las normativas de la Unión Europea para experimentos con animales (Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de septiembre de 2010).

### Anestesia

Durante la cirugía, las ratas fueron anestesiadas por vía inhalatoria con isoflurano (Piramal Critical Care B.V., Voorschoten, Holanda). En primer lugar, se realizó la inducción con isoflurano al 4% y un flujo de oxígeno de 1 L/min. Posteriormente, las ratas se mantuvieron anestesiadas bajando la concentración de isoflurano al 2%, manteniendo el flujo de oxígeno. No obstante, estos valores son ligeramente variables, atendiendo siempre al estado anestésico en el que se observe al animal y teniendo en cuenta los diferentes procedimientos quirúrgicos a los que se somete el animal (por ejemplo, durante la muerte cerebral, o durante la fase anhepática en el receptor). Durante el proceso de anestesia, se comprueban parámetros como la respiración o movimientos reflejos.

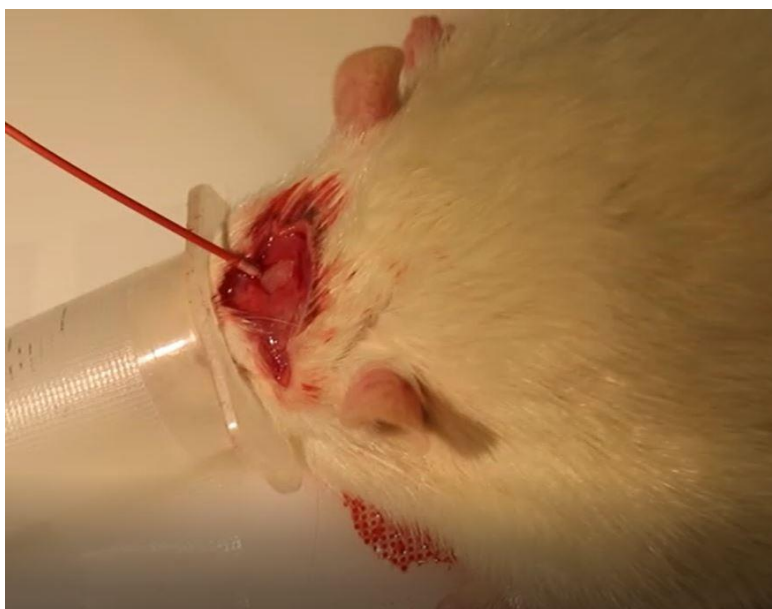
### Procedimiento quirúrgico

#### *Inducción de la muerte cerebral*

Tras la anestesia de la rata, se realizó una trepanación frontolateral de unos 11 mm. Posteriormente, se introdujo un catéter con balón Fogarty (Fogarty 14G, Baxter HealthCare Corporation, CA, Estados Unidos) en el espacio extradural, con la punta orientada en dirección caudal. La MC se indujo mediante el aumento de la presión intracraneal al inflar el balón durante 1 minuto (Figura 5), provocando una rápida lesión cerebral que lleva a la MC simulando, de esta forma, una condición comparable a un trauma cerebral agudo aislado en humanos.

Después, se realizó una traqueotomía en las ratas para permitir la ventilación mecánica con la ayuda de un ventilador para roedores (Harvard Apparatus, Holliston, MA, Estados Unidos) con

oxígeno al 30% hasta el final del procedimiento. El estado de MC se confirmó por la ausencia de reflejos. La normotensión en las ratas con MC se mantuvo mediante la infusión de 1mL de una solución salina con norepinefrina a 0,01 mg/mL por la vena caudal. Esta infusión se empezó a realizar 15 minutos después de la inducción de la MC y se repitió cada hora durante el procedimiento de la MC, que fue de 3 horas.

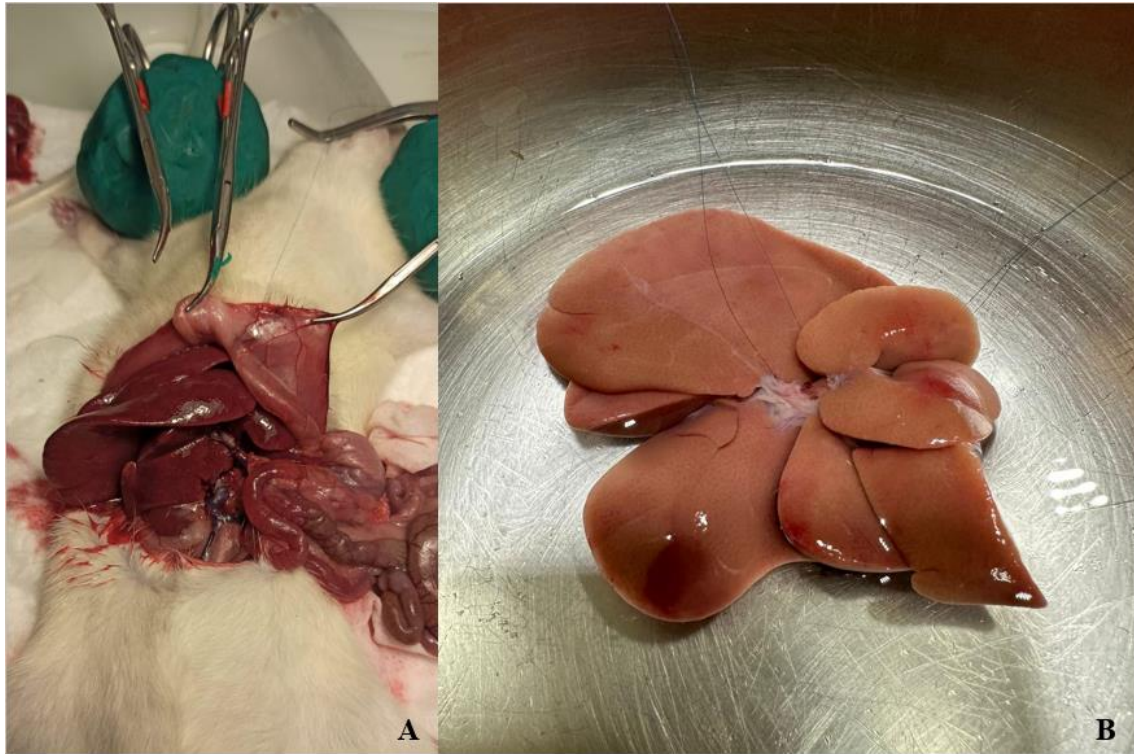


**Figura 5.** Inducción de la muerte cerebral

#### *Extracción del injerto del donante*

Tras la anestesia y la laparotomía, se seccionaron los ligamentos hepáticos y se liberó la vena cava inferior. Además, se separó y ligó con seda de 6/0 (Suturas Aragón, Barcelona, España) la vena cava inferior suprarrenal y el pedículo renal derecho. En el hilio hepático, se separó la vena porta de la arteria hepática y del conducto biliar. A continuación, se ligaron las ramas esplénica y pilórica de la vena porta con seda de 6/0. Después, se liberó y se ligó la vena diafragmática derecha y se separaron la arteria aorta y la vena cava inferior para, posteriormente, diseccionarlas. Previamente a la perfusión del hígado con la solución de preservación Universidad de Wisconsin (UW), se administraron 300 unidades de heparina por vía intravenosa. Se colocó un *clamp* microvascular en la parte superior de la arteria aorta para evitar la hemorragia al hacer la incisión. Tras la incisión, se insertó un catéter de 16G. Posteriormente, una vez iniciada la perfusión, se realizó la oclusión de la arteria aorta torácica, se abrió el diafragma y se seccionó la vena cava inferior suprahepática por encima del diafragma. Se continuó con la perfusión del hígado con 50 mL de solución de preservación UW a través de la arteria aorta.

Una vez se hizo la perfusión, se insertó otro catéter de 14G en la vena porta y se añadió una ligadura de seda 6/0. Con este catéter, se hizo un segundo lavado del hígado con 20 mL de solución de preservación. Finalmente, se extrajo el injerto y se colocó en un baño con solución de preservación a 4°C (Figura 6), llevando el injerto hepático a un procedimiento de isquemia fría (CI, por su nombre en inglés *Cold Ischemia*).



**Figura 6.** Extracción del injerto del donante y colocación en el banco. (A) Apertura de la rata y liberación del hígado para su extracción. (B) Extracción del injerto y colocación en un baño con solución de preservación.

#### *Preservación hipotérmica del injerto*

Después de haber extraído el injerto y colocarlo en un baño con solución de preservación a 4°C, se mantuvo durante 24 horas a esta temperatura. Al acabar este periodo, se llevó a cabo un lavado de los hígados mediante la administración de 20 mL de solución de preservación UW a través de la vena porta.

#### *Perfusión ex- vivo del injerto*

Después de la preservación hipotérmica del injerto (24 horas), los hígados se conectaron a través de la vena porta a un sistema de perfusión recirculante durante 120 minutos a 37°C.

El circuito de perfusión contiene varios componentes: un recipiente diseñado para el órgano, equipado con dispositivos para la inserción del catéter de la vena porta; otro recipiente que

contiene el líquido de perfusión (una solución Krebs Heinseleit-albúmina) (Tabla 4), con una doble pared entre la que circula agua destilada a 37°C para calentar el líquido de perfusión; una bomba peristáltica para propulsar el líquido de perfusión; un tanque de oxígeno para oxigenar el líquido de perfusión con una proporción del 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>; macrofiltros para filtrar de forma continua el líquido de perfusión; un sistema para evitar la entrada de burbujas de aire al hígado y un sistema de control de la presión para mantener una presión de perfusión constante (12 mm de Hg) durante el proceso de perfusión (Figura 7).

En cuanto al funcionamiento del circuito, el líquido de perfusión es impulsado por la bomba peristáltica, pasa por los macrofiltros, por los sistemas que evitan la entrada de aire al hígado y, finalmente, por el sistema de control de presión. Por último, el líquido de perfusión circula a través del catéter de la vena porta hasta el hígado. La perfusión se lleva cabo en un circuito cerrado, con la presión constante de 12 mm de Hg.

Para este modelo de perfusión hepática *ex vivo*, el líquido de perfusión consistió en 2% de dextrano (Dextran Clinical Grade MW 60, 180140, MP Biomedicals, Eschwege, Alemania) en un tampón Krebs-Henseleit-bicarbonato (KHB) (3753, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) con 2 µl/mL de heparina.

La composición y concentración del líquido de perfusión utilizado, por lo tanto, fue:

**Tabla 4.** *Composición de la solución de perfusión utilizada en el procedimiento de perfusión ex vivo.*

|                               | Concentración |
|-------------------------------|---------------|
| D-glucosa                     | 2 g/L         |
| Sulfato de magnesio           | 0,141 g/L     |
| Fosfato de potasio monobásico | 0,16 g/L      |
| Cloruro de potasio            | 0,35 g/L      |
| Cloruro de sodio              | 6,9 g/L       |
| Dextrano                      | 2% w/v        |
| Heparina                      | 2 mL/L        |

Tras dos horas en la máquina de perfusión, se procedió a la extracción del hígado de la máquina de perfusión junto a perfusato para hacer las determinaciones pertinentes.



**Figura 7.** Perfusión del injerto *ex vivo*. (A) Máquina de perfusión. (B) Colocación del injerto hepático en la máquina de perfusión.

## Diseño experimental

### Protocolo

Investigar el efecto de la vía de señalización de la GH después de la MC, isquemia fría y reperusión en un modelo animal de ALD mediante un modelo de perfusión *ex vivo*.

- 1) MC (n=6). La MC se indujo mediante una trepanación frontolateral en ratas con ALD. Se introdujo un catéter con balón Fogarty en el espacio extradural. Se incrementó la presión intracraneal al inflar el balón, llevando a una lesión cerebral que provoca la MC. Las ratas se mantuvieron en normotensión durante 3 horas. Seguidamente, los hígados se perfundieron con solución de UW.
- 2) MC+ CI (n=6). Igual que el grupo 2, pero los hígados se perfundieron con solución de UW, se retiró el injerto del donante y se preservó durante 24 horas en UW en frío, a 4°C (periodo de isquemia fría o CI).
- 3) MC+ GH+ CI (n=6). Igual que el grupo 2, pero se administró GH recombinante (100-40, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) por vía intravenosa tras la MC a una concentración de 0,1 mg/Kg.
- 4) MC+ VEGFB+ CI (n=6). Igual que el grupo 2, pero se administró VEGFB recombinante (100-20B-100UG, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) por vía intravenosa tras la MC a una concentración de 5µg/Kg.
- 5) MC+ VEGFA+ CI (n=6). Igual que el grupo 2, pero se administró VEGFA recombinante (100-20-100UG, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) por vía intravenosa tras la MC a una concentración de 5µg/Kg.

- 6) Control (n=6). Los hígados de ratas con ALD fueron perfundidos con solución de UW sin CI ni perfusión *ex vivo*.
- 7) MC+ CI/R (n=6). Igual que el grupo 2, pero los injertos hepáticos fueron sometido a 2 horas de reperusión en el sistema de perfusión normotérmica *ex vivo* tras las 24 horas de CI.
- 8) MC+ GH+ CI/R (n=6). Igual que el grupo 3, pero los injertos hepáticos fueron sometido a 2 horas de reperusión en el sistema de perfusión normotérmica *ex vivo* tras las 24 horas de CI.
- 9) MC+ VEGFB+ CI/R (n=6). Igual que el grupo 4, pero los injertos hepáticos fueron sometidos a 2 horas de reperusión en el sistema de perfusión normotérmica *ex vivo* tras las 24 horas de CI.
- 10) MC+ VEGFA + CI/R (n=6). Igual que el grupo 5 pero los injertos hepáticos fueron sometidos a 2 horas de reperusión en el sistema de perfusión normotérmica *ex vivo* tras las 24 horas de CI.

Las condiciones del estudio (MC con 3 horas de normotensión, 24 horas de CI y 2 horas de perfusión *ex vivo*) se establecieron en base a resultados de investigaciones previas y en hallazgos preliminares del grupo.

Las dosis de los distintos fármacos se determinaron en base a estudios previos (Álvarez-Mercado et al. 2019; Atzori et al. 2022; Bujaldon et al. 2019; Micó-Carnero et al. 2022) y a partir de resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo de investigación.

Se recogió perfusato y muestras de tejido hepático hacer realizar las determinaciones bioquímicas correspondientes y el análisis histológico.

### **Recogida de muestras y determinaciones**

Las muestras de hígado y perfusato se recogieron a las 24 horas tras la CI y tras el procedimiento de perfusión normotérmica *ex vivo* de 2 horas. Para el grupo de MC, se cogió muestra de hígado 3 horas después de la inducción de la MC.

Parte del tejido hepático se congeló inmediatamente utilizando nieve carbónica y se almacenó a -80°C hasta su posterior procesamiento. Adicionalmente, otra porción del tejido hepático se separó y se colocó en un casete de inclusión junto a O.C.T, siendo posteriormente congelado a -80°C para poder realizar la tinción de *Oil Red O*. Finalmente, otra parte de tejido hepático se

fijó en formol tamponado al 10% para su posterior inclusión en parafina, con el fin de obtener cortes para estudios histológicos y técnicas de inmunohistoquímica.

Se determinaron en perfusato los niveles de transaminasas. En el hígado, se determinaron los siguientes parámetros bioquímicos: MDA, niveles proteicos de GH, VEGFA, VEGFB, ATP, lactato, IL1 $\beta$ , IL10, Ki67, y la actividad de caspasa 3.

Además, mediante estudios histológicos, se evaluó la lesión por necrosis, niveles de TUNEL, *Sirius Red* y *Oil Red O*.

## Trasplante hepático

Los animales de experimentación, la anestesia, la inducción de la muerte cerebral y la extracción del injerto hepático del donante fueron similares a los descritos previamente en el apartado Máquina de perfusión normotérmica *ex vivo* (página 48), excepto en la fase del donante, en el que, en este caso, se canuló el conducto biliar con un catéter de polietileno de 0,96 mm de diámetro externo y 0,5 de diámetro interno, el cual se fijó usando seda del 6/0, para poder unir los conductos biliares de los donantes con los de los receptores. Por consiguiente, en este apartado sólo se describirán los aspectos del trasplante hepático que no se comparten con los descritos en la sección de Máquina de perfusión normotérmica *ex vivo*.

## Procedimiento quirúrgico

### *Preservación del injerto y preparación para la colocación en el receptor*

Después de haber extraído el injerto y colocarlo en un baño con solución de preservación a 4°C, se mantuvo durante 24 horas a esta temperatura. Durante el tiempo en que el injerto se mantuvo en isquemia fría, se preparó el injerto para implantarlo en el animal receptor trascurridas las 24 horas de isquemia fría.

Para facilitar que se hiciera la anastomosis de la vena cava inferior suprahepática, se recortó una pequeña porción del diafragma que rodea la vena y se colocaron dos puntos de referencia en los extremos de la vena cava empleando Prolene 7/0 (W8702, Johnson & Johnson, Norderstedt, Alemania).

Para realizar la anastomosis de la vena porta y de la vena cava inferior infrahepática, se usó la técnica de doble *cuff* descrita por Kamada y Calne (Kamada and Calne 1979), sin realizar la reconstrucción de la arteria hepática. Esta técnica consiste en colocar una estructura tubular de polietileno, el *cuff*, alrededor de la vena, fijándolo con seda 6/0. La implementación de los *cuffs* en la vena porta y en la vena cava inferior infrahepática facilitan la anastomosis, ya que no

requiere realizar una sutura continua y, por ende, reducen el tiempo de cirugía, importante para la supervivencia del receptor. La colocación de los *cuffs* en la vena cava inferior infrahepática y en la vena porta se realizó tras la preparación de la vena cava inferior suprahepática.

#### *Implante del injerto hepático en el receptor*

Tras anestesiarse al receptor, se siguió un procedimiento similar al del donante, realizando la laparotomía y la disección del hígado.

Posteriormente, se colocaron puntos de sutura con Prolene 7/0 en los extremos de las venas porta y cava inferior infrahepática para facilitar la introducción de los *cuffs*.

Tras colocar los puntos de sutura, se procedió a la oclusión de la vena porta en la confluencia con la vena esplénica y de la vena cava inferior infrahepática, justo por encima de la vena renal derecha, utilizando *clamps* microvasculares. Después, con una pinza Satinsky, se ocluyó la vena cava inferior suprahepática, empezando la fase anhepática. Posteriormente, se seccionaron las venas porta y cava inferior suprahepática e infrahepática en las partes más proximales al hígado y se extrajo el hígado del receptor.

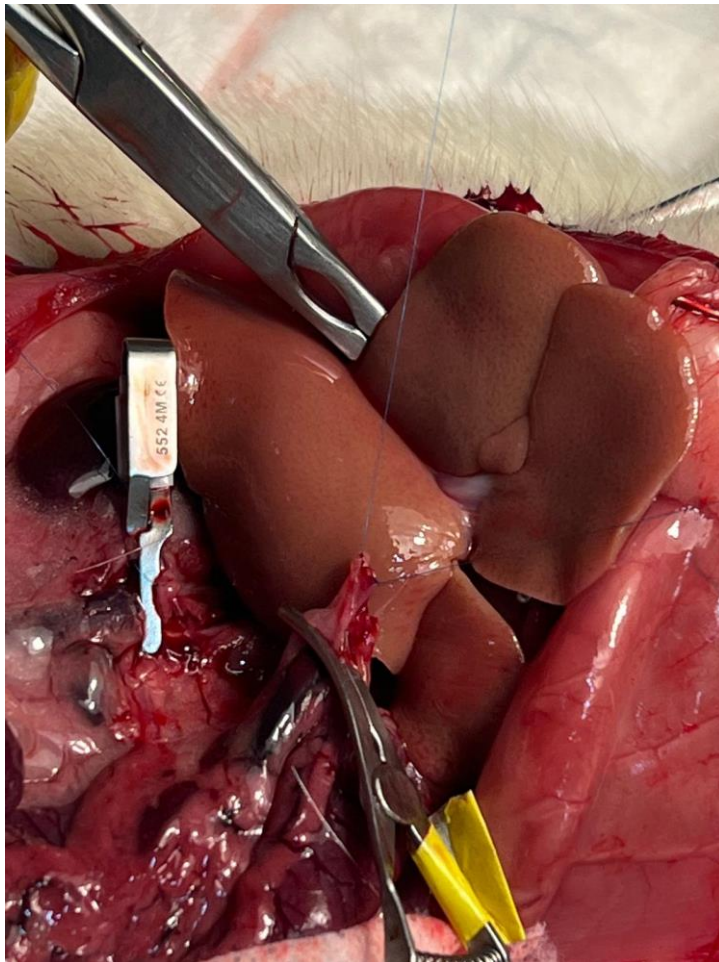
A continuación, se procedió al implante del hígado del donante (Figura 8), perfundiendo previamente con solución de Lactato de Ringer para eliminar el exceso del ion potasio de la solución UW. Se realizó la anastomosis entre la vena cava inferior suprahepática del donante y la del receptor por sutura continua utilizando Prolene 7/0. Seguidamente, se efectuó la anastomosis de la vena porta, colocando el *cuff* de la vena porta del hígado del donante dentro de la vena porta del receptor, fijándolo mediante sutura de seda 6/0.

Una vez se realizaron las dos primeras anastomosis, se reperfundió el injerto quitando los *clamps* microvasculares que ocluían las venas, empezando por la vena porta y, después, por la vena cava inferior suprahepática. Finalmente, se realizó la anastomosis de la vena cava inferior infrahepática de forma similar a la de la vena porta retirando, por último, el *clamp* microvascular para restablecer el flujo sanguíneo.

Una vez se completaron las uniones vasculares, se administró a través de la vena dorsal del pene una solución de lactato de Ringer y  $\text{NaHCO}_3$  (2,5 mL de solución isotónica de lactato de Ringer y 0,5 mL de  $\text{NaHCO}_3$  1M) para restaurar el volumen de líquido perdido y contrarrestar la acidosis que se produce durante la operación.

Seguidamente, se realizó la anastomosis del conducto biliar uniendo el conducto biliar del donante con el del receptor, utilizando el tubo de polietileno que se había colocado

anteriormente en el donante, y fijando con una ligadura de seda de 6/0. Para acabar la intervención, se cerró el animal con sutura continua de la capa muscular y piel de la misma forma que se hizo durante la hepatectomía parcial, usando seda del 2/0, y se aplicó povidona yodada sobre la zona abdominal.



**Figura 8.** Colocación del injerto en el receptor.

## Diseño experimental

### Protocolo

Efecto de los tratamientos empleados durante la perfusión *ex vivo* en la supervivencia en trasplantes de hígados donantes con ALD.

- 1) MC+ TH (n=12, 6 trasplantes). Tras 3 horas de MC, los hígados de ratas con ALD se lavaron con solución UW, se extrajeron y preservaron a 4°C durante 24 horas en solución de UW. Posteriormente, los hígados se implantaron en ratas de acuerdo a la técnica de *cuff* descrita previamente por Kamada (Kamada and Calne 1979), con una fase anhepática de 15-20 min.

- 2) MC+ GH+ TH (n=12, 6 trasplantes). Igual que el grupo 1 de trasplante (MC+TH), pero con la administración de GH recombinante en donantes por vía intravenosa tras la MC a la misma concentración que en la perfusión *ex vivo* (0,1 mg/Kg).
- 3) MC+ VEGFB+ TH (n=12, 6 trasplantes). Igual que el grupo 1 de trasplante, pero con la administración de VEGFB recombinante por vía intravenosa tras la MC a la misma concentración que en la perfusión *ex vivo* (5µg/Kg).
- 4) MC+ VEGFA+ TH (n=12, 6 trasplantes). Igual que el grupo 1 de trasplante, pero con la administración de VEGFA recombinante por vía intravenosa tras la MC a la misma concentración que en la perfusión *ex vivo* (5µg/Kg).

### Recogida de muestras y determinaciones

Para este protocolo, se monitorizó la supervivencia de las ratas receptoras, anotando el momento de defunción de éstas durante 2 semanas, que fue el tiempo máximo de seguimiento del estudio. No se recogieron muestras debido a la baja supervivencia cuando injertos hepáticos con ALD procedentes de muerte cerebral se someten a 24 horas de isquemia fría. En tales condiciones, no se pueden cumplir nuestros objetivos que son estudiar a través de qué mecanismos están ejerciendo su acción los factores de crecimiento GH, VEGFA y VEGFB. Por tal motivo, hemos trabajado con dos modelos experimentales de trasplante hepático (*ex vivo* e *in vivo*). Además, hay que destacar el interés de trabajar con un modelo de hígado perfundido aislado como se ha realizado en la presente tesis. Esto es debido a lo siguiente: en la máquina de perfusión hepática *ex vivo* se tiene al injerto hepático aislado de la influencia del resto de órganos después de ser extraído de donantes procedentes de muerte cerebral en presencia de ALD y tras ser sometido a 24 horas de isquemia fría. Esto nos permite evaluar cómo responde el hígado por sí mismo cuando las estrategias farmacológicas se aplican en el donante, qué ocurre durante el proceso de isquemia fría e investigar qué mecanismos son capaces de desencadenarse en el hígado en tales condiciones (aislado) y sin tener presente el eje intestino-hígado ni el eje tejido adiposo-hígado, tan relevantes en el trasplante hepático procedente de donantes con muerte cerebral.

## Técnicas

### Determinaciones bioquímicas

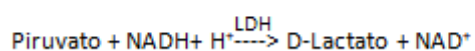
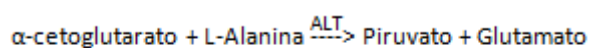
#### *Transaminasas*

Las transaminasas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) son enzimas encargadas de catalizar la transferencia de grupos amino entre metabolitos, permitiendo la conversión de ácidos  $\alpha$ -ceto en aminoácidos. Estas transaminasas se encuentran ampliamente expresadas en el hígado. Un aumento de esas proteínas en plasma se relaciona con necrosis en el tejido hepático.

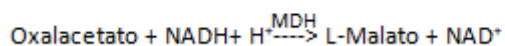
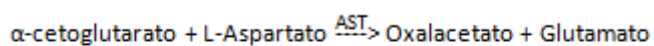
La actividad de estas enzimas se determinó utilizando un kit comercial (ALT: GNV41125 y AST: GNV40125 de RAL, Barcelona, España) a partir de ensayos enzimáticos que miden la desaparición de NADH por espectrofotometría, siguiendo una cinética decreciente a 365 nm.

Las reacciones que se producen son:

En el caso del ALT:



En el caso del AST:



Por lo tanto, si hay una cantidad mayor de transaminasas, la disminución de los niveles de NADH será mayor.

Los niveles de transaminasas se midieron en plasma y perfusato.

#### *Determinación de proteínas totales*

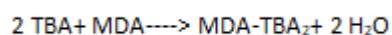
Para poder ajustar las determinaciones que se realizaron a partir de homogenados de tejido hepático, adiposo e intestino, se cuantificó la concentración de proteínas totales. Esta cuantificación se llevó a cabo utilizando el método colorimétrico de Bradford, empleando un reactivo comercial de Biorad (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, BioRad, Richmond, CA, Estados Unidos).

Este ensayo se basa en la interacción entre las proteínas que hay en la muestra y una solución ácida de colorante azul de Coomassie. La concentración de proteínas es directamente proporcional a la absorbancia que se observa cuando se mide por espectrofotometría a 595 nm. En otras palabras, una mayor intensidad de coloración azul indica una mayor cantidad de proteínas en la muestra. Como estándar, se realiza una recta patrón a partir de una solución de albúmina de suero bovino (BSA, por su nombre en inglés bovine serum albumin).

### *Malondialdehído*

El malondialdehído (MDA) es un producto de la peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados. Se utilizó como marcador indirecto de estrés oxidativo celular causado por la actividad de especies reactivas de oxígeno.

Para determinar la cantidad de MDA de las muestras, se aprovechó la capacidad del MDA de unirse al ácido tiobarbitúrico (TBA, por su nombre en inglés thiobarbituric acid) en medio ácido a temperaturas elevadas, dando lugar a un complejo de color rosa que se puede cuantificar por espectrofotometría (Gulfo et al. 2020).



Para poder determinar la cantidad de MDA, una vez se obtiene tejido congelado, se separó una porción de tejido y se homogeneizó en 2 mL de tampón Tris Base 0,1 M a pH= 7. Posteriormente, se determinaron las proteínas totales del homogenado siguiendo el protocolo previamente descrito. A 250 µL del homogenado se le añadieron 250 µL de ácido tricloroacético (TCA, por su nombre en inglés trichloroacetic acid) al 40%, el cual es utilizado para precipitar proteínas. Esta mezcla se agitó en un vórtex y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se mezcló con 250 µL de TBA al 0,67%. Para que la reacción se llevara a cabo, se llevó la mezcla a ebullición durante 15 minutos, dando lugar a una coloración rosada, la cual era proporcional a la cantidad de MDA de las muestras.

Para elaborar la recta estándar, se preparó una solución estándar de MDA disolviendo 120 µL de 1, 1, 3, 3- tetraetoxipropano (T9889, Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) en 50 mL de HCl 1M. Posteriormente, la solución se calentó 1 hora a 50°C y se guardó a 4°C hasta el siguiente día.

Tanto las muestras como el estándar siguieron el mismo procedimiento. Tras dejar enfriar, se hizo una lectura en el espectrofotómetro de la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm para determinar la intensidad de coloración rosada de las muestras, directamente proporcional a los niveles de MDA.

### *Mieloperoxidasa*

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima peroxidasa que se expresa de manera considerable en neutrófilos, almacenada en los gránulos azurófilos, motivo por el que se emplea esta proteína para analizar la infiltración y actividad de estas células en el tejido hepático cuando hay inflamación.

Para determinar la actividad de la MPO, primeramente, se homogeneizaron las muestras en un tampón de fosfato de potasio (0,05M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH= 6), al cual se añadió 0,5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB). Posteriormente, se sonicaron estas muestras durante 30 segundos a 20% de potencia. Tras pasar por tres ciclos de congelación y descongelación en hielo seco y agua, respectivamente, las muestras se incubaron a 60°C durante 2 horas, para poder eliminar la actividad de peroxidasas no específicas e inhibidores de MPO que pudieran afectar a la determinación. Tras las 2 horas, las muestras se centrifugaron durante 12 minutos a 4000 g a 4°C, recuperando el sobrenadante. Luego, se añadieron 10 µL de reactivo de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 5 mg TMB/mL DMSO a 10 µL del sobrenadante. A tiempo 0 se añadieron 70 µL de tampón fosfato (8mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH= 5,4) con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,05% y se determinó la cinética de la actividad del MPO, midiendo la absorbancia durante 10 minutos cada minuto a una longitud de onda de 630 nm en un espectrofotómetro. Para el análisis posterior, se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima que produce un aumento de una unidad de absorbancia por minuto.

### *Ensayos enzimáticos*

Para realizar los ensayos enzimáticos, las muestras de tejido hepático, adiposo e intestino fueron homogeneizadas en tampón fosfato salino (PBS) 1X a pH=7, usando un homogeneizador Polytron durante 60 segundos. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 5000g a 4°C durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas totales como se describió previamente (página 59). Finalmente, se almacenaron las muestras a -80°C.

### *Marcadores inflamatorios*

Además de evaluar la MPO como marcador de inflamación e infiltración de neutrófilos en el tejido hepático, se analizaron los niveles de IL1β y de IL10 mediante ensayos inmunoenzimáticos (o ELISAs) para observar los posibles cambios en la inflamación.

En el ensayo inmunoenzimático en forma de “sándwich”, los pocillos de la placa se recubren con anticuerpos específicos para la proteína de interés. Al añadir muestras y concentraciones estándares de proteína, estas se unen a los anticuerpos inmovilizados. Posteriormente, se une

un anticuerpo biotinilado específico que contiene una enzima, que se unirá a la proteína de la muestra, formando un tipo de “sándwich” junto al anticuerpo inmovilizado. Después, se añade un conjugado avidina-peroxidasa de rábano (HRP, por su nombre en inglés horseradish peroxidase), que se unirá al anticuerpo biotinilado por la interacción entre la biotina y la avidina. Seguidamente, se añade una solución que contiene el sustrato, que dará una coloración, en este caso azulada, proporcional a la cantidad de proteína que se encuentra en la muestra. Finalmente, se para la reacción con una solución de *Stop*, que hace que el color cambie a amarillo, permitiendo averiguar la concentración de la proteína de interés al leer la placa a 450 nm en un espectrofotómetro.

### IL1 $\beta$

La interleucina 1 beta es una citoquina proinflamatoria. Forma parte de la familia de las proteínas interleucina 1. Al ser una mediadora de la respuesta inflamatoria, estando relacionada con varios procesos relacionados con proliferación, diferenciación celular o muerte, se utiliza como marcador proinflamatorio.

Se realizó un ensayo inmunoenzimático (ab100768 de Abcam, Cambridge, Reino Unido) en hígado para averiguar los niveles de IL1 $\beta$  de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### IL10

La interleucina 10 es una citoquina antiinflamatoria. Es una proteína con múltiples efectos a nivel sistémico, entre los que se encuentra la supresión de la actividad de NF- $\kappa$ B o la inhibición de la secreción de diversas citoquinas proinflamatorias. La cuantificación de los niveles de IL10 sirve para determinar, de forma contraria a IL-1  $\beta$ , si existe o no una correlación inversa entre inflamación y niveles de IL10.

Se realizó un ensayo inmunoenzimático (E-EL-R0016 de Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Wuhan, China) en hígado para averiguar los niveles de IL10 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Marcadores de daño celular

Para determinar el daño celular, además de analizar los niveles de transaminasas, se hicieron otros ensayos enzimáticos para determinar la muerte celular por apoptosis (caspasas 3 y 8) y funcionalidad hepática (niveles de bilirrubina).

Para las caspasas 3 y 8, se realizó un ensayo colorimétrico. Este ensayo se basa en la detección a través de la absorbancia de un reactivo que cambia de color en función de la cantidad de un analito concreto.

Para la bilirrubina, se empleó un ELISA competitivo. En este caso, a diferencia de en el ELISA de tipo sándwich, hay una competencia entre el antígeno de referencia que se encuentra fijado a la placa y el que se encuentra en la propia muestra. Por lo tanto, a la hora de obtener la concentración de bilirrubina de la muestra, esta será inversamente proporcional a la intensidad de color observada.

### Caspasa 3

La caspasa 3 (C3) es una proteína que forma parte de la familia de las caspasas. La caspasa 3 es una caspasa efectora, teniendo un papel central en la apoptosis celular. Por este motivo, la cuantificación de la actividad de la caspasa 3 se utiliza como marcador de apoptosis.

Se realizó un ensayo colorimétrico (ab39401 de Abcam, Cambridge, Reino Unido) en hígado para averiguar los niveles de C3 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Caspasa 8

La caspasa 8 (C8) forma parte de la misma familia que la caspasa 3. A diferencia de la caspasa 3, esta proteína no forma parte de las caspasas ejecutoras de la apoptosis, sino que participa en la iniciación de este proceso de muerte celular, actuando a través de la caspasa 3.

Se realizó un ensayo colorimétrico (ab39700 de Abcam, Cambridge, Reino Unido) en hígado para averiguar los niveles de C8 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Bilirrubina

La bilirrubina es una proteína que se forma a partir del proceso de degradación de la hemoglobina. Posteriormente, el hígado la conjuga para ayudar a su eliminación. Los niveles de bilirrubina elevados los utilizamos como marcador de una disminución de la función hepática o de un mayor daño en el órgano.

Se realizó un ensayo inmunoenzimático (MBS730053 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos) en plasma para averiguar los niveles de bilirrubina de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Marcadores de regeneración

La regeneración hepática, especialmente en el caso de una cirugía mayor hepática, como son la hepatectomía parcial y el trasplante hepático, es un factor relevante para estudiar el efecto de una intervención y su modulación en unas condiciones determinadas, ya que tras estas cirugías es necesario que el hígado pueda recuperar su funcionalidad lo antes posible. A nivel de determinaciones bioquímicas, se realizaron ensayos inmunoenzimáticos de Ki67.

## Ki67

El antígeno Ki67 es una proteína que se encuentra aumentada en células que se encuentran proliferando. Por este motivo, se analizaron los niveles de Ki67 en hígado mediante un ensayo inmunoenzimático (MBS705024 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## Marcadores de actividad metabólica

El hígado es un órgano metabólicamente demandante, al ejercer una variedad de funciones vitales en el organismo. Es importante, por lo tanto, la capacidad de obtener y mantener la energía suficiente para que se puedan desarrollar sus funciones. Además, tras una cirugía mayor hepática, a las funciones previamente mencionadas se añaden la necesidad de recuperar el tejido dañado, hecho que requiere de un mayor aporte energético.

Por lo tanto, se analizaron los niveles de ATP y de lactato, para averiguar los niveles de energía del hígado y si esta podía deberse en mayor o menor medida al metabolismo anaeróbico.

## ATP

El ATP es un nucleótido que se reconoce como la unidad básica energía celular. Por este motivo, se analizaron sus niveles en hígado a partir de un ensayo inmunoenzimático (MBS166244 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## Lactato

El lactato se emplea como un producto del metabolismo anaeróbico, al obtenerse del piruvato a través de la enzima lactato deshidrogenasa. Por lo tanto, el análisis de sus niveles en hígado se utilizó para determinar si la vía anaeróbica de obtención de energía se encontraba aumentada o disminuida según ciertas condiciones.

Se realizó un ensayo inmunoenzimático (E-BB-K044-S de Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Wuhan, China) en hígado para averiguar los niveles de lactato de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## Vías de señalización

Con la finalidad de averiguar las posibles alteraciones en vías de señalización debido a las enfermedades o condiciones quirúrgicas estudiadas, además de su posible modulación debido a los tratamientos realizados, se estudiaron los niveles de diversas proteínas en hígado, tejido adiposo, intestino y plasma.

## VEGFA

El VEGFA es una proteína de la familia de los VEGF. Es uno de los principales factores angiogénicos, relacionado con proliferación y migración de células endoteliales. Además, se ha reportado que puede estar relacionado con la proliferación y supervivencia celular en diferentes tejidos. Por este motivo, se analizaron los niveles de VEGFA en hígado, intestino y tejido adiposo.

Se realizaron ensayos inmunoenzimáticos (E-EL-R2603 de Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Wuhan, China) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para averiguar los niveles de VEGFA en las distintas condiciones propuestas en la presente Tesis Doctoral.

## VEGFB

El VEGFB forma parte, junto a VEGFA, de la familia de los VEGF. A diferencia de VEGFA, no se ha reportado una relación directa entre VEGFB y la angiogénesis. No obstante, varios estudios han indicado su importancia en diferentes tejidos, especialmente en corazón, para la supervivencia celular en procesos patológicos relacionados con la isquemia. Por lo tanto, se analizaron los niveles de VEGFB en hígado, intestino y tejido adiposo.

Se realizaron ensayos inmunoenzimáticos (MBS269676 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para averiguar los niveles de VEGFB en las distintas condiciones propuestas en la presente Tesis Doctoral.

## GH

La GH es una hormona peptídica que participa en varios procesos del cuerpo humano, como son la homeostasis, la regulación del sistema inmune y la regeneración y proliferación celular de diversos tejidos, entre los que se encuentra el hígado. Por este motivo, se decidió estudiar su concentración y su regulación en hígado.

Para cuantificar la cantidad de GH, se realizaron ensayos inmunoenzimáticos (E-EL-R3003 de Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Wuhan, China) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## sFLT1

El sFLT1 pertenece a la familia de receptores de VEGF. Como se ha mencionado previamente, sFLT1 actúa como un inhibidor de la actividad de VEGFA, al unirse al mismo sin permitirle llegar a los tejidos para ejercer su función. Por este motivo, se estudiaron sus niveles en plasma.

Se realizó un ensayo inmunoenzimático (MBS732055 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos) en plasma para cuantificar los niveles de sFLT1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## ID1

La ID1 forma parte de la familia de proteínas inhibidoras de la unión/diferenciación del ADN (ID, por su nombre en inglés inhibitor of DNA-binding/differentiation proteins). Como se ha indicado previamente, se ha reportado su papel en la vía de señalización de VEGFA/VEGFR2 en la regeneración hepática por su actividad sobre Wnt2 tras una hepatectomía parcial. Por lo tanto, se realizó un ensayo inmunoenzimático (MBS1604796 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos) para cuantificar sus niveles en hígado.

## WNT2

Las vías de señalización en las que participa la proteína Wnt2 están relacionadas con proliferación y migración celular, entre otros efectos, hecho por lo cual se han asociado a distintos tipos de cáncer. Se ha reportado que puede estar relacionada también con la vía de señalización de VEGFA/VEGFR2, teniendo un papel en la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial. Por este motivo, se ha cuantificado mediante un ensayo inmunoenzimático (MBS8807293 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos) sus niveles en hígado.

## PI3K:

Las Pi3k son una familia de enzimas relacionadas con un gran conjunto de funciones, entre los que se encuentran la supervivencia y la proliferación celular. En el hígado, se ha reportado su papel junto a Akt para inducir la regeneración hepática. Por este motivo, se ha cuantificado su expresión en el citado tejido mediante un ensayo inmunoenzimático (CSB-E08418r de Cusabio, Wuhan, China).

## AKT

La proteína Akt (también llamada Akt1 o Pkb) forma parte de la familia de enzimas serina/treonina proteína quinasas. Se activa por proteínas como Pi3k, y desarrolla funciones como la proliferación o la inhibición de la apoptosis. Por este motivo, se ha querido cuantificar sus niveles en distintas condiciones en el hígado mediante un ensayo inmunoenzimático (MBS761144 de MyBioSource, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos).

## Técnicas de biología molecular e histoquímica

### *PCR a tiempo real (qPCR)*

Para poder cuantificar de manera semicuantitativa los niveles ARNm de los diversos genes en las muestras hepáticas e intestinales pertinentes, se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas (qPCRs, por su nombre en inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*).

El protocolo que se empleó para poder cumplir con esta finalidad fue el siguiente:

En primer lugar, se tuvo que realizar la extracción y la cuantificación del ácido ribonucleico (ARN) total. El ARN fue aislado a partir de trozos de hígado e intestino de rata utilizando Trizol (15596026 de Invitrogen, Madrid, España) siguiendo con las especificaciones del fabricante. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de ARN total utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000.

En segundo lugar, se retrotranscribieron 2 µg de ARN utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (4374966 de ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para obtener el ADN complementario (ADNc).

Finalmente, se realizó la PCR a tiempo real mediante un sistema de detección ABI PRISM 7900 HT utilizando 10µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (4304437 de ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), en una mezcla final de 20µL, en la que había 100 ng de ADNc.

Se utilizaron sondas específicas preconfiguradas bajo demanda de Taqman para estudiar los genes de interés (Rn01511602\_m1 para VEGFA, Rn01454585\_g1 para VEGFB y Rn00667869\_m1 para β actina de ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). La β actina fue usada como control endógeno.

Para realizar la cuantificación relativa de ARNm, se utilizó el método  $\Delta\Delta Ct$ . Los datos fueron obtenidos comparando con la expresión del ARN mensajero en una rata sin intervención quirúrgica.

### *Estudios histológicos*

Como se ha dicho previamente, una parte del tejido hepático fue separada para realizar los estudios histológicos y se fijó en paraformaldehído al 4%. Posteriormente, las muestras se pasaron a PBS 1X y se realizaron cortes con un micrótopo de entre 3 y 5µm, desparafinando posteriormente con xilol y rehidratando con soluciones de etanol a diferentes concentraciones

para poder seguir con los diferentes procedimientos histológicos. En el caso del *Oil Red O*, no obstante, no se realizó la fijación en paraformaldehído, sino que se colocó una porción de tejido hepático en un casete de inclusión, se añadió O.C.T y se guardó a -80°C.

### Hematoxilina y Eosina

Para evaluar la estructura del tejido hepático y su afectación en los diferentes grupos estudiados, se utilizó la tinción de Hematoxilina y Eosina, realizada siguiendo protocolos convencionales (Cardiff, Miller, and Munn 2014).

Además, esta tinción fue utilizada para evaluar la severidad de la lesión hepática de la forma siguiente: grado 0, si había signos mínimos o no había signos de lesión; grado 1, si se encontraba una lesión leve, caracterizada por vacuolización citoplasmática y picnosis nuclear localizada; grado 2, indicando una lesión de moderada a severa, con picnosis nuclear generalizada, aumento de eosinofilia citoplasmática y disrupción de los límites entre células; y grado 3, con una necrosis severa acompañada de una desintegración de cordones hepáticos, hemorragia e infiltración de neutrófilos (Alfany-Fernandez et al. 2009).

### Sirius Red

Tras fijar las muestras en parafina, algunas de ellas fueron teñidas en *Sirius Red* siguiendo protocolos convencionales (Segnani et al. 2015). Al unirse este colorante al colágeno, permite distinguir si hay fibrosis hepática.

### TUNEL

El TUNEL es una técnica histoquímica que permite observar la apoptosis a partir de la fragmentación del ADN. Para realizar el TUNEL, se utilizó un kit comercial (ab206386 de Abcam, Cambridge, Reino Unido) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

### PCNA

El PCNA es una proteína necesaria para la progresión del ciclo celular y forma parte de la maquinaria encargada de la replicación del ADN. Por lo tanto, se observaron los niveles de PCNA por inmunohistoquímica para averiguar si había un aumento o disminución de la proliferación celular en los diversos tejidos hepáticos.

Para ello, se utilizó un anticuerpo primario anti-PCNA (M0879 de Dako, Glostrup, Dinamarca). Posteriormente, se utilizó un kit para la detección del anticuerpo primario (Dako EnVision + System-HRP DAB For Use With Mouse Primary Antibodies K4007, Dako, Glostrup, Dinamarca). Mediante este sistema, se pudo detectar el PCNA al observar coloración marrón. Además, se utilizó hematoxilina como tinción de contraste.

### Oil Red O

Para evaluar el grado de esteatosis a partir de la tinción de *Oil Red O*, una porción de tejido hepático fue separada y colocada en un casete de inclusión con O.C.T, como se ha mencionado previamente, congelando posteriormente a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para poder realizar los análisis con la tinción de *Oil Red O* de acuerdo a procedimientos convencionales (Du et al. 2023).

Esta tinción permitió evaluar el grado de esteatosis hepática, debido a que este colorante marca los lípidos del tejido.

### Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Graphpad Prism 10.0.2 para Windows (Graphpad Software, San Diego, California, Estados Unidos). Los resultados se expresan según la media  $\pm$  el error estándar de la media. Se empleó el test ANOVA para determinar si había diferencia entre los diversos grupos. Si la prueba mostraba diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), se realizó un test Tukey posterior. Para comparaciones entre dos grupos, se empleó la T de Student. Los resultados se consideraron significativos a partir de un p valor  $< 0.05$ . Para los análisis de la supervivencia, se empleó el estimador de Kaplan-Meier, y se consideró como diferencia significativa entre los grupos un p valor  $< 0.05$ .

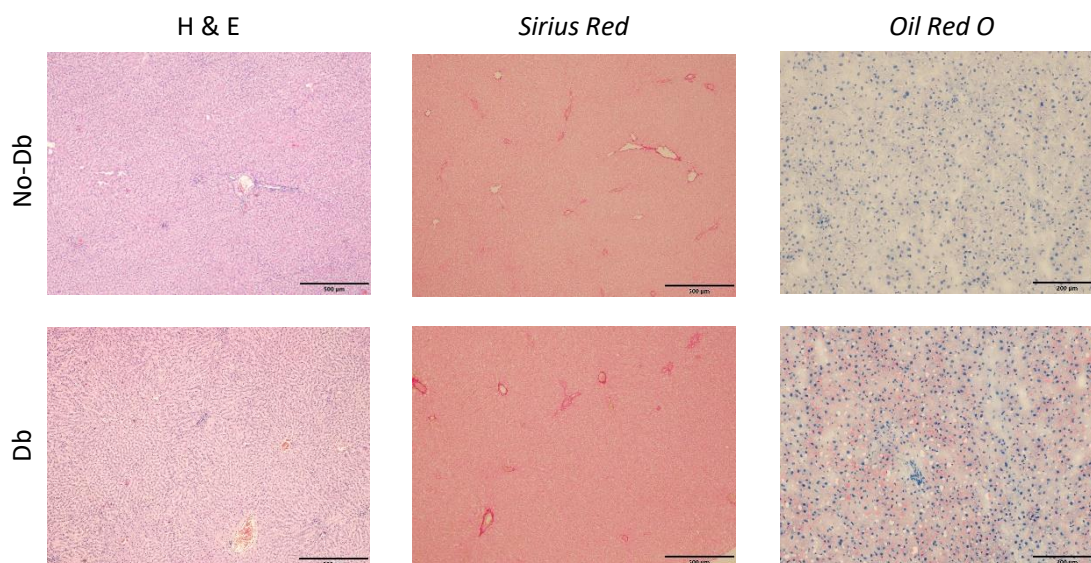
## Resultados

### Caracterización del hígado en un modelo preclínico de diabetes de tipo 2 y supervivencia tras un procedimiento de hepatectomía parcial bajo oclusión vascular

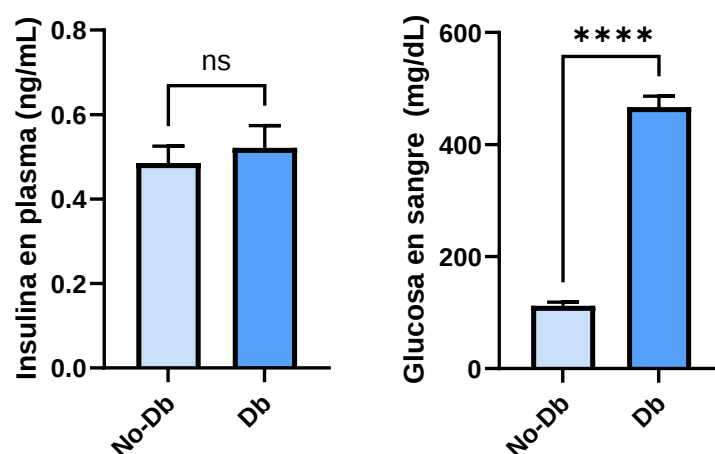
Por primera vez, se ha establecido un modelo preclínico de diabetes de tipo 2 en ratas con hepatectomía parcial bajo oclusión vascular. Además, este modelo de diabetes de tipo 2 cursa con hiperglicemia y sin hiperinsulinemia, de la misma forma que se había reportado previamente (Holmes et al. 2015). En el modelo que hemos puesto a punto y estandarizado, se ha observado una severa esteatosis a través de la tinción por *Oil Red O*. No obstante, no se observaron signos de daño considerable a través de la tinción por hematoxilina y eosina (H&E) ni signos de fibrosis, determinada a través de la tinción por *Sirius Red*. Las imágenes y figuras se reflejan en la Figura 9.

Para observar si la T2DM es un factor de riesgo en la resección hepática bajo oclusión vascular, se realizaron hepatectomías parciales a un grupo de ratas con T2DM. Como control, se utilizaron ratas sanas sin T2DM. Tras la hepatectomía parcial bajo oclusión vascular, todas las ratas con la enfermedad murieron durante las primeras 30 horas y, además, a diferente tiempo entre los individuos, mientras que en el caso de cirugías de ratas no diabéticas la supervivencia durante este tiempo fue del 80%, similar a resultados reportados previamente (Cornide-Petronio et al. 2017). Esto indica que la T2DM es un factor de riesgo de especial relevancia para la cirugía.

### A) Histología



### B) Concentración de insulina y glucosa

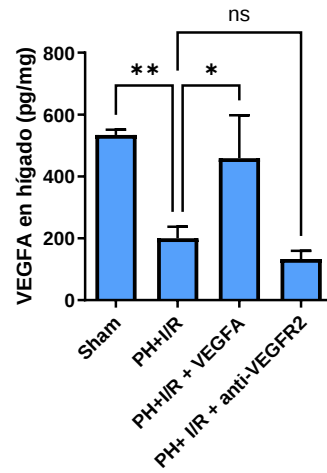


**Figura 9.** Histología de secciones de hígado y caracterización del modelo de T2DM. A) Imágenes de tinción por H&E a 4X para observar diferencias histológicas entre ratas Db y No-Db. Tinción por *Sirius Red* a 4X para detectar fibrosis por el marcaje en rojo de las fibras de colágeno de tipo 1. Tinción por *Oil Red O* para detectar el marcaje en rojo de depósitos lipídicos a 10X. B) Gráficos de concentración de insulina y glucosa en plasma y sangre. \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ .

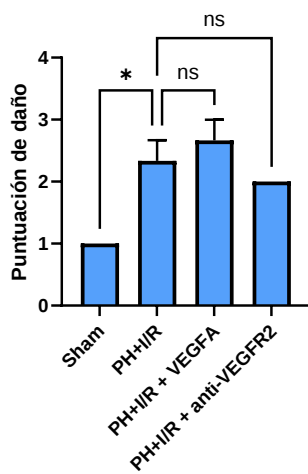
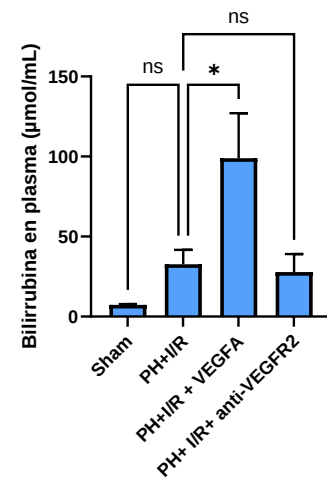
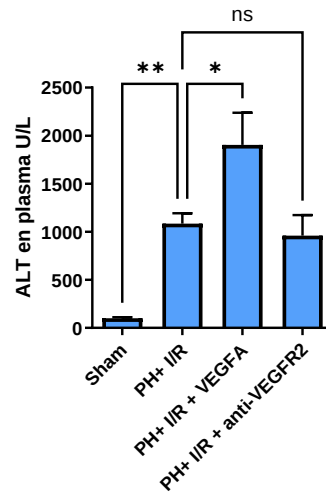
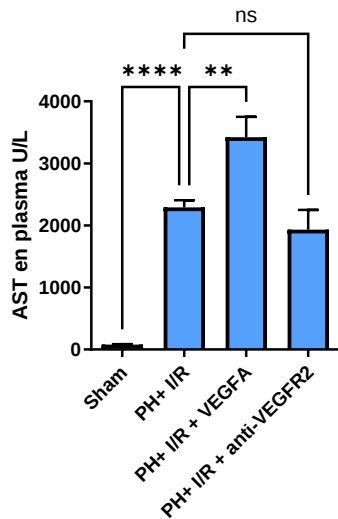
## **Estudio del efecto de la modulación de la familia de factores de crecimiento VEGF en ratas con diabetes de tipo 2 tras un procedimiento de hepatectomía parcial bajo oclusión vascular**

Para observar el efecto del VEGFA en PH+IR en ratas con T2DM, se analizaron los niveles de VEGFA en hígado. Como control, se utilizaron ratas *Sham* (sin cirugía). Los niveles de VEGFA disminuyeron tras la cirugía (grupo PH+I/R) respecto a las ratas *Sham* (Figura 10A). Posteriormente, se administró VEGFA antes de la cirugía (grupo PH+I/R+VEGFA). Esto provocó un aumento del factor de crecimiento en el hígado (grupo PH+I/R+VEGFA), como se puede observar en los niveles de VEGFA hepáticos del grupo respecto al grupo sin su administración (grupo PH+I/R). Por otra parte, administrar el inhibidor de VEGFR2 (grupo anti-VEGFR2), el cual, como se ha reportado previamente, es el ligando de VEGFA por el que desarrolla su actividad biológica, no indujo cambios en los niveles de VEGFA comparando con el grupo PH+I/R.

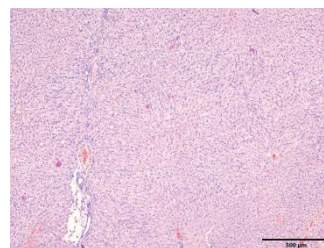
### A) Concentración de la proteína de VEGFA



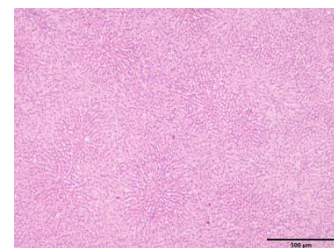
### B) Daño hepático tras la PH+I/R (AST, ALT, bilirrubina, puntuación de daño)



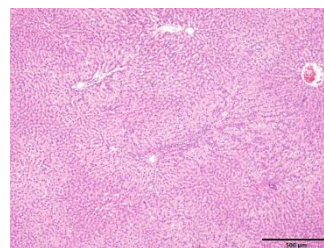
Sham



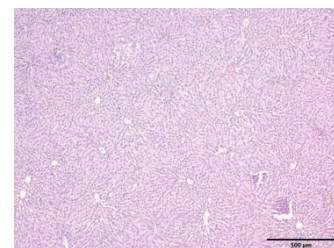
PH+ I/R



PH+ I/R+ VEGFA



PH+ I/R + anti-VEGFR2



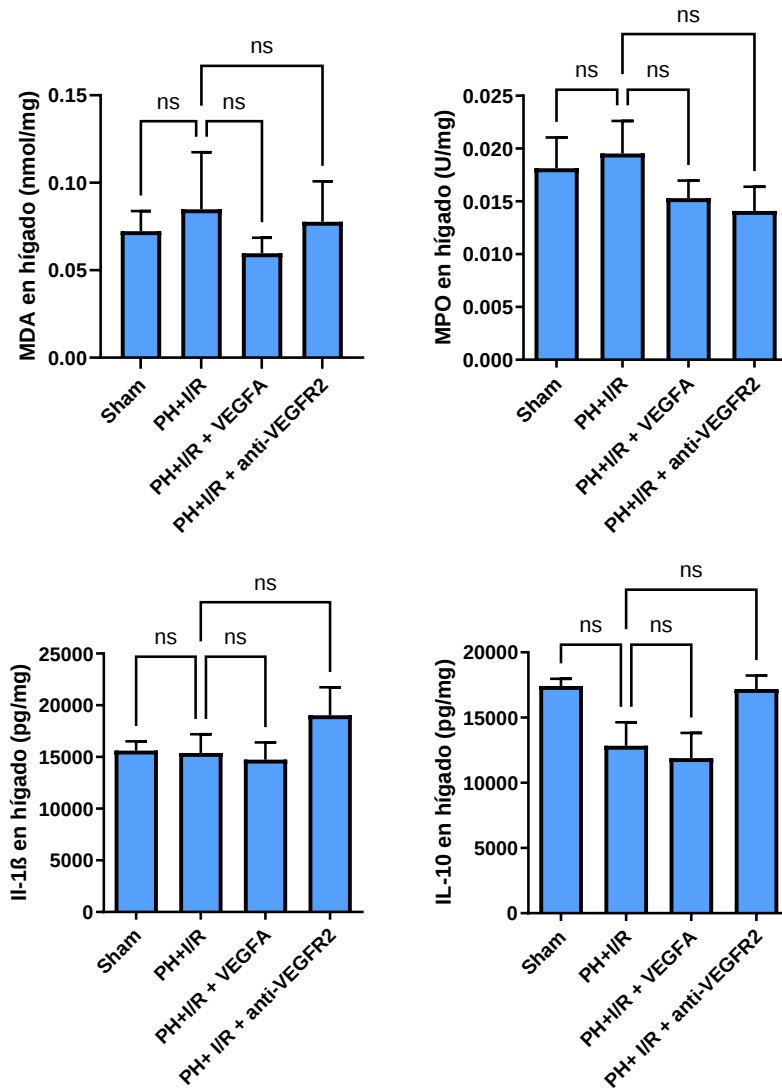
**Figura 10.** *Proteína de VEGFA en hígado y daño hepático en ratas con T2DM sometidas a PH+I/R.* A) Concentración de VEGFA en hígado. B) Daño hepático tras el procedimiento de PH+I/R, observado por AST, ALT y bilirrubina en plasma y tinción por H&E de secciones de hígado a 4X. \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$

Posteriormente, se analizaron los efectos de los cambios en los niveles de VEGFA inducidos por la PH+I/R en el daño y la regeneración hepática.

Respecto al daño hepático, se observó un aumento de este en el grupo PH+I/R+VEGFA con respecto al grupo PH+I/R, al observarse un incremento significativo de AST y ALT, relacionadas con la necrosis, y niveles elevados de bilirrubina, utilizada como marcador de funcionalidad hepática (Figura 10B). Los resultados bioquímicos que indicaban que la administración de VEGFA no mejoraba la lesión ni funcionalidad hepática al compararla con los resultados encontrados en PH+I/R estaban en consonancia con los resultados histológicos, ya que no se observaron mejoras en el grado de necrosis entre los grupos PH+I/R y PH+I/R+VEGFA. Posteriormente, se observó el efecto de la administración del antagonista de VEGFR2 (grupo PH+I/R+anti-VEGFR2). No se vieron diferencias en transaminasas ni en la histología entre los grupos PH+I/R y PH+I/R+anti-VEGFR2 (Figura 10B)

En consonancia con los resultados previamente mencionados, la modulación farmacológica de la acción del VEGFA (bien administrando VEGFA o inhibiendo su acción mediante la administración de anti-VEGFR2) no afectó a los parámetros inflamatorios si los comparamos con los resultados observados en PH+I/R. Tanto los niveles de MDA (índice de estrés oxidativo), los niveles de MPO (marcador de acumulación de neutrófilos) como la concentración de interleucinas pro y antiinflamatorias en el hígado (IL1 $\beta$  e IL10, respectivamente) no se vieron alterados cuando modulamos farmacológicamente la acción del VEGFA (grupos PH+I/R+VEGFA y PH+I/R+anti-VEGFR2) al compararlo con el grupo PH+I/R (Figura 11).

### Inflamación tras la PH+I/R (MDA, MPO, IL1- $\beta$ e IL-10)

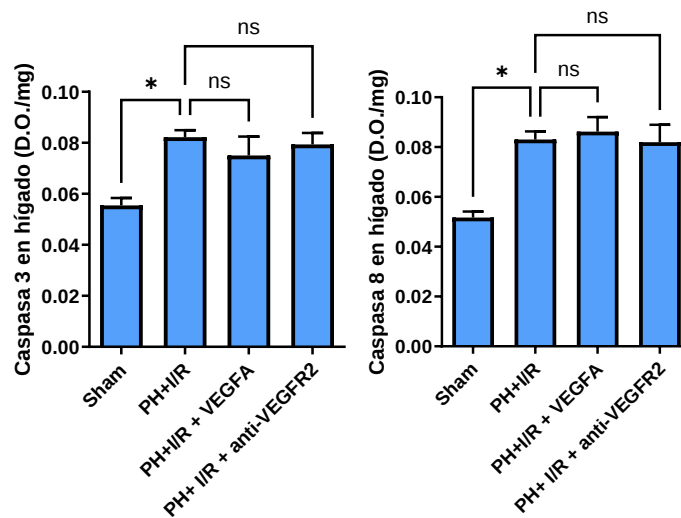


**Figura 11.** *Inflamación y estrés oxidativo tras la modulación de VEGFA.* Concentración en el hígado de MDA, MPO, IL1 $\beta$  e IL10 de ratas con T2DM sometidas a un procedimiento de PH+I/R.

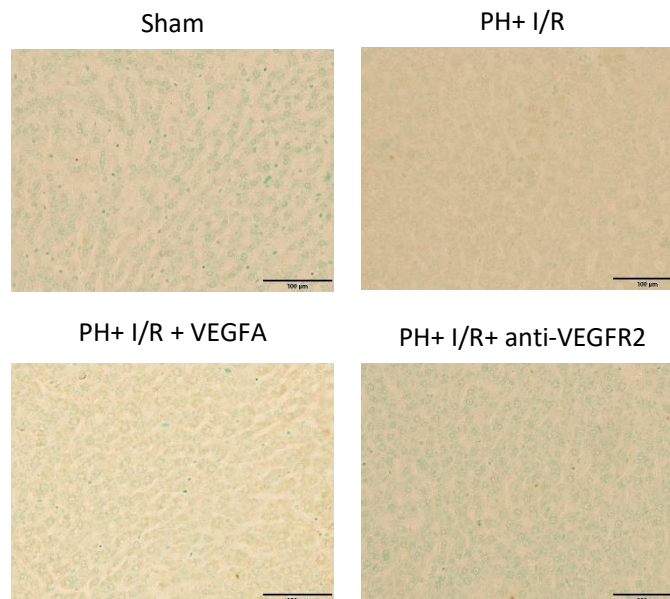
De la misma forma que se vio en los parámetros de lesión hepática por necrosis e inflamación (del mismo orden o, incluso, aumentados respecto al grupo de PH+I/R), la administración de VEGFA no disminuyó la muerte celular por apoptosis. De hecho, la actividad de las caspasas 3 y 8 (Figura 12A) y los resultados del TUNEL (Figura 12B) fueron similares a los del grupo PH+I/R. Además, no se observó un papel del VEGFA endógeno en la muerte celular por apoptosis, ya que la inhibición de su receptor (grupo PH+I/R+anti-VEGFR2), resultó en parámetros apoptóticos del mismo orden que aquellos encontrados en el grupo PH+I/R.

## Apoptosis tras la PH+ I/R

### A) Actividad de las caspasas tras la PH+I/R



### B) Tinción de TUNEL tras la PH+ I/R



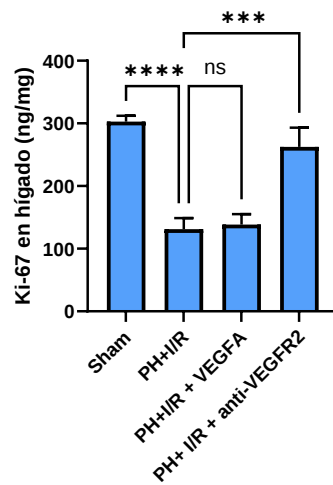
**Figura 12.** Apoptosis en ratas con T2DM tras la PH+I/R y la modulación de VEGFA. A) Actividad de las caspasas 3 y 8 en el hígado de ratas con T2DM sometidas a un procedimiento de PH+I/R. B) Tinción de TUNEL de secciones de hígado para detectar apoptosis. \*:  $p \leq 0.05$ .

Respecto a la regeneración hepática (evaluada por Ki67 y PCNA), se vio una disminución de ambos parámetros de regeneración hepática en el grupo PH+I/R respecto al grupo sin cirugía (grupo Sham) (Figura 13). Además, la administración de VEGFA (grupo PH+I/R+VEGFA) llevó a un fallo en la regeneración hepática de la misma forma que en el grupo PH+I/R, ya que los parámetros de regeneración eran del mismo orden entre los grupos PH+I/R y PH+I/R+VEGFA.

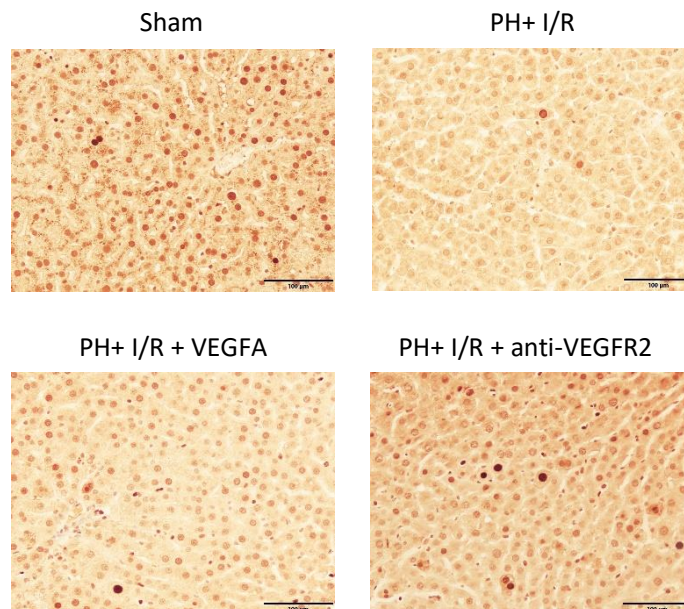
No obstante, la inhibición de la acción del VEGFA endógeno mediante la administración del inhibidor de VEGFR2 (grupo PH+I/R+anti-VEGFR2) mejoró estos parámetros. Este hecho se evidenció por un aumento de los niveles de Ki67 en hígado del grupo con el inhibidor y por un aumento del número de células positivas en PCNA (grupo PH+I/+anti-VEGFR2) cuando lo comparamos con el grupo PH+I/R.

## Regeneración hepática tras la PH+ I/R

### A) Niveles de Ki67 en hígado tras la PH+ I/R



### B) Tinción de PCNA tras la PH+ I/R

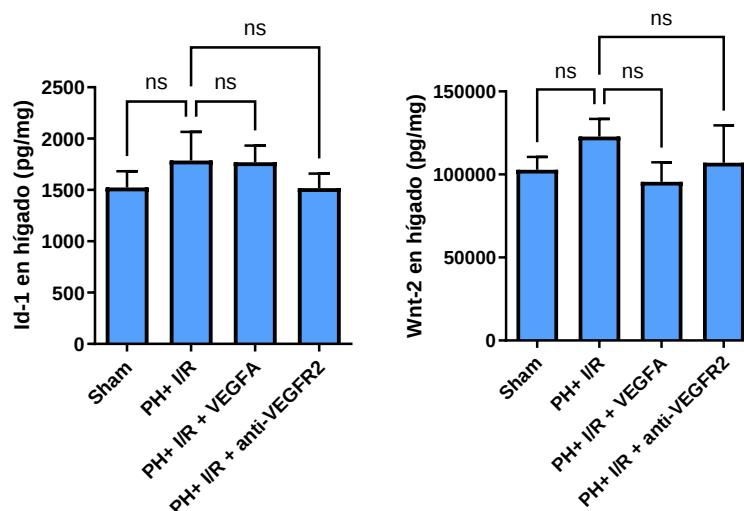


**Figura 13.** *Regeneración hepática en ratas con T2DM tras un procedimiento quirúrgico de PH+I/R y la modulación de VEGFA.* A) Concentración de la proteína Ki-67 en hígado. B) Detección por inmunohistoquímica de PCNA en secciones de hígado de ratas con T2DM tras un procedimiento de PH+I/R a 20X. \*\*\*:  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ .

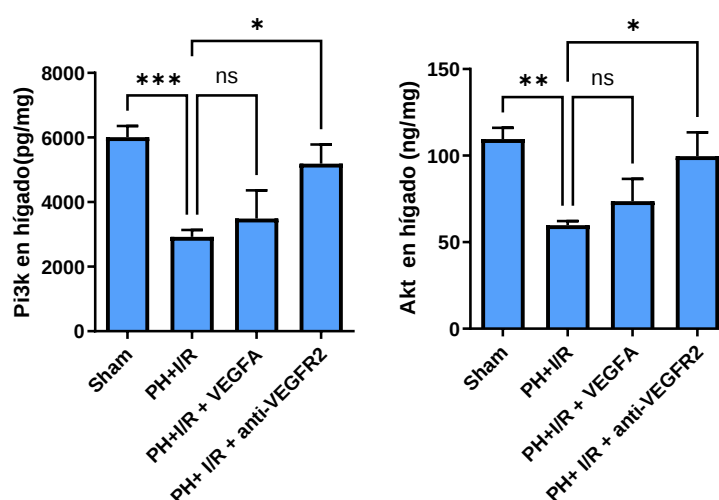
El siguiente paso fue observar si los efectos de VEGFA en el daño hepático y el fallo en la regeneración observados podían ser mediados por las vías  $Id1/Wnt2$  o  $Pi3k/Akt$ , vías de señalización relacionadas con la proliferación hepática y descritas como las principales vías de señalización de VEGFA, tanto en cirugía hepática como en líneas celulares (Bujaldon et al. 2019; Tsuchihashi et al. 2006; Chunyan Zhang et al. 2024). La administración de VEGFA exógeno o la administración del inhibidor de VEGFR2 no afectaron a la vía de  $Id1/Wnt2$ , al observarse niveles hepáticos de estas proteínas similares en los grupos PH+I/R+VEGFA y PH+I/R+anti-VEGFR2 en comparación al grupo PH+I/R (Figura 14). Al analizar los efectos de VEGFA sobre esta vía de señalización  $Pi3k$  y  $Akt$ , no se vieron alterados los niveles de tales proteínas en el grupo al que se añadió VEGFA (grupo PH+I/R+VEGFA) cuando lo comparamos con los resultados encontrados en el grupo PH+I/R, pero si se evidenció un aumento en los niveles de la vía de señalización  $Pi3k$  y  $Akt$  cuando se inhibió la acción del VEGFA endógeno (grupo PH+I/R+anti-VEGFR2).

## Vías de señalización de VEGFA en hígado tras la PH+I/R

### A) Vía de señalización de Id1/Wnt2 en hígado tras la PH+I/R



### B) Vía de señalización de Pi3k/Akt en hígado tras la PH+I/R



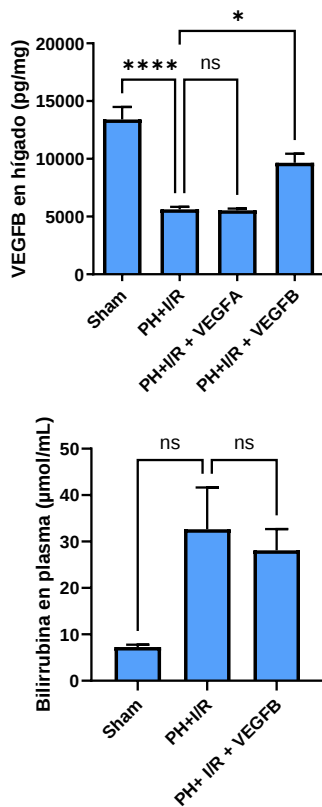
**Figura 14.** Vía de señalización de VEGFA en hígado tras un procedimiento de PH+I/R en ratas con T2DM tras la modulación con VEGFA. A) Concentración en el hígado de las proteínas Id1 y Wnt2. B) Concentración en el hígado de las proteínas Pi3k y Akt. \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0.001$ .

Estos resultados observados indican que la mejora en los parámetros de regeneración en el grupo con el inhibidor de la actividad del VEGFA endógeno (grupo PH+I/R+anti-VEGFR2) se asocia con un aumento en la expresión de la vía de Pi3k/Akt. De la misma forma, la disminución de la misma vía observada en el grupo PH+I/R con respecto al grupo Sham podría ser la explicación a los efectos nocivos de la cirugía sobre la regeneración hepática en ratas con T2DM. Finalmente, es importante comentar que los efectos adversos observados en el grupo PH+I/R+VEGFA con respecto al grupo PH+I/R no se deben a alteraciones de ninguna de las dos vías claves

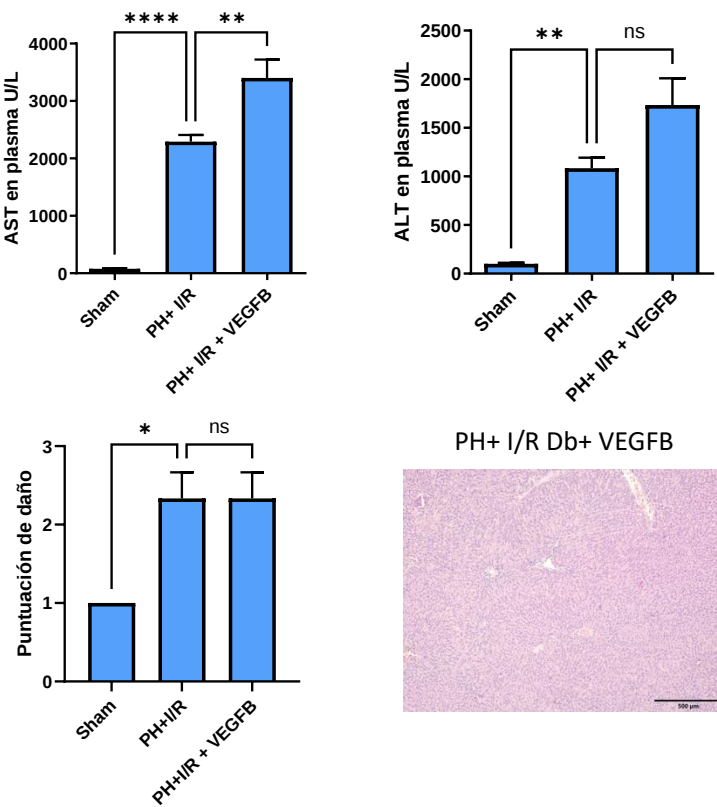
de señalización implicadas en el daño y la reparación celular, ya que el patrón que observamos en las vías de señalización Id1/Wnt2 y Pi3k/Akt en el grupo PH+I/R+VEGFA fue similar al observado en el grupo PH+I/R (Figura 14).

A continuación, se evaluó VEGFB y su papel en el hígado de ratas diabéticas sometido a cirugía hepática de PH bajo oclusión vascular, debido a la relación que se ha establecido entre los dos factores de crecimiento en varios estudios (Jin et al. 2018; Lv et al. 2018). Como se observa en la Figura 15A, se evidenció una disminución de los niveles de VEGFB en hígado de las ratas sometidas a la cirugía (grupo PH+I/R) comparando con los resultados del grupo *Sham*.

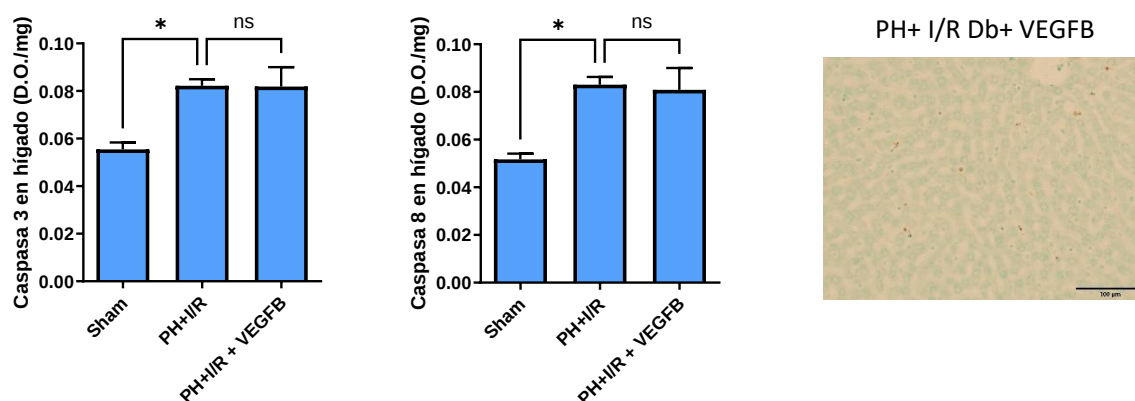
**A) Niveles de proteína de VEGFB tras la PH+ I/R**



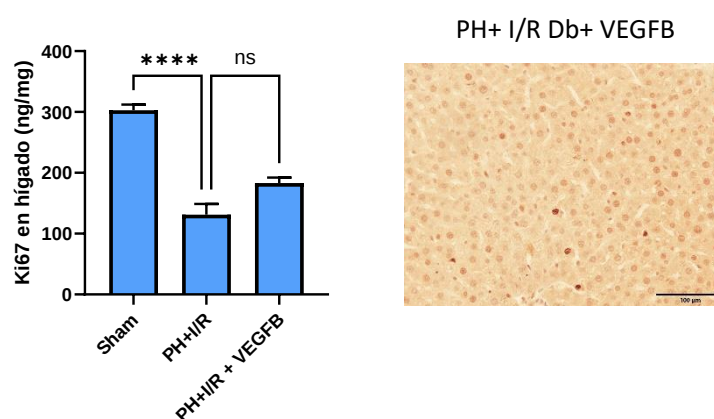
**B) Daño hepático (AST, ALT, bilirrubina, histología) tras la PH+I/R**



### C) Apoptosis (caspasas y TUNEL) en hígado tras la PH+I/R



### D) Regeneración hepática (Ki67 y PCNA) tras la PH+I/R



**Figura 15.** Concentración hepática de VEGFB tras la modulación de VEGFA y VEGFB, y efecto de la administración de VEGFB en ratas con T2DM tras un procedimiento de PH+I/R. A) Concentración de la proteína VEGFB en hígado. B) Daño hepático tras el procedimiento de PH+I/R determinado a partir de la concentración de AST, ALT y bilirrubina en plasma y tinción de H&E a 4X. C) Apoptosis: actividad de caspasa 3 y caspasa 8 en hígado y tinción de TUNEL en secciones hepáticas a 10X. D) Regeneración hepática: concentración de la proteína de Ki-67 en hígado y detección inmunohistoquímica de PCNA en secciones hepáticas a 20X. \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ .

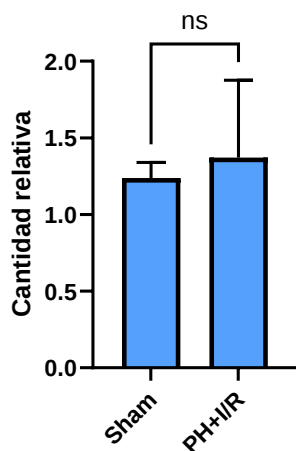
Además, la administración de VEGFB llegó al hígado, ya que se observaron niveles aumentados de VEGFB en el grupo PH+I/R+VEGFB con respecto al grupo PH+I/R. Finalmente, los efectos del VEGFA en la cirugía hepática de los hígados en presencia de diabetes no se pudo explicar con cambios en los niveles de VEGFB. De hecho, la administración de VEGFA (grupo PH+I/R+VEGFA) no indujo cambios en los niveles de VEGFB en hígado, ya que sus niveles no se vieron alterados.

De forma parecida a VEGFA, la administración de VEGFB provocó un aumento de parámetros relacionados con el daño hepático, hecho que se puede observar a través de un aumento significativo de AST y un aumento (aunque no significativo) en los niveles de ALT (Figura 15B), sin cambios en los niveles de bilirrubina. De la misma forma, que los resultados bioquímicos, no se observaron cambios en el daño por necrosis determinado a partir de la histología, siendo este similar entre los grupos PH+I/R y PH+I/R+VEGFB (Figura 15B).

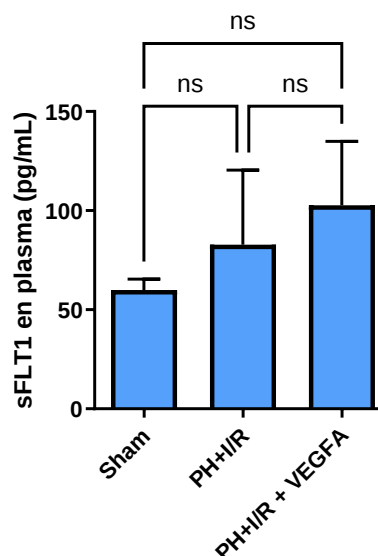
Tampoco se observaron diferencias en el grupo PH+I/R+VEGFB ni en los parámetros de apoptosis en el hígado ni en los de regeneración hepática con respecto a los encontrados en el grupo PH+I/R (Figura 15C y Figura 15D).

Por último, se evaluó si los cambios en los niveles de VEGFA y VEGFB observados en hígados sometidos a cirugía hepática en presencia de diabetes (grupo PH+I/R) con respecto al grupo *Sham* se debían a cambios en la síntesis en el hígado o a la contribución de tejidos extrahepáticos, especialmente tejido adiposo e intestino. Con respecto al VEGFA, se analizó el ARNm de VEGFA en el hígado tras la cirugía respecto al grupo *Sham*. Al no observar cambios en el ARNm en el grupo PH+I/R respecto al *Sham*, no se pudo demostrar que la reducción en VEGFA tras la cirugía se debiera a una menor síntesis de este (Figura 16A). Además, los niveles de la proteína de VEGFA no se vieron alterados en el intestino respecto al *Sham*. Por otra parte, se observó un aumento de la concentración de la proteína VEGFA en el tejido adiposo del grupo PH+I/R con respecto a los niveles encontrados en el grupo *Sham* (Figura 16C).

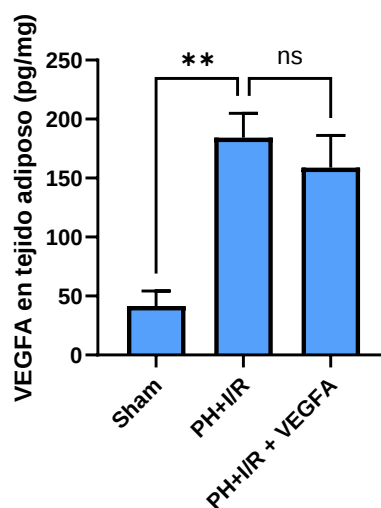
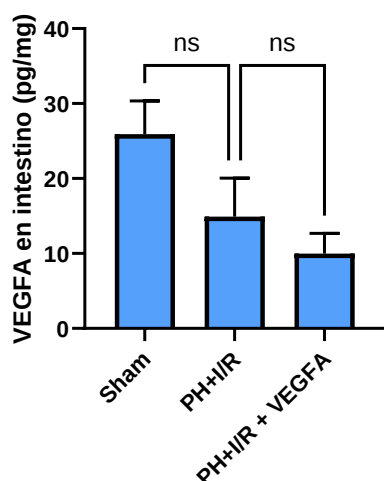
**A) Expresión del ARNm de VEGFA en hígado tras la PH+I/R**



**B) Concentración de la proteína sFLT1 en plasma tras la PH+I/R**



**C) Concentración de la proteína VEGFA en intestino y tejido adiposo tras la PH+I/R**



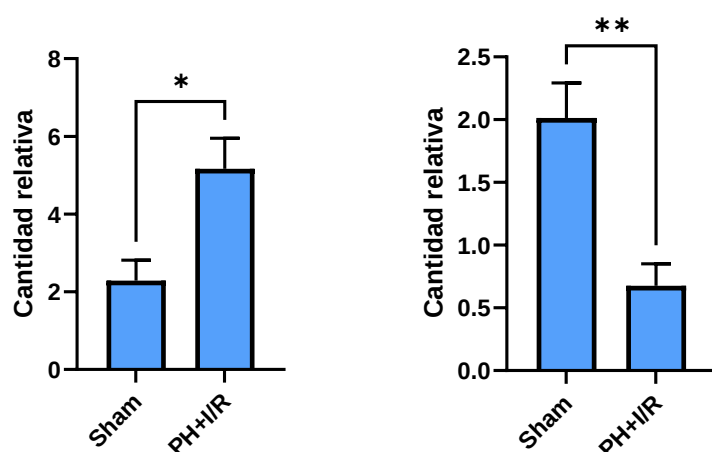
**Figura 16.** Expresión de ARNm de VEGFA en hígado y concentración y regulación de la proteína en tejidos extrahepáticos. A) Expresión del ARNm de VEGFA en hígado. B) Concentración de sFLT1 en plasma. C) Concentración de la proteína VEGFA en intestino y tejido adiposo. \*\*:  $p \leq 0.01$ .

Debido a que el sFLT1 es capaz de unirse a VEGFA en circulación, impidiendo que el VEGFA llegue a concentraciones adecuadas a los tejidos para ejercer sus efectos y teniendo en cuenta que su concentración está alterada en diferentes enfermedades y cirugías hepáticas (Bujaldon et al. 2019; Jaroszewicz et al. 2008; Salcedo Mora et al. 2005), se investigó si alteraciones en los niveles de sFLT1 en plasma podían contribuir a la reducción en los niveles de VEGFA observados

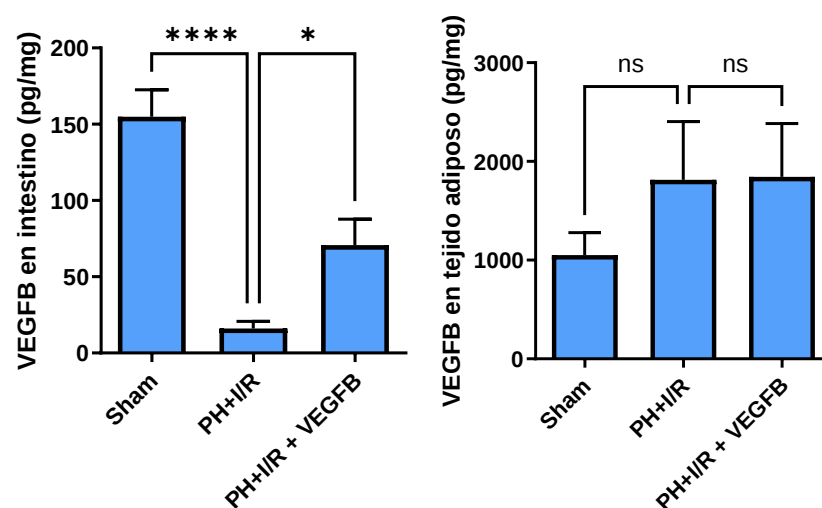
en hígado del grupo PH+I/R comparado con el grupo *Sham*. Sin embargo, los niveles circulantes de sFLT1 fueron similares en todos los grupos analizados (grupos *Sham*, PH+I/R y PH+I/R+VEGFA) (Figura 16B) indicando que el sFLT1 no está implicado en la regulación del VEGFA en nuestro modelo PH+I/R.

Respecto a VEGFB, se observó un aumento de sus niveles hepáticos de ARNm en el grupo PH+I/R en comparación a los niveles de mRNA encontrados en el grupo *Sham* (Figura 17A). Estos resultados no estaban en línea con los niveles proteicos de VEGFB ya que, tal y como se ha mencionado anteriormente, en el hígado del grupo PH+I/R se observaron niveles proteicos de VEGFB reducidos al compararlos con los resultados del grupo *Sham* (Figura 15A). En el tejido adiposo, no se observaron cambios en los niveles de proteína de VEGFB entre los grupos *Sham*, PH+I/R y PH+I/R+VEGFB (Figura 17B). No obstante, en intestino se observó una disminución de VEGFB tanto de los niveles de mRNA como de proteína tras la cirugía (grupo PH+I/R) respecto a los resultados encontrados en el grupo *Sham* (Figura 17A y Figura 17B).

### A) Expresión de ARNm de VEGFB en hígado e intestino tras la PH+I/R



### B) Niveles de proteína de VEGFB en intestino y tejido adiposo tras la PH+I/R



**Figura 17.** Expresión de ARNm de VEGFB en hígado y concentración de la proteína en tejidos extrahepáticos. A) Expresión del ARNm de VEGFA en hígado e intestino. B) Concentración de la proteína VEGFB en intestino y tejido adiposo. \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ .

## Investigación de la vía de señalización de la GH en un modelo preclínico de perfusión hepática *ex vivo* en ratas con enfermedad hepática asociada a alcohol

En resultados previos del grupo, se determinó que la administración de GH disminuyó el daño en hígados de donantes procedentes de muerte cerebral y con enfermedad hepática asociada a alcohol a través de un aumento en la expresión de VEGFB y VEGFA en intestino antes de la extracción del injerto del donante. Al igual que en el caso de la GH, la administración de VEGFA

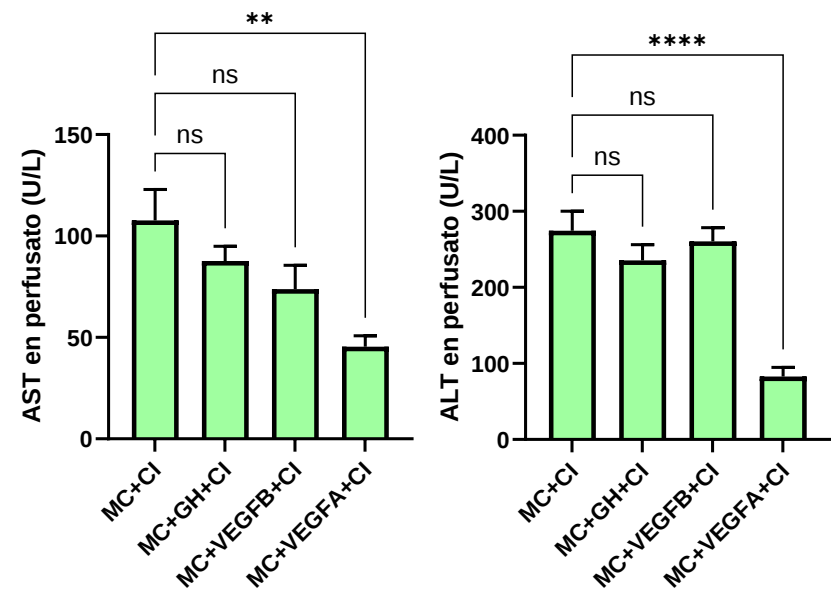
o de VEGFB también disminuyó el daño. Además, se observó que los efectos beneficiosos de la GH en hígado desaparecieron cuando se inhibían los receptores VEGFR1 y VEGFR2, los cuales son los ligandos de VEGFB y VEGFA, respectivamente. Por consiguiente, la vía de señalización GH-VEGFA/VEGFB fue clave en el eje intestino-hígado en donantes con ALD procedentes de muerte cerebral.

Por lo tanto, en la presente Tesis Doctoral se pretendió investigar si el eje GH-VEGFA/VEGFB, que protegía al hígado con ALD antes de ser extraído de donantes con muerte cerebral, seguía protegiendo tras un procedimiento de isquemia fría de 24 horas y perfusión *ex vivo*, además de observar si las estrategias que protegían en el donante aumentaban la supervivencia de receptores cuando los injertos de un donante de MC con ALD fueron sometidos a 24 de isquemia fría e implantados en el receptor.

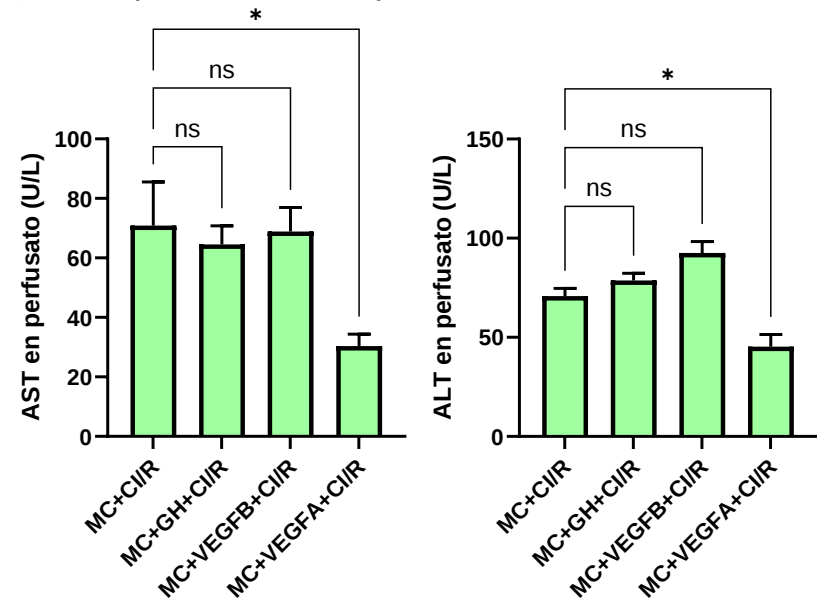
Para poder averiguar el efecto del eje GH-VEGFB/VEGFA tras un periodo de isquemia fría de 24 horas de injertos hepáticos con ALD y MC, se administró GH, VEGFB o VEGFA exógeno tras la MC (grupos MC+GH+CI, MC+VEGFB+CI y MC+VEGFA+CI, respectivamente). Como control, se utilizaron injertos hepáticos con ALD tras MC sometidos a CI (grupo MC+CI). Por otra parte, para averiguar el efecto de la perfusión *ex vivo* posterior a la isquemia fría, se realizaron nuevos grupos a los que se administraron estas mismas proteínas (grupos MC+GH+CI/R, MC+VEGFB+CI/R y MC+VEGFA+CI/R). En este caso, como control se utilizaron injertos hepáticos con ALD y MC sometidos a un procedimiento de CI y reperfusión (grupo MC+CI/R). En contraste con los resultados obtenidos en injertos hepáticos tras la MC antes de extraer los injertos hepáticos con ALD de los donantes con MC, al someter tales injertos hepáticos a un periodo de isquemia fría (CI) de 24 horas, el efecto beneficioso de la GH y VEGFB desapareció (Figura 18A). Este resultado que indica la no protección ni de la GH ni del VEGFB cuando los injertos se sometieron a 24 h de isquemia fría fue similar a lo obtenido en el grupo de CI con la perfusión de 2 horas (grupos CI/R), es decir cuando los injertos hepáticos se sometieron a 24 h de isquemia fría y 2h de perfusión normotérmica (Figura 18B). Los niveles de transaminasas en el perfusato del grupo MC+GH+CI y MC+VEGFB+CI fueron similares a los obtenidos en el grupo de MC+CI (Figura 18A). De la misma manera, los niveles de AST y ALT de los grupos MC+GH+CI/R y MC+VEGFB+CI/R fueron de un orden similar al grupo MC+CI/R (Figura 18B). Por otra parte, los beneficios resultantes de la administración de VEGFA observados en injertos hepáticos con ALD antes de su extracción se mantuvieron tanto tras la CI como tras la CI con reperfusión de 2 horas. Esto se notó por la disminución de las transaminasas en el perfusato de los grupos MC+VEGFA+CI y MC+VEGFA+CI/R respecto a los grupos MC+CI y MC+CI/R, respectivamente (Figura 18A y Figura 18B). Además, estos resultados están en línea con las determinaciones histológicas del daño

observado a través de la tinción de H&E. Mientras que en los grupos MC+CI/R, MC+GH+CI/R y MC+VEGFB+CI/R se observó una desorganización del parénquima hepático y un incremento de alteraciones sinusoidales, en el grupo MC+VEGFA+CI/R estas alteraciones fueron menores (Figura 19A).

**A) Daño hepático tras la CI**



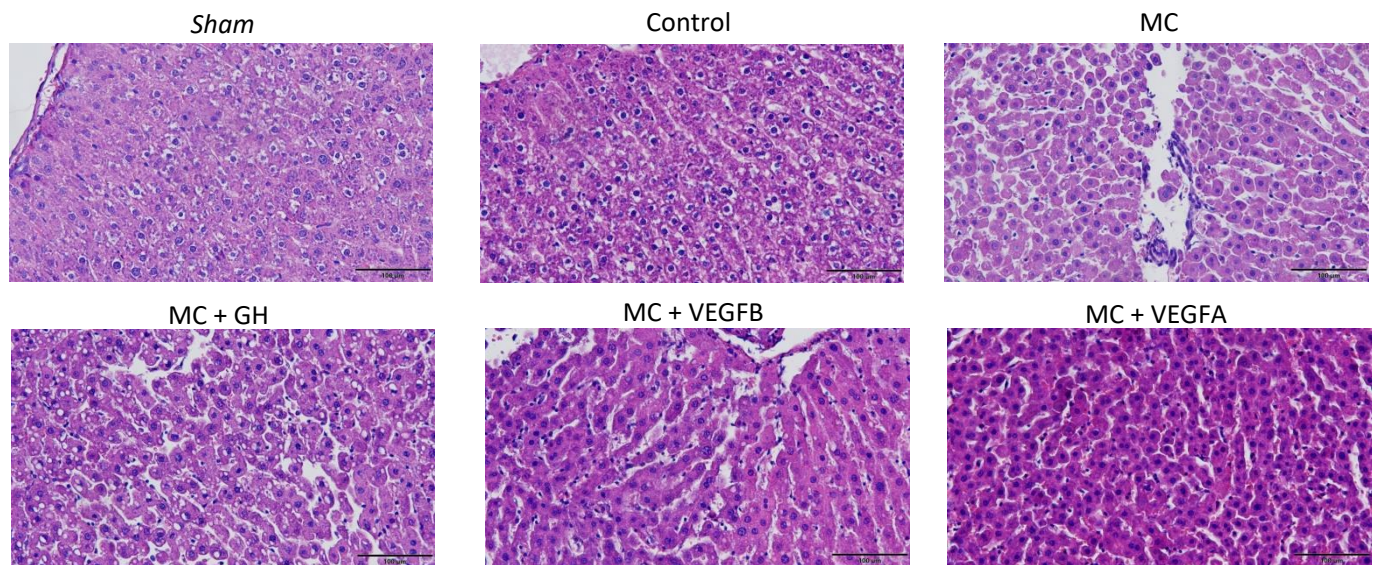
**B) Daño hepático tras la CI + reperusión**



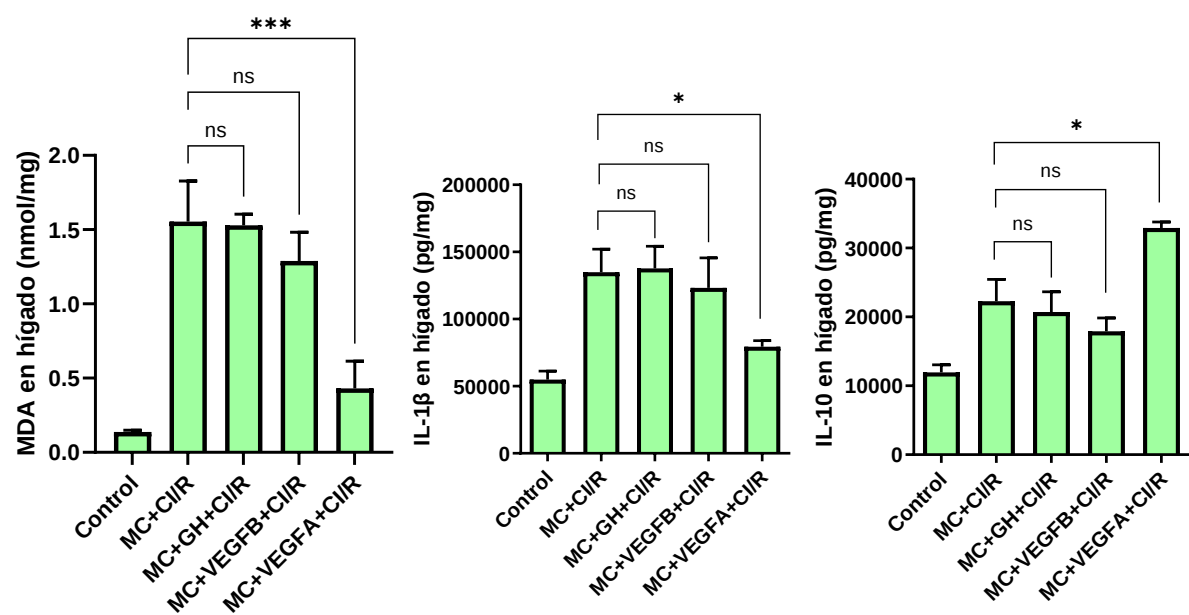
**Figura 18.** *Efecto de la modulación de GH, VEGFB y VEGFA en injertos hepáticos donantes con ALD que provienen de MC tras un procedimiento de CI y perfusión ex vivo.* A) Daño hepático tras el procedimiento de MC y CI observado a través de los niveles de AST y ALT en plasma. B) Daño hepático tras el procedimiento de MC y CI/R observado a través de los niveles de AST y ALT en plasma. \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ .

Por otra parte, se realizaron análisis de interleucinas y estrés oxidativo en los injertos hepáticos tras el proceso de CI/R y se obtuvieron los mismos resultados que en el caso del daño hepático (Figura 19B). Mientras que los niveles de MDA y de IL-1 $\beta$  se mantuvieron altos en los grupos MC+GH+CI/R y MC+VEGFB+CI/R, los niveles disminuyeron en el grupo MC+VEGFA+CI/R, indicando una reducción del estrés oxidativo y de los niveles de interleucinas que promueven el daño hepático. Por último, también se observó en el grupo con VEGFA un incremento de IL-10, indicando una activación de las vías protectoras frente al daño hepático.

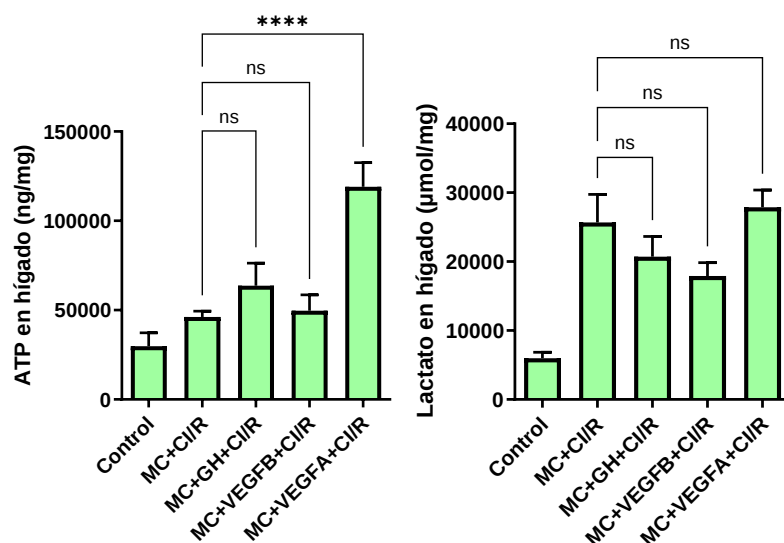
## A) Tinción por H&E de secciones de hígado tras la CI y la reperusión



## B) Estrés oxidativo e interleucinas



### C) Función metabólica

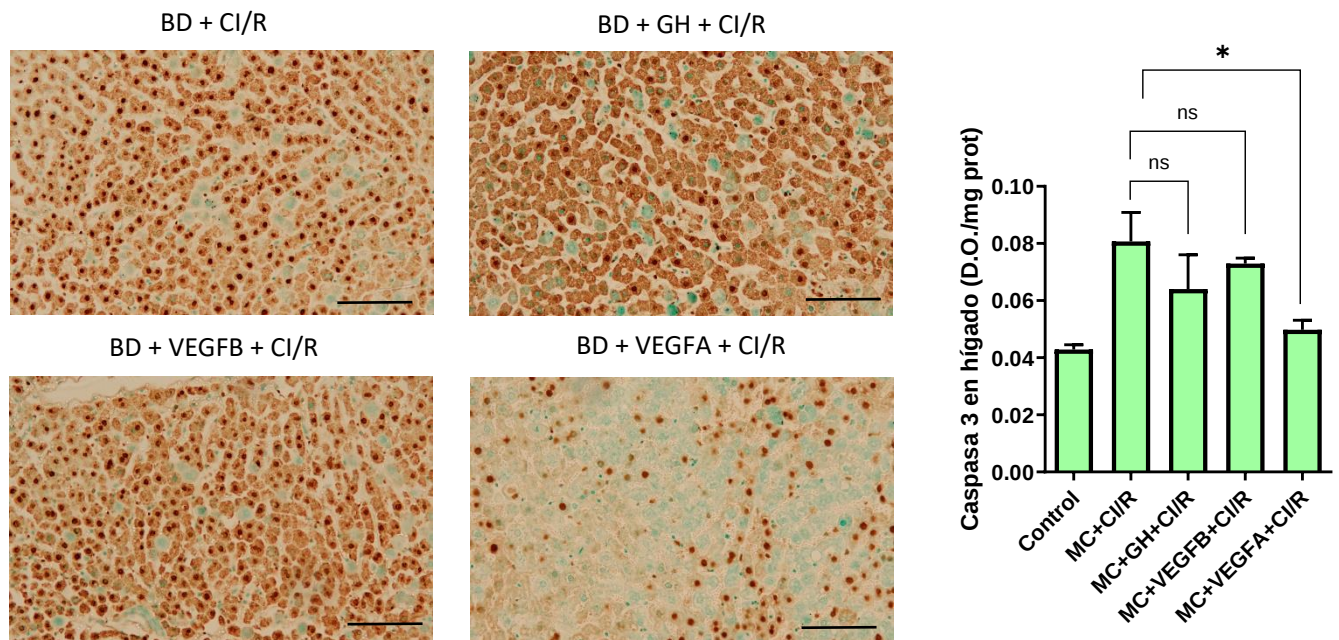


**Figura 19.** Histología y análisis de la inflamación y el metabolismo en injertos hepáticos donantes con ALD que provienen de MC tras un procedimiento de CI y perfusión ex vivo. A) Tinción por H&E de secciones hepáticas para observar el daño hepático tras el procedimiento de CI/R a 20X. B) Niveles hepáticos de MDA, IL1 $\beta$  e IL10 en hígado. C) Determinación del metabolismo a partir del análisis de los niveles de ATP y lactato en el hígado. \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*:  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$

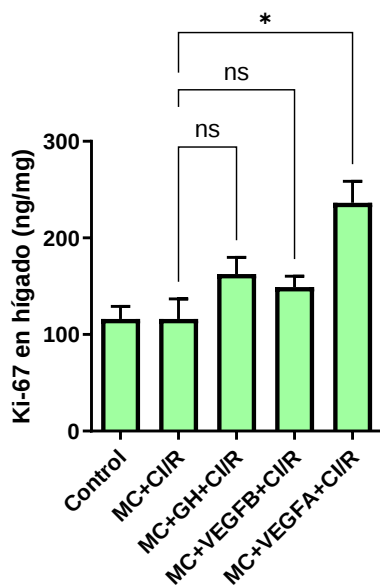
Respecto a parámetros metabólicos, se analizaron los niveles de ATP y lactato en el hígado. Mientras que no se observó una diferencia en los niveles de lactato en los grupos evaluados (MC+CI/R, MC+GH+CI/R, MC+VEGFB+CI/R y MC+VEGFA+CI/R), la concentración de ATP aumentó en el grupo al que se administró VEGFA (Figura 19C) con respecto al grupo MC+CI/R, lo cual se debía, probablemente, a un incremento del metabolismo aeróbico o a una disminución en la depleción de ATP.

Finalmente, se investigó si la apoptosis y la regeneración hepática estaban afectadas tras la CI/R. Con respecto a la apoptosis, en los injertos en los que se había observado un aumento del daño, estrés y alteraciones en las interleucinas que promovían daño hepático (MC+CI/R, MC+GH+CI/R y MC+VEGFB+CI/R), los parámetros de apoptosis (evaluados por TUNEL y actividad de caspasa 3) se mantuvieron elevados (Figura 20A). No obstante, se vio una reducción en los parámetros apoptóticos tras la administración de VEGFA (grupo MC+VEGFA+CI/R) al compararlo con los resultados en el grupo MC+CI/R. Respecto a la regeneración hepática, evaluada por los niveles de Ki67 en hígado, se encontró un perfil inverso a la apoptosis, con un incremento del grupo de MC+VEGFA+CI/R (Figura 20B).

### A) Apoptosis



### B) Regeneración hepática

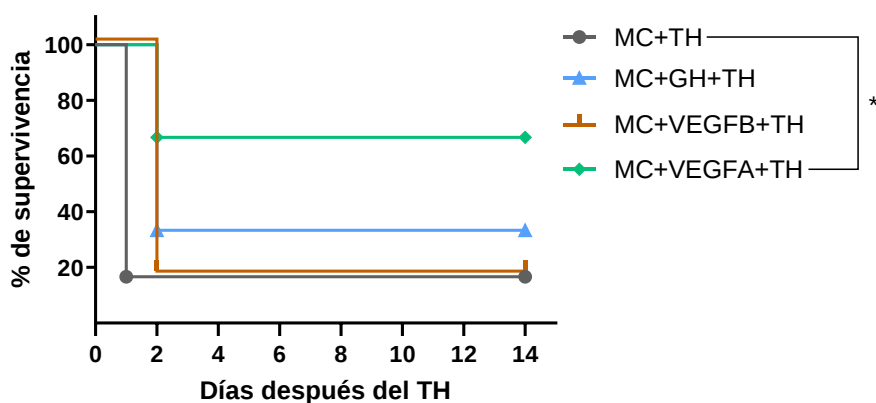


**Figura 20.** Análisis de la muerte celular por apoptosis y regeneración hepática en injertos hepáticos provenientes de donantes con ALD y MC sometidos a un proceso de CI/R. A) Apoptosis determinada a partir de la tinción por TUNEL en secciones hepáticas a 10X y actividad de caspasa 3 en hígado. B) Regeneración hepática observada a partir de la concentración de Ki-67 en hígado. \*:  $p \leq 0.05$ .

## Supervivencia de receptores con injertos hepáticos con ALD sometidos a 24 horas de isquemia fría procedentes de donantes con muerte cerebral

Por otra parte, otro objetivo de la presente tesis era averiguar si la administración de los componentes de la vía GH-VEGFB/VEGFA en injertos hepáticos donantes con ALD tras un procedimiento de MC sometidos a trasplante podía mejorar la supervivencia de los receptores (grupos MC+GH+TH, MC+VEGFB+TH y MC+VEGFA+TH). Como control, se realizó un TH de donantes con ALD tras la MC sin administrar ningún factor (grupo MC+TH). Los resultados en receptores sometidos a trasplante hepático con injertos hepáticos con ALD sometidos a 24 horas de isquemia fría y procedentes de donantes con MC fueron similares a lo que se observó en el modelo de perfusión *ex vivo*. Al administrar VEGFA en el donante, la supervivencia fue superior a las ratas a las que se administró GH o VEGFB. De hecho, en los receptores a los que se le había administrado VEGFA al donante con injertos hepáticos con ALD y sometidos a 24 horas de isquemia fría, se observó una supervivencia del 67% a los 14 días tras la cirugía, mientras que en el caso de la administración de VEGFB o GH o en el grupo sin tratamiento (MC+VEGFB+LT, MC+GH+LT y MC+LT, respectivamente), la supervivencia fue menor (Figura 21).

### Estudio de supervivencia en receptores de trasplante de injertos hepáticos con ALD y MC



**Figura 21.** Análisis del efecto de la modulación farmacológica de los factores del eje GH-VEGFB/VEGFA en la supervivencia de los receptores de trasplantes hepáticos que provienen de donantes con ALD y MC. \*:  $p \leq 0.05$ .

## Discusión

La diabetes de tipo 2 (T2DM) es una enfermedad cuya prevalencia se encuentra en aumento, junto a otras enfermedades metabólicas como la obesidad o la MAFLD (Demir et al. 2021; Marušić et al. 2021; Tanase et al. 2020).

Además de ser una enfermedad sistémica que por sí misma tiene efectos negativos en una multitud de órganos, como el cerebro, el corazón o el hígado (Damanik and Yunir 2021; Viigimaa et al. 2020), también representa un factor de riesgo para la progresión de diversas enfermedades hepáticas, como es el caso de la MAFLD (Marušić et al. 2021).

Con respecto a la cirugía hepática, en la práctica clínica se ha reconocido que la T2DM es un factor de riesgo importante, y es de especial relevancia destacar los efectos adversos observados tras una resección hepática, aumentando el riesgo de mortalidad, morbilidad y diversas complicaciones postoperatorias (Qingshan Li et al. 2017; Le Roy et al. 2018; Yang et al. 2022). Sin embargo, hasta la fecha, no se han encontrado estudios preclínicos que evalúen el efecto de la T2DM sobre la lesión y el fallo en la regeneración hepática tras un procedimiento de hepatectomía parcial bajo oclusión vascular. Los resultados que se han obtenido en la presente Tesis Doctoral señalaron una alta mortalidad durante las primeras 30 horas posteriores a la cirugía (ya que todos los animales murieron), reforzando la idea de que la presencia de T2DM es un factor de riesgo crítico cuando los hígados se someten al procedimiento de PH+I/R. Para poner en contexto, en las mismas condiciones que las evaluadas en el mismo estudio de la presente Tesis (una hepatectomía parcial del 70% del tejido bajo 60 minutos de isquemia), resultados previos han indicado una supervivencia de animales sanos y obesos con esteatosis del 90 y 70%, respectivamente, 14 días después del procedimiento quirúrgico (Bujaldon et al. 2019; Cornide-Petronio et al. 2017).

A diferencia de resultados previos en las mismas condiciones quirúrgicas (Bujaldon et al. 2019), se observó, por primera vez, que la administración de VEGFA llegó al hígado, ya que los niveles del factor aumentaron tras su administración (grupo PH+I/R+VEGFA) en comparación al grupo al que únicamente se realizó la cirugía (PH+I/R). Además, los resultados obtenidos señalaron que en los hígados sometidos a PH bajo oclusión vascular en presencia de T2DM había una disminución los niveles del citado factor del crecimiento VEGFA respecto a las ratas con la enfermedad no sometidas a la cirugía. De especial importancia, los niveles aumentados de VEGFA en hígado no tuvieron un efecto positivo ni en la lesión ni en la regeneración hepática. De hecho, la administración de VEGFA exógeno exacerbó el daño hepático (especialmente la

necrosis) y la disfunción hepática, determinada a partir de la concentración de bilirrubina en plasma, respecto al grupo PH+I/R. Además, no se observaron cambios en la regeneración hepática (evaluado por la concentración de Ki67 y el número de células hepáticas positivas a PCNA) al comparar el grupo PH+I/R+VEGFA con el grupo PH+I/R.

A continuación, se evaluó el papel del VEGFA endógeno a partir de la administración de Vandetanib, un antagonista de VEGFR2 (grupo PH+I/R+anti-VEGFR2), ligando por el cual el VEGFA actúa desarrollando su función biológica (Lal, Puri, and Rodrigues 2018). En este grupo, no se encontraron diferencias en los parámetros de daño hepático comparando con el grupo PH+I/R. Sin embargo, se encontró un efecto positivo sobre la regeneración hepática, evaluada por un aumento en los parámetros de regeneración hepática analizados (tanto en Ki67 como en PCNA). En consecuencia, es importante señalar el efecto diferencial de VEGFA sobre el daño y el fallo en la regeneración en hígados sometidos a la resección hepática tras la oclusión vascular en ratas con T2DM dependiendo de la fuente del VEGFA (exógena o endógena). Mientras que los efectos adversos de la administración exógena de VEGFA se pueden explicar por un aumento del daño (especialmente necrosis), la inhibición del VEGFA endógeno no protegió frente al daño, pero sí que aumentó la regeneración del tejido hepático remanente. En conclusión, durante este estudio se observó el efecto negativo de la administración de VEGFA exógeno, lo cual contrasta con estudios previos en los que se observaron efectos beneficiosos tanto en condiciones quirúrgicas (B.-S. Ding et al. 2010; Gu et al. 2013; Shido et al. 2017) como en patologías relacionadas con desórdenes metabólicos, como puede ser la esteatosis (cuando el VEGFA exógeno se combina con un anti-sFlt1 en PH bajo oclusión vascular) o la T2DM sin la presencia de cirugía hepática (Bujaldon et al. 2019; Dariushnejad et al. 2023). Por otra parte, la inhibición de la actividad del VEGFA endógeno podría ser una buena estrategia terapéutica en estas condiciones quirúrgicas, al haberse visto relacionada con una mejora en la regeneración hepática.

Una vez se determinó la mejora en la regeneración hepática mediante la inhibición de la acción del VEGFA endógeno, se quiso determinar si ésta podría estar relacionada con las vías de señalización relacionadas con el VEGFA (Yagi et al. 2020; Chunyan Zhang et al. 2024). En nuestro caso, no se observó una alteración en la vía de señalización Id1/Wnt2 al inhibir la acción del VEGFA (grupo PH+I/R+anti-VEGFR2) con respecto al grupo PH+I/R, indicando que la vía de señalización Id1/Wnt2 no jugaba un papel relevante en los mecanismos de acción del VEGFA endógeno en nuestras condiciones de PH+I/R. No obstante, no fue el caso de la vía de Pi3k/Akt. Los resultados señalaron un aumento en los niveles de Pi3k y Akt, vía de señalización relacionada con procesos de regeneración hepática (Bujaldon et al. 2019; Zhong et al. 2019). Por

lo tanto, esta vía, Pi3k-Akt podría estar relacionada con los beneficios resultantes de la inhibición de la acción del VEGFA endógeno.

Debido a la relación establecida en múltiples estudios entre VEGFA y VEGFB (Jin et al. 2018; X. Luo et al. 2022; Lv et al. 2018), se quiso investigar si el cambio en la concentración de VEGFA modificaba los niveles de VEGFB hepáticos en las condiciones experimentales de PH+I/R en ratas con T2DM. Esto no ocurrió, ya que los niveles de VEGFB en el grupo PH+I/R+VEGFA y en el grupo PH+I/R+anti-VEGFR2 eran similares a los encontrados en el grupo PH+I/R. Por otra parte, la administración de VEGFB exógeno también provocó un aumento del daño, especialmente necrosis, reflejado por un aumento (en el caso de la AST) o no disminución (en el caso de la ALT) de los niveles de transaminasas en el grupo PH+I/R+VEGFB con respecto al grupo PH+I/R. De forma similar a la administración de VEGFA, tampoco se observó una alteración en los parámetros relacionados con la apoptosis ni la regeneración hepática con respecto al grupo PH+I/R. Por lo tanto, la administración de VEGFB no sería una estrategia terapéutica adecuada en este procedimiento de PH+I/R en ratas con T2DM. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, basados en la disminución de los niveles de VEGFA y VEGFB tras la cirugía hepática (grupo PH+I/R) en comparación a las ratas sin cirugía (grupo *Sham*) y atendiendo a los efectos negativos derivados de la administración de los factores VEGFA y VEGFB, nuestra hipótesis es que, tras la PH+I/R en ratas con T2DM, se están activando mecanismos para mantener los niveles bajos de ambas proteínas contrarrestando, por lo tanto, sus efectos adversos respecto al daño y a la regeneración hepática. Esta hipótesis se refuerza con varios resultados obtenidos que se explican a continuación.

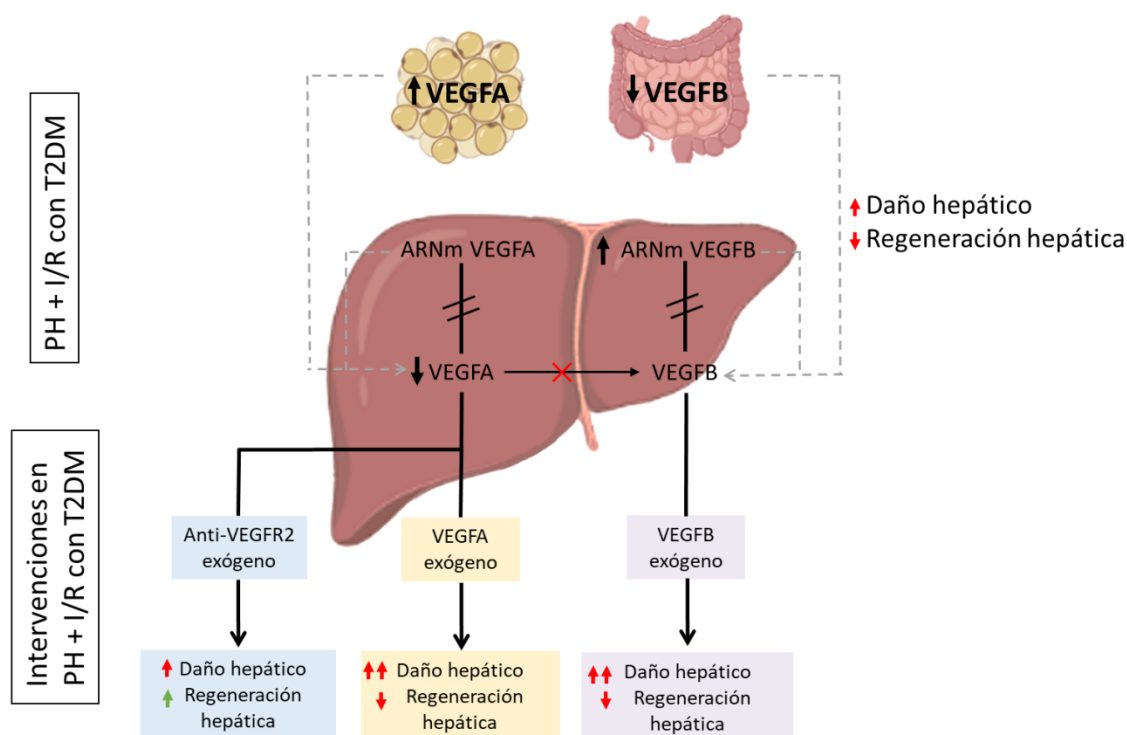
En primer lugar, el hecho de que la reducción de los niveles de proteína de VEGFA en hígado de las ratas tras PH+I/R respecto al grupo *Sham* no se corresponde con una disminución del ARNm en el mismo tejido, siendo estos niveles similares. Por otra parte, considerando el papel de tejidos extrahepáticos, como el intestino o el tejido adiposo, en la regeneración hepática y teniendo en cuenta que diversos mediadores sintetizados en el tejido adiposo e intestino pueden llegar al hígado para ejercer sus efectos (Elias-Miró et al. 2014; Micó-Carnero et al. 2021); se quiso examinar el papel de estos tejidos, tejido adiposo e intestino, en la regulación de los niveles proteicos de VEGFA observados en hígado tras la PH bajo oclusión vascular y en presencia de T2DM, especialmente tras no haber cambios en los niveles de sFLT1 plasmáticos (el cual se une a VEGFA en plasma impidiendo que llegue al hígado a concentraciones óptimas (Shibuya et al. 2021)). En este caso, no se vieron cambios en el intestino entre los grupos *Sham* y los grupos sometidos a la cirugía. No obstante, en el tejido adiposo, sí se encontró un aumento de los niveles de VEGFA tras la cirugía, por lo que podría estar relacionado con la disminución

de los niveles de VEGFA en hígado. Es decir, el tejido adiposo podría estar captando el VEGFA presente en la circulación para mantener los niveles de VEGFA bajos en el hígado y, así, contrarrestar sus efectos nocivos.

Respecto a la regulación de los niveles proteicos de VEGFB, se observó un aumento de los niveles de ARNm de VEGFB en el hígado de las ratas tras la PH+I/R en comparación al grupo *Sham*. No obstante, los bajos niveles proteicos de VEGFB no se correspondieron con los elevados niveles de ARNm de VEGFB. Esto podría ser debido a una desregulación en los procesos que tienen lugar desde el ARNm hasta la generación de proteína, tal y como se ha reportado ampliamente en la literatura (Schwanhüusser et al. 2011; Vogel et al. 2010). Por consiguiente, a pesar del aumento de ARNm de VEGFB, la concentración de la proteína VEGFB en hígado permanece baja para disminuir los efectos adversos del VEGFB sobre el daño y regeneración hepática. En línea con estos resultados, se observó una disminución de VEGFB en intestino, tanto de ARNm como de proteína, para mantener bajos los niveles de VEGFB en el hígado. De los resultados de la presente Tesis Doctoral se deriva que los mecanismos encargados de mantener bajos los niveles de VEGFA y de VEGFB tras PH+I/R y en presencia de T2DM en el hígado para evitar así sus efectos nocivos sobre la lesión y regeneración son diferentes según el tipo de VEGF (VEGFA o VEGFB).

Por consiguiente, estos resultados muestran un aumento del daño hepático y fallo en la regeneración en condiciones de PH+I/R en la presencia de T2DM (Figura 22). Esto se asocia, a su vez, a una disminución de los niveles de VEGFA y de VEGFB en hígado. La administración de VEGFA o VEGFB no son apropiadas estrategias para ser aplicadas en PH bajo oclusión vascular y en presencia de T2DM. Nuestros resultados indicaron que la inhibición del VEGFA endógeno aumentó la regeneración a través de la vía de Pi3k/Akt. Por otra parte, el VEGFA no afectó a la expresión de VEGFB. Tal y como se ha comentado anteriormente, los tejidos extrahepáticos podrían regular los niveles de VEGFA y VEGFB hepáticos, con la finalidad de disminuir su concentración en el hígado tras el procedimiento de PH+I/R y, por consiguiente, de evitar sus efectos adversos sobre el daño y la regeneración hepática. Finalmente, según los resultados obtenidos, la administración del inhibidor de VEGFR2 puede ser una estrategia útil que ayude a mejorar el resultado postoperatorio tras un procedimiento de PH+I/R en la presencia de T2DM. Además, este resultado podría ser extrapolable al TH para mejorar la calidad del injerto hepático con T2DM, que a su vez es una patología común en pacientes en lista de espera para el TH (Brodosi et al. 2022), ya que hay varios nexos comunes con la PH bajo oclusión vascular, como es el periodo de isquemia caliente, por ejemplo. No obstante, futuras investigaciones demostrarán tal suposición, teniendo en cuenta diversos estudios que indican que los efectos de fármacos o la modulación de dianas terapéuticas, como es el caso del cortisol, pueden tener

efectos totalmente opuestos en ambos tipos de cirugía, llámese PH+I/R y TH (Cornide-Petronio et al. 2017; Mónica B. Jiménez-Castro et al. 2017).



**Figura 22.** Esquema representativo de los efectos de la PH+I/R en ratas con T2DM con o sin intervenciones en la familia de los factores de crecimiento VEGF.

Por otra parte, otro objetivo de la presente Tesis Doctoral se basaba en investigar el efecto de los componentes del eje GH-VEGFB/VEGFA en la enfermedad hepática asociada a alcohol una vez se sometían los hígados a un procedimiento de MC y TH *in vivo* o perfusión *ex vivo*. Esto se debe a la observación de que el VEGFA tiene un papel relevante en la lesión por isquemia-reperfusión en donantes de injerto hepático sanos sometidos a un procedimiento de MC (Micó-Carnero et al. 2022). Además, como se describió en la introducción, varios estudios indican la relación entre VEGFA y el alcoholismo (Kasztelan-Szczerbinska et al. 2014; R. Luo et al. 2021). Por otro lado, se desconocía si el aumento en los niveles de VEGFA bajo condiciones de ALD se debía a que el VEGFA actuaba como un mecanismo para evitar un mayor daño provocado por el alcohol (aumento del estrés oxidativo e hipoxia, entre otros efectos), o si, por el contrario, el aumento de VEGFA era responsable de los efectos nocivos provocados por ALD. Por otra parte, aunque el papel de VEGFB en alcoholismo no se había analizado previamente, sí se conoce su efecto antioxidante (R. Chen et al. 2019) y se ha visto un papel protector en procesos relacionados con la isquemia (Ishrat et al. 2018; Lv et al. 2018). Con respecto a la GH, varios

artículos han descrito el papel positivo de la GH en procesos de I/R tanto a nivel clínico como preclínico (Matejka and Bengtsson 1998; Szarka et al. 2021) debido, entre otros, a su actividad antiinflamatoria y al aumento de la expresión de factores angiogénicos, como el mismo VEGFA (Baltazar-Lara et al. 2022).

Debido a las observaciones previamente mencionadas y teniendo en cuenta estudios preliminares del grupo, en los que se observó una mejora en el hígado tras inyectar GH en los donantes en un modelo de ALD sometido a un procedimiento de MC, el cual se producía a través del aumento de VEGFA y VEGFB en intestino; se quiso averiguar si estos factores beneficiosos de GH, VEGFA y VEGFB observados en injertos hepáticos antes de su extracción del donante también podían ser favorables en modelos experimentales de MC en injertos hepáticos con ALD, pero tras la extracción de los injertos hepáticos de los donantes y ser sometidos a la fase de la isquemia fría de 24 horas, tanto en un modelo de perfusión del hígado *ex vivo* como en un modelo de TH *in vivo*, evaluando, con tal finalidad, la supervivencia de los receptores de injertos hepáticos donantes con ALD y MC tras la administración de los diferentes factores en donantes.

En primer lugar, se observó que, tras la MC, al dejar el injerto hepático en CI durante 24 horas, el efecto protector de la administración de GH exógeno en los donantes desapareció, lo cual se observó también tras la perfusión *ex vivo* posterior a la CI. Esto indicó que la protección dada por el factor tras la MC antes de la extracción del injerto del donante no se mantuvo en los pasos posteriores relacionados con el procedimiento del TH. Por lo tanto, la administración de GH no es una estrategia adecuada en el caso del TH con injertos hepáticos con ALD y procedentes de donantes con MC.

Por otra parte, la relación entre GH y VEGFA se ha descrito en diferentes artículos (S. Li et al. 2010; Lin et al. 2011). Sin embargo, no se han encontrado estudios que relacionaran GH y VEGFB. A pesar de ello, debido a las similitudes en los mecanismos de acción y receptores de los dos factores de crecimiento, se valoró la posibilidad de que GH no solamente regulara VEGFA, sino que también regulara VEGFB. Los resultados preliminares de nuestro grupo indicaron que la administración de GH en donantes no alcanzó al hígado, pero sí lo protegió frente a los efectos nocivos derivados de la MC. Teniendo en cuenta tales resultados, se valoró la posibilidad de que el papel protector ejercido por la GH tras la MC en el hígado no fuera debido a una función directa en el hígado, sino indirectamente a través de otro tejido, como podía ser en el intestino, ya que previamente se había demostrado la expresión del receptor de GH este órgano (Ran et al. 2016). Además, el eje intestino-hígado ha sido objeto de una multitud de estudios que indican un papel clave en diferentes desórdenes hepáticos (Micó-Carnero et al. 2020; Milosevic et al.

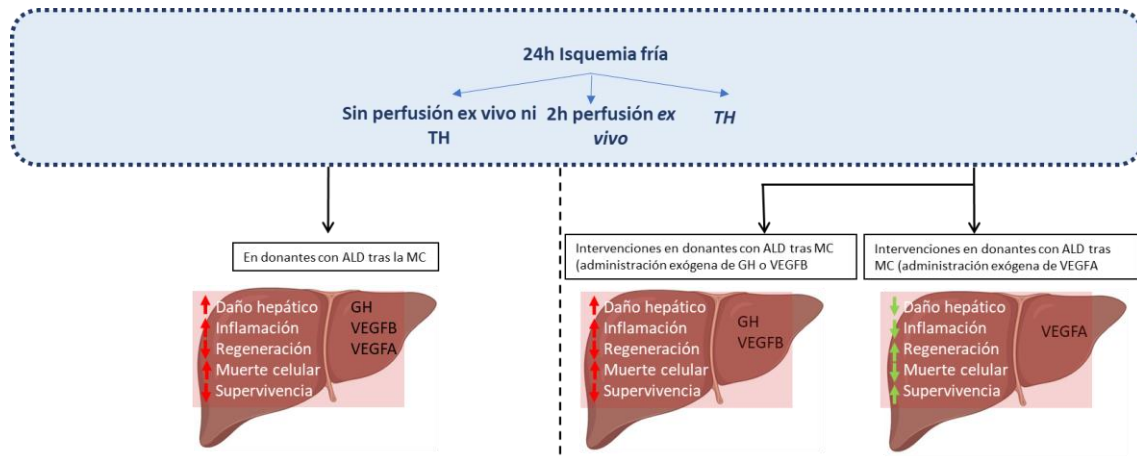
2019; Tilg, Adolph, and Trauner 2022). A más a más, se conoce que tanto VEGFA como VEGFB pueden ser sintetizados en el intestino (F. Zhang et al. 2018). En línea con las citadas observaciones, la administración de GH exógeno en injertos hepáticos con ALD aumentó la producción intestinal de VEGFA y VEGFB y, en consecuencia, se protegió al injerto hepático con ALD tras la MC antes de la extracción de los injertos hepáticos de los donantes con MC

Sin embargo, los resultados observados tras la MC (antes de la extracción de los injertos hepáticos de los donantes) no se reflejaron cuando tales injertos se sometieron a 24 horas de isquemia fría en el modelo de perfusión *ex vivo*. De hecho, los niveles de GH, VEGFA y VEGFB no cambiaron durante la CI ni la CI/R pero, durante la isquemia fría, al parecer se pusieron en marcha mecanismos que impiden que se produzcan los beneficios de VEGFB y GH en injertos hepáticos observados previamente antes de su extracción de los donantes con MC. Por otro lado, tales resultados fueron diferentes en el caso del VEGFA, que mantuvo un efecto positivo cuando los injertos hepáticos de donantes procedentes de MC fueron sometidos a 24 horas de isquemia fría y se conectaron posteriormente a una máquina de perfusión normotérmica o implantados en el receptor. Atendiendo a estos resultados, por tanto, observamos que la vía evaluada (GH-VEGFA/VEGFB) puede variar en función de las diferentes etapas del TH, siendo diferente el momento de la MC en el donante y cuando tales injertos se someten a un periodo de CI de 24 horas. Este hecho es ampliamente justificable teniendo en cuenta que los mecanismos y vías implicados en las distintas etapas del TH pueden ser completamente diferentes. A pesar de que no forma parte de la presente Tesis Doctoral, diferentes hipótesis se pueden plantear para explicar el por qué GH o VEGFB son solo beneficios en los donantes, pero no cuando los injertos hepáticos se someten a un periodo de 24 h de CI. Por ejemplo, diferencias en la síntesis de NO y de ROS pueden explicar el efecto diferencial de la GH/VEGFB en donantes y tras las 24 de CI. De hecho, es bien conocido que el NO, según las condiciones quirúrgicas y estado del injerto hepático, puede ejercer una función beneficiosa para el hígado si hay poco estrés oxidativo (poca cantidad de ROS), pero también puede ser negativo en condiciones de un estrés elevado (Carrasco-Chaumel et al. 2005) ya que el NO se uniría con las ROS para formar peroxinitrito, con considerables efectos citotóxicos. Esta posibilidad no se puede descartar por lo siguiente: En el modelo experimental de ALD y MC+CI/R, se observa una cantidad de ROS superior en comparación a al estrés oxidativo encontrado tras la MC (antes de la extracción del injerto hepático del donante), pudiendo relacionarse este hecho, por lo tanto, con el papel diferencial de GH/VEGFB en función de las diferentes fases del TH en presencia de ALD y procedentes de donantes con MC.

Además de lo anteriormente mencionado, hay que tener en cuenta lo siguiente: los mecanismos que causan daño a los injertos hepáticos que provienen de MC son diferentes antes y después del procedimiento de CI/R, como es el caso de la apoptosis. En los diferentes estadios de TH, se observa una diferencia considerable tanto en el caso de la actividad de la caspasa 3 como en los resultados de TUNEL. Así, mientras que, tras la MC, la apoptosis prácticamente no se observa en el tejido hepático, tras el procedimiento de CI/R esta se encuentra aumentada. Finalmente, es importante destacar que el eje intestino-hígado, que parece ser el responsable del efecto beneficioso de la administración de GH, queda interrumpido al realizarse la extracción del injerto hepático de los donantes y ser sometidos a un periodo de CI de 24 horas (en el que el hígado se encuentra completamente aislado).

Por consiguiente, durante la presente Tesis Doctoral, se observó que, si bien los efectos de la administración de la GH estaban relacionados con un aumento de los factores de crecimiento VEGFB y VEGFA en intestino antes de la extracción de los injertos hepáticos de los donantes (Figura 23); este eje GH-VEGFB/VEGFA, se interrumpe al extraer los injertos de los donantes y ser sometidos a un periodo de isquemia fría de 24 horas. Tanto el efecto protector de la GH como del VEGFB observado en donantes desaparece cuando tales injertos se someten a un periodo de isquemia fría de 24 horas. Finalmente, la administración de VEGFA sí podría ser una estrategia protectora para la protección de los hígados en TH de hígados de donantes con ALD tras un procedimiento de MC, al haberse observado efectos positivos en la perfusión *ex vivo*.

Para finalizar, se comprobó, como se ha indicado previamente, si el efecto positivo derivado de la administración de GH/VEGFB/VEGFA en los injertos hepáticos de donantes con ALD tras la MC tenía un papel relevante en la supervivencia en un modelo de TH *in vivo*. En consonancia con el modelo experimental de perfusión *ex vivo*, las administraciones de GH y VEGFB no se asociaron a una mayor supervivencia, pero sí en el caso de la administración de VEGFA. Finalmente, en la presente Tesis Doctoral, se ponen de manifiesto los efectos opuestos del VEGFA exógeno en función del procedimiento quirúrgico y en función del tipo de patología hepática. En el caso del TH con injertos hepáticos procedentes de donantes con ALD tras la MC, la administración de VEGFA exógeno puede ser una estrategia útil que aplicar en la práctica clínica, mientras que la administración de VEGFA exógena no sería una estrategia recomendable para aplicar en condiciones de PH bajo oclusión vascular y en presencia de T2DM.



**Figura 23.** Esquema representativo de los procedimientos realizados en ratas con ALD tras la MC con o sin intervenciones de los factores del eje GH-VEGFB/VEGFA

## Conclusiones

- Se ha establecido un modelo preclínico de PH bajo oclusión vascular (PH+I/R) en presencia de T2DM, en el que se ha observado que la T2DM representa un factor de riesgo vital en las cirugías hepáticas de las resecciones en la lesión, en el fallo en la regeneración y en la tasa de supervivencia.
- El VEGFA tiene un papel perjudicial en PH+I/R de ratas con T2DM. Este efecto nocivo en la cirugía se ha observado tanto por el papel del factor de crecimiento VEGFA exógeno como del endógeno. No obstante, los mecanismos por los cuales el citado factor es negativo son diferenciales. En el caso de la administración del VEGFA exógeno, este promovió un aumento del daño asociado a la muerte celular por necrosis y a una disminución de la funcionalidad del hígado. En cambio, la inhibición del VEGFA endógeno provocó una mejora en los parámetros asociados a la regeneración hepática.
- No se ha observado una relación entre VEGFA y VEGFB en la PH+I/R en ratas con T2DM. Por otra parte, se ha evidenciado, por primera vez, el papel del VEGFB en esta cirugía. La administración exógena de VEGFB provocó una exacerbación del daño producido por la propia cirugía, identificado a partir de un aumento de la muerte celular hepática por necrosis, de la misma forma que en el caso del VEGFA.
- Por otra parte, el organismo puede activar mecanismos específicos para cada uno de los factores, VEGFA y VEGFB, con la finalidad de disminuir sus niveles en el hígado y, por consiguiente, sus efectos nocivos tras la cirugía hepática. Estos mecanismos están

relacionados con el tejido adiposo, en el caso del VEGFA y con el intestino, en el caso del VEGFB.

- El papel clave del eje intestino-hígado en la protección del hígado en injertos hepáticos con ALD al someterlos a un procedimiento de MC desaparece al extraer los injertos de los donantes y someterlos a un proceso de isquemia fría. Si bien la GH desarrolla un papel relevante en este eje, reduciendo el daño hepático causado por la MC, antes de extraer el injerto hepático, a través de un aumento de la expresión de los factores de crecimiento vascular endotelial VEGFA y VEGFB en el intestino, esta protección desaparece tras la isquemia fría.
- A pesar de los efectos beneficiosos observados tanto por el aumento de la expresión del VEGFB en el intestino, bien debido a la síntesis causada por la GH exógena como por la administración de VEGFB, en injertos hepáticos que provienen de donantes con ALD tras la MC antes de extraer los injertos hepáticos de los donantes, la isquemia fría anula el papel protector del VEGFB, tal y como ocurre con la GH.
- El papel protector del VEGFA exógeno en injertos hepáticos de donantes con ALD tras un procedimiento de MC antes de su extracción se mantiene cuando tales injertos se someten a un periodo de isquemia fría, tanto en un modelo de perfusión hepática normotérmica *ex vivo* como en un procedimiento de TH *in vivo*.

## Bibliografía

- Ahluwalia, A, and A S Tarnawski. 2012. "Critical Role of Hypoxia Sensor--HIF-1 $\alpha$  in VEGF Gene Activation. Implications for Angiogenesis and Tissue Injury Healing." *Current medicinal chemistry* 19(1): 90–97.
- Ahmad, Ehtasham et al. 2022. "Type 2 Diabetes." *Lancet (London, England)* 400(10365): 1803–20.
- Alba-Betancourt, Clara et al. 2013. "Neuro-Protective Effects of Growth Hormone (GH) after Hypoxia-Ischemia Injury in Embryonic Chicken Cerebellum." *General and comparative endocrinology* 183: 17–31.
- Alfany-Fernandez, I. et al. 2009. "Therapeutic Targets in Liver Transplantation: Angiotensin II in Nonsteatotic Grafts and Angiotensin-(1-7) in Steatotic Grafts." *American Journal of Transplantation* 9(3): 439–51.
- Alisi, Anna et al. 2018. "Expression of Insulin-like Growth Factor I and Its Receptor in the Liver of Children with Biopsy-Proven NAFLD." *PloS one* 13(7): e0201566.
- Álvarez-Mercado, Ana I. et al. 2019. "EGF-GH Axis in Rat Steatotic and Non-Steatotic Liver Transplantation from Brain-Dead Donors." *Transplantation* 103(7): 1349–59.
- Alvaro, Domenico et al. 2005. "The Intrahepatic Biliary Epithelium Is a Target of the Growth Hormone/Insulin-like Growth Factor 1 Axis." *Journal of hepatology* 43(5): 875–83.
- Arneth, Borros, Rebekka Arneth, and Mohamed Shams. 2019. "Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes." *International Journal of Molecular Sciences* 20(10).
- Asakawa, K et al. 1989. "Human Growth Hormone Stimulates Liver Regeneration in Rats." *Journal of endocrinological investigation* 12(5): 343–47.
- Atzori, Maria Grazia et al. 2022. "The Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGFR-1) D16F7 Monoclonal Antibody Inhibits Melanoma Adhesion to Soluble VEGFR-1 and Tissue Invasion in Response to Placenta Growth Factor." *Cancers* 14(22).
- Averill-Bates, Diana A. 2023. "The Antioxidant Glutathione." *Vitamins and hormones* 121: 109–41.
- Baltazar-Lara, Rosario et al. 2022. "Growth Hormone (GH) Crosses the Blood-Brain Barrier

- (BBB) and Induces Neuroprotective Effects in the Embryonic Chicken Cerebellum after a Hypoxic Injury." *International journal of molecular sciences* 23(19).
- Behrends, Matthias et al. 2010. "Acute Hyperglycemia Worsens Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Rats." *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 14(3): 528–35.
- Bilzer, Manfred, and Alexander L Gerbes. 2000. "Preservation Injury of the Liver: Mechanisms and Novel Therapeutic Strategies." *Journal of Hepatology* 32(3): 508–15.
- Bodur, Muhammed Selim et al. 2021. "Effects of Intraoperative Blood Loss during Liver Resection on Patients' Outcome: A Single-Center Experience." *Turkish Journal of Medical Sciences* 51(3): 1388–95.
- Branagan, William T, and J P Norvell. 2024. "Assessment and Evaluation of Alcohol Use Disorder in Liver Transplant." *Transplantation* 108(3): 654–61.
- Brissova, Marcela et al. 2006. "Pancreatic Islet Production of Vascular Endothelial Growth Factor--a Is Essential for Islet Vascularization, Revascularization, and Function." *Diabetes* 55(11): 2974–85.
- Brodosi, Lucia et al. 2022. "Management of Diabetes in Candidates for Liver Transplantation and in Transplant Recipients." *Transplantation* 106(3): 462–78.
- Buchanan, Ryan, and Julia M A Sinclair. 2021. "Alcohol Use Disorder and the Liver." *Addiction (Abingdon, England)* 116(5): 1270–78.
- Bujaldon, Esther et al. 2019. "Relevance of VEGFA in Rat Livers Subjected to Partial Hepatectomy under Ischemia-Reperfusion." *Journal of Molecular Medicine* 97(9): 1299–1314.
- Burra, Patrizia et al. 2016. "EASL Clinical Practice Guidelines: Liver Transplantation." *Journal of Hepatology* 64(2): 433–85.
- Burra, Patrizia, Alberto Zanetto, Francesco Paolo Russo, and Giacomo Germani. 2018. "Organ Preservation in Liver Transplantation." *Seminars in Liver Disease* 38(3): 260–69.
- Campana, Lara, Hannah Esser, Meritxell Huch, and Stuart Forbes. 2021. "Liver Regeneration and Inflammation: From Fundamental Science to Clinical Applications." *Nature reviews. Molecular cell biology* 22(9): 608–24.

- Cannistrà, Marco et al. 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: S57-70.
- Cao, Ding et al. 2017. "Exogenous Vascular Endothelial Growth Factor Delivery Prior to Endothelial Precursor Cell Transplantation in Orthotopic Liver Transplantation-Induced Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury." *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 23(6): 804–12.
- Caraceni, Paolo 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.
- 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.
- Carmeliet, Peter. 2005. "Angiogenesis in Life, Disease and Medicine." *Nature* 438(7070): 932–36.
- Carmeliet, Peter, Brian W Wong, and Katrien De Bock. 2012. "Treating Diabetes by Blocking a Vascular Growth Factor." *Cell metabolism* 16(5): 553–55.
- Carrasco-Chaumel, Esther et al. 2005. "Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase and Nitric Oxide in Rat Steatotic Liver Transplantation." *Journal of Hepatology* 43(6): 997–1006.
- Chen, Rongyuan et al. 2019. "Novel Function of VEGF-B as an Antioxidant and Therapeutic Implications." *Pharmacological research* 143: 33–39.
- Chen, Sanyang et al. 2020. "Donor Brain Death Leads to a Worse Ischemia-Reperfusion Injury and Biliary Injury After Liver Transplantation in Rats." *Transplantation Proceedings* 52(1): 373–82.
- Chen, Ze et al. 2020. "Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Free radical biology & medicine* 152: 116–41.
- Chintalgattu, Vishnu, Devi M Nair, and Laxmansa C Katwa. 2003. "Cardiac Myofibroblasts: A Novel Source of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptors Flt-1 and KDR." *Journal of molecular and cellular cardiology* 35(3): 277–86.

- Chishima, Sayaka et al. 2017. "The Relationship between the Growth Hormone/Insulin-like Growth Factor System and the Histological Features of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 56(5): 473–80.
- Cornell, R P. 1985. "Gut-Derived Endotoxin Elicits Hepatotrophic Factor Secretion for Liver Regeneration." *The American journal of physiology* 249(5 Pt 2): R551-62.
- Cornide-Petronio, María Eugenia et al. 2017. "The Impact of Cortisol in Steatotic and Non-Steatotic Liver Surgery." *Journal of cellular and molecular medicine* 21(10): 2344–58.
- 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.
- Corpechot, Christophe et al. 2002. "Hypoxia-Induced VEGF and Collagen I Expressions Are Associated with Angiogenesis and Fibrogenesis in Experimental Cirrhosis." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 35(5): 1010–21.
- Coulon, Stephanie et al. 2011. "Angiogenesis in Chronic Liver Disease and Its Complications." *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 31(2): 146–62.
- Cui, Beiyong et al. 2022. "HOXA13 Promotes Liver Regeneration through Regulation of BMP-7." *Biochemical and biophysical research communications* 623: 23–31.
- Dai, Qingqing et al. 2021. "Kupffer Cell-Targeting Strategy for the Protection of Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury." *Nanotechnology* 32(26).
- Damanik, Johanda, and Em Yunir. 2021. "Type 2 Diabetes Mellitus and Cognitive Impairment." *Acta medica Indonesiana* 53(2): 213–20.
- Dariushnejad, Hassan, Lale Pirzeh, Neda Roshanravan, and Vajihe Ghorbanzadeh. 2023. "Sodium Butyrate and Voluntary Exercise through Activating VEGF-A Downstream Signaling Pathway Improve Heart Angiogenesis in Type 2 Diabetes." *Microvascular research* 147: 104475.
- Date, M et al. 2000. "Differential Regulation of Activin A for Hepatocyte Growth and Fibronectin Synthesis in Rat Liver Injury." *Journal of hepatology* 32(2): 251–60.

- Davidson, Eric P. et al. 2018. "Vascular and Neural Complications in Type 2 Diabetic Rats: Improvement by Sacubitril/Valsartan Greater than Valsartan Alone." *Diabetes* 67(8): 1616–26.
- Davies, Scott P., Gary M. Reynolds, and Zania Stamataki. 2018. "Clearance of Apoptotic Cells by Tissue Epithelia: A Putative Role for Hepatocytes in Liver Efferocytosis." *Frontiers in Immunology* 9(JAN): 1–15.
- DeLeve, Laurie D. 2013. "Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Liver Regeneration." *The Journal of clinical investigation* 123(5): 1861–66.
- Demir, Sevgican, Peter P Nawroth, Stephan Herzig, and Bilgen Ekim Üstünel. 2021. "Emerging Targets in Type 2 Diabetes and Diabetic Complications." *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)* 8(18): e2100275.
- Desai, Shivani M., Avinash P. Sanap, and Ramesh R. Bhonde. 2020. "Treat Liver to Beat Diabetes." *Medical hypotheses* 144.
- Devlin, J, and J O'Grady. 1999. "Indications for Referral and Assessment in Adult Liver Transplantation: A Clinical Guideline. British Society of Gastroenterology." *Gut* 45 Suppl 6(Suppl VI): VI1–22.
- Dewidar, Bedair, Christoph Meyer, Steven Dooley, and And Nadja Meindl-Beinker. 2019. "TGF- $\beta$  in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019." *Cells* 8(11).
- Dieterle, A M et al. 2014. "PDK1 Controls Upstream PI3K Expression and PIP3 Generation." *Oncogene* 33(23): 3043–53.
- Ding, Bi-Sen et al. 2010. "Inductive Angiocrine Signals from Sinusoidal Endothelium Are Required for Liver Regeneration." *Nature* 468(7321): 310–15.
- Ding, Hui-Guo et al. 2005. "Combined Human Growth Hormone and Lactulose for Prevention and Treatment of Multiple Organ Dysfunction in Patients with Severe Chronic Hepatitis B." *World journal of gastroenterology* 11(19): 2981–83.
- Dixon, M, L Agius, S J Yeaman, and C P Day. 1999. "Inhibition of Rat Hepatocyte Proliferation by Transforming Growth Factor Beta and Glucagon Is Associated with Inhibition of ERK2 and P70 S6 Kinase." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 29(5): 1418–24.
- Do, Nhue et al. 2012. "BMP4 Is a Novel Paracrine Inhibitor of Liver Regeneration." *American*

*journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 303(11): G1220-7.

Donato, Jose Jr et al. 2021. "Central Regulation of Metabolism by Growth Hormone." *Cells* 10(1).

Driskill, Jordan H, and Duoja Pan. 2021. "The Hippo Pathway in Liver Homeostasis and Pathophysiology." *Annual review of pathology* 16: 299–322.

Du, Junbao et al. 2023. "An Optimized Method for Oil Red O Staining with the Salicylic Acid Ethanol Solution." *Adipocyte* 12(1): 2179334.

Dungan, Kathleen M., Susan S. Braithwaite, and Jean Charles Preiser. 2009. "Stress Hyperglycaemia." *The Lancet* 373(9677): 1798–1807.

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.

Ekberg, S, M Luther, T Nakamura, and J O Jansson. 1992. "Growth Hormone Promotes Early Initiation of Hepatocyte Growth Factor Gene Expression in the Liver of Hypophysectomized Rats after Partial Hepatectomy." *The Journal of endocrinology* 135(1): 59–67.

Elias-Miró, Maria et al. 2014. "Resistin and Visfatin in Steatotic and Non-Steatotic Livers in the Setting of Partial Hepatectomy under Ischemia-Reperfusion." *Journal of Hepatology* 60(1): 87–95.

Elias, Ivet et al. 2012. "Adipose Tissue Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor Protects against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance." *Diabetes* 61(7): 1801–13.

Falkevall, Annelie et al. 2017. "Reducing VEGF-B Signaling Ameliorates Renal Lipotoxicity and Protects against Diabetic Kidney Disease." *Cell Metabolism* 25(3): 713–26.

Falkevall, Annelie et al. 2023. "Inhibition of VEGF-B Signaling Prevents Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Development by Targeting Lipolysis in the White Adipose Tissue." *Journal of Hepatology* 78(5): 901–13.

Fang, Dazheng, Ying He, and Zhou Luan. 2017. "Simvastatin Augments Activation of Liver Regeneration through Attenuating Transforming Growth Factor-B1 Induced-Apoptosis in Obstructive Jaundice Rats." *Experimental and therapeutic medicine* 14(5): 4839–45.

- Fernández, Mercedes et al. 2009. "Angiogenesis in Liver Disease." *Journal of hepatology* 50(3): 604–20.
- Ferrara, Napoleone, and Robert S Kerbel. 2005. "Angiogenesis as a Therapeutic Target." *Nature* 438(7070): 967–74.
- Francés, Daniel E et al. 2011. "Role of Reactive Oxygen Species in the Early Stages of Liver Regeneration in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats." *Free radical research* 45(10): 1143–53.
- Fu, Si-Yuan et al. 2009. "Liver Resection with Selective Hepatic Vascular Exclusion: A Cohort Study." *Annals of surgery* 249(4): 624–27.
- Gasbarrini, Antonio et al. 1992. "Effect of Anoxia on Intracellular ATP, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Cytotoxicity in Rat Hepatocytes." *Journal of Biological Chemistry* 267(10): 6654–63.
- Gitto, Stefano et al. 2020. "Alcohol Use Disorder and Liver Transplant: New Perspectives and Critical Issues." *The Korean journal of internal medicine* 35(4): 797–810.
- González-Flecha, B, J C Cutrin, and A Boveris. 1993. "Time Course and Mechanism of Oxidative Stress and Tissue Damage in Rat Liver Subjected to in Vivo Ischemia-Reperfusion." *The Journal of clinical investigation* 91(2): 456–64.
- Gu, Yanli et al. 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.
- Gulfo, José et al. 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.
- van Gulik, Thomas M et al. 2007. "Vascular Occlusion Techniques during Liver Resection." *Digestive surgery* 24(4): 274–81.
- Hagberg, Carolina E. et al. 2012. "Targeting VEGF-B as a Novel Treatment for Insulin Resistance and Type 2 Diabetes." *Nature* 490(7420): 426–30.
- Haglind, E, K Malmlof, J Fan, and C H Lang. 1998. "Insulin-like Growth Factor-I and Growth Hormone Administration in Intestinal Ischemia Shock in the Rat." *Shock (Augusta, Ga.)* 10(1): 62–68.

- Han, Sangbin et al. 2014. "Intraoperative Hyperglycemia during Liver Resection: Predictors and Association with the Extent of Hepatocytes Injury." *PLoS ONE* 9(10).
- Harjumäki, Riina, Chris S Pridgeon, and Magnus Ingelman-Sundberg. 2021. "CYP2E1 in Alcoholic and Non-Alcoholic Liver Injury. Roles of ROS, Reactive Intermediates and Lipid Overload." *International journal of molecular sciences* 22(15).
- Hayashi, H, I H Chaudry, M G Clemens, and A E Baue. 1986. "Hepatic Ischemia Models for Determining the Effects of ATP-MgCl<sub>2</sub> Treatment." *The Journal of surgical research* 40(2): 167–75.
- Hernández-Évole, Helena, Natalia Jiménez-Esquivel, Elisa Pose, and Ramón Bataller. 2024. "Alcohol-Associated Liver Disease: Epidemiology and Management." *Annals of hepatology* 29(1): 101162.
- Hide, Diana et al. 2016. "Effects of Warm Ischemia and Reperfusion on the Liver Microcirculatory Phenotype of Rats: Underlying Mechanisms and Pharmacological Therapy." *Scientific Reports* 6(February): 1–12.
- Holmes, Amey, Lawrence J. Coppey, Eric P. Davidson, and Mark A. Yorek. 2015. "Rat Models of Diet-Induced Obesity and High Fat/Low Dose Streptozotocin Type 2 Diabetes: Effect of Reversal of High Fat Diet Compared to Treatment with Enalapril or Menhaden Oil on Glucose Utilization and Neuropathic Endpoints." *Journal of Diabetes Research* 2015.
- Hu, Lei et al. 2021. "Vascular Endothelial Growth Factor B Exerts Lipid-Lowering Effect by Activating AMPK via VEGFR1." *Life Sciences* 276(January): 119401.
- Huang, Hai et al. 2011. "Endogenous Histones Function as Alarmins in Sterile Inflammatory Liver Injury through Toll-like Receptor 9 in Mice." *Hepatology* 54(3): 999–1008.
- Huet, Pierre-Michel et al. 2004. "Sinusoidal Endothelial Cell and Hepatocyte Death Following Cold Ischemia-Warm Reperfusion of the Rat Liver." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 39(4): 1110–19.
- Ikeda, T et al. 1992. "Ischemic Injury in Liver Transplantation: Difference in Injury Sites between Warm and Cold Ischemia in Rats." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 16(2): 454–61.
- Ishikawa, Mayumi et al. 2021. "Growth Hormone Stops Excessive Inflammation After Partial Hepatectomy, Allowing Liver Regeneration and Survival Through Induction of H2-BI/HLA-G." *Hepatology* 73(2): 759–75.

- Ishrat, Tauheed et al. 2018. "Silencing VEGF-B Diminishes the Neuroprotective Effect of Candesartan Treatment After Experimental Focal Cerebral Ischemia." *Neurochemical Research* 43(10): 1869–78.
- Islam, S M Touhidul et al. 2023. "Unsaturated or Saturated Dietary Fat-Mediated Steatosis Impairs Hepatic Regeneration Following Partial Hepatectomy in Mice." *PloS one* 18(5): e0284428.
- Jaeschke, Hartmut. 2003. "Molecular Mechanisms of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Preconditioning." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 284(1 47-1).
- Jang, Hyung Seok et al. 2020. "Treatment of Growth Hormone Attenuates Hepatic Steatosis in Hyperlipidemic Mice via Downregulation of Hepatic CD36 Expression." *Animal cells and systems* 24(3): 151–59.
- Jaroszewicz, Jerzy et al. 2008. "Circulating Vascular Endothelial Growth Factor and Its Soluble Receptors in Patients with Liver Cirrhosis: Possible Association with Hepatic Function Impairment." *Cytokine* 44(1): 14–17.
- Jia, Kexin et al. 2023. "Acteoside Ameliorates Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury via Reversing the Senescent Fate of Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Restoring Compromised Sinusoidal Networks." *International journal of biological sciences* 19(15): 4967–88.
- Jiménez-Castro, M. B., J. Gracia-Sancho, and C. Peralta. 2015. "Brain Death and Marginal Grafts in Liver Transplantation." *Cell Death and Disease* 6(6).
- Jiménez-Castro, Mónica B. et al. 2017. "The Effect of Cortisol in Rat Steatotic and Non-Steatotic Liver Transplantation from Brain-Dead Donors." *Clinical Science* 131(8): 733–46.
- Jiménez-Castro, Mónica B., María Eugenia Cornide-Petronio, Jordi Gracia-Sancho, and Carmen Peralta. 2019. "Inflammasome-Mediated Inflammation in Liver Ischemia-Reperfusion Injury." *Cells* 8(10): 1–26.
- Jin, Honghong et al. 2018. "VEGF and VEGFB Play Balancing Roles in Adipose Differentiation, Gene Expression, and Function." *Endocrinology* 159(5): 2036–49.
- Kalra, Arjun, Ekrem Yetiskul, Chase J Wehrle, and Faiz Tuma. 2024. "Physiology, Liver." In *Treasure Island (FL)*.

- Kaltenmeier, Christof et al. 2022. "Role of Immuno-Inflammatory Signals in Liver Ischemia-Reperfusion Injury." *Cells* 11(14).
- Kamada, Naoshi, and Roy Y. Calne. 1979. "Orthotopic Liver Transplantation in the Rat. Technique Using Cuff for Portal Vein Anastomosis and Biliary Drainage." *Transplantation* 28(1): 47–50.
- Kanda, Mitsuro et al. 2008. "Correlations of the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor B and Its Isoforms in Hepatocellular Carcinoma with Clinico-Pathological Parameters." *Journal of surgical oncology* 98(3): 190–96.
- Kaseb, Ahmed O et al. 2022. "Blockade of Growth Hormone Receptor Signaling by Using Pegvisomant: A Functional Therapeutic Strategy in Hepatocellular Carcinoma." *Frontiers in oncology* 12: 986305.
- Kasztelan-Szczerbinska, Beata et al. 2014. "Angiogenesis-Related Biomarkers in Patients with Alcoholic Liver Disease: Their Association with Liver Disease Complications and Outcome." *Mediators of inflammation* 2014: 673032.
- Kaya, Dilaver et al. 2005. "VEGF Protects Brain against Focal Ischemia without Increasing Blood--Brain Permeability When Administered Intracerebroventricularly." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25(9): 1111–18.
- Kimura, Mitsutoshi, and Masahiko Ogihara. 1997. "Proliferation of Adult Rat Hepatocytes in Primary Culture Induced by Insulin Is Potentiated by CAMP-Elevating Agents." *European Journal of Pharmacology* 327(1): 87–95.
- Kivelä, Riikka 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.
- Koch, Sina, and Lena Claesson-Welsh. 2012. "Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(7): a006502.
- Kong, Ling-Zu et al. 2019. "Pathogenesis, Early Diagnosis, and Therapeutic Management of Alcoholic Liver Disease." *International journal of molecular sciences* 20(11).
- Kowluru, Renu A. 2020. "Retinopathy in a Diet-Induced Type 2 Diabetic Rat Model and Role of Epigenetic Modifications." *Diabetes* 69(4): 689–98.

- Lal, Nathaniel et al. 2017. "Loss of VEGFB and Its Signaling in the Diabetic Heart Is Associated with Increased Cell Death Signaling." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 312(6): H1163–75.
- Lal, Nathaniel, Karanjit Puri, and Brian Rodrigues. 2018. "Vascular Endothelial Growth Factor B and Its Signaling." *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 5(April): 1–9.
- Lesurtel, Mickael et al. 2006. "Platelet-Derived Serotonin Mediates Liver Regeneration." *Science* 312(5770): 104–7.
- Li, Lu et al. 2023. "Kupffer-Cell-Derived IL-6 Is Repurposed for Hepatocyte Dedifferentiation via Activating Progenitor Genes from Injury-Specific Enhancers." *Cell stem cell* 30(3): 283–299.e9.
- Li, Qiang et al. 2018. "The Ileal FGF15/19 to Hepatic FGFR4 Axis Regulates Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice." *Journal of physiology and biochemistry* 74(2): 247–60.
- Li, Qingshan et al. 2017. "Clinical Outcomes of Patients with and without Diabetes Mellitus after Hepatectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis." *PLoS ONE* 12(2): 1–16.
- Li, Rongrong et al. 2022. "Reducing VEGFB Accelerates NAFLD and Insulin Resistance in Mice via Inhibiting AMPK Signaling Pathway." *Journal of Translational Medicine* 20(1): 1–18.
- Li, Suyi et al. 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.
- Li, Yanshan et al. 2020. "Expression of Notch-Hif-1 $\alpha$  Signaling Pathway in Liver Regeneration of Rats." *The Journal of international medical research* 48(9): 300060520943790.
- Liebermann, T A, and D Baltimore. 1990. "Activation of Interleukin-6 Gene Expression through the NF-Kappa B Transcription Factor." *Molecular and cellular biology* 10(5): 2327–34.
- Lin, Yan et al. 2011. "The Effects of Recombinant Human GH on Promoting Tumor Growth Depend on the Expression of GH Receptor in Vivo." *The Journal of endocrinology* 211(3): 249–56.
- Ling, Mingfa et al. 2021. "VEGFB Promotes Myoblasts Proliferation and Differentiation through VEGFR1-PI3K/Akt Signaling Pathway." *International journal of molecular sciences* 22(24).

- Liu, Jinyao. 2014. "Ethanol and Liver: Recent Insights into the Mechanisms of Ethanol-Induced Fatty Liver." *World journal of gastroenterology* 20(40): 14672–85.
- Liu, Lei, Yanlin Gao, and Shiqi Yao. 2024. "Transthyretin-Regulated Diabetic Retinopathy Through the VEGFA/PI3K/AKT Pathway." *Investigative ophthalmology & visual science* 65(1): 45.
- Liu, Szu-Yi, I-Ting Tsai, and Yin-Chou Hsu. 2021. "Alcohol-Related Liver Disease: Basic Mechanisms and Clinical Perspectives." *International journal of molecular sciences* 22(10).
- Luo, Ruiying, Zhen Yi, Weihong Wu, and Wen Meng. 2021. "The mRNA Levels of PPAR $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ , and VEGF in the Liver Tissues of Rats with Alcoholic Liver Disease." *American journal of translational research* 13(10): 11932–37.
- Luo, Xu et al. 2022. "Reducing VEGFB Expression Regulates the Balance of Glucose and Lipid Metabolism in Mice via VEGFR1." *Molecular Medicine Reports* 26(3): 1–15.
- Lv, Yan-Xia et al. 2018. "VEGF-A and VEGF-B Coordinate the Arteriogenesis to Repair the Infarcted Heart with Vagus Nerve Stimulation." *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 48(2): 433–49.
- Maki, Harufumi, and Kiyoshi Hasegawa. 2022. "Advances in the Surgical Treatment of Liver Cancer." *BioScience Trends* 16(3): 178–88.
- Manning, Brendan D, and Alex Toker. 2017. "AKT/PKB Signaling: Navigating the Network." *Cell* 169(3): 381–405.
- Mărgăritescu, Otilia, D Pirici, and CI Mărgăritescu. 2011. "VEGF Expression in Human Brain Tissue after Acute Ischemic Stroke." *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 52(4): 1283–92.
- Marušić, Marinko, Matej Paić, Mia Knobloch, and Ana Marija Liberati Pršo. 2021. "NAFLD, Insulin Resistance, and Diabetes Mellitus Type 2." *Canadian journal of gastroenterology & hepatology* 2021.
- Massip-Salcedo, M. et al. 2007. "The Response of the Hepatocyte to Ischemia." *Liver International* 27(1): 6–16.

- Matejka, G L, and B A Bengtsson. 1998. "High Dosage Growth Hormone Treatment and Post-Ischemic Acute Renal Failure in the Rat." *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 8(2): 151–57.
- Maycas, M. et al. 2015. "The VEGF (VEGFR2) 2 Receptor and PTH (PTH1R) 1 Receptor Act as Mediators in the Anti-Apoptotic Response to Mechanical Stimulus in MLO-Y4 Osteocyte-like Cell." *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* 7(4): 91–97.
- 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.
- Melincovici, Carmen Stanca et al. 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 et al. 2014. "The Effects of Glucose and Lipids in Steatotic and Non-Steatotic Livers in Conditions of Partial Hepatectomy under Ischaemia-Reperfusion." *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 34(7): e271-89.
- Micó-Carnero, Marc et al. 2020. "Effects of Gut Metabolites and Microbiota in Healthy and Marginal Livers Submitted to Surgery." *International Journal of Molecular Sciences* 22(1): 44.
- Micó-Carnero, Marc et al. 2021. "Effects of Gut Metabolites and Microbiota in Healthy and Marginal Livers Submitted to Surgery." *International Journal of Molecular Sciences* 22(1): 1–28.
- Micó-Carnero, Marc et al. 2022. "The Role of Neuregulin-1 in Steatotic and Non-Steatotic Liver Transplantation from Brain-Dead Donors." *Biomedicines* 10(5).
- Milosevic, Ivana et al. 2019. "Gut-Liver Axis, Gut Microbiota, and Its Modulation in the Management of Liver Diseases: A Review of the Literature." *International Journal of Molecular Sciences* 20(2): 395.
- Mobarak, Shahd et al. 2022. "Selective Hepatic Vascular Exclusion versus Pringle Maneuver in Major Hepatectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Frontiers in Surgery*

9(April): 1–11.

Mochida, S et al. 1994. “Oxidative Stress in Hepatocytes and Stimulatory State of Kupffer Cells after Reperfusion Differ between Warm and Cold Ischemia in Rats.” *Liver* 14(5): 234–40.

Møller, Niels, and Jens Otto Lunde Jørgensen. 2009. “Effects of Growth Hormone on Glucose, Lipid, and Protein Metabolism in Human Subjects.” *Endocrine reviews* 30(2): 152–77.

Montalti, R. et al. 2004. “Donor Pool Expansion in Liver Transplantation.” *Transplantation Proceedings* 36(3): 520–22.

Moseley, C T, and J A 3rd Phillips. 2000. “Pituitary Gene Mutations and the Growth Hormone Pathway.” *Seminars in reproductive medicine* 18(1): 21–29.

Mownah, Omar A., and Somaiah Aroori. 2023. “The Pringle Maneuver in the Modern Era: A Review of Techniques for Hepatic Inflow Occlusion in Minimally Invasive Liver Resection.” *Annals of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* 27(2): 131–40.

Naseem, Sidrah, Tabinda Hussain, and Sobia Manzoor. 2018. “Interleukin-6: A Promising Cytokine to Support Liver Regeneration and Adaptive Immunity in Liver Pathologies.” *Cytokine & growth factor reviews* 39: 36–45.

Neuberger, J. 2004. “Developments in Liver Transplantation.” *Gut* 53(5): 759–68.

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.

Niederreiter, Lukas, and Herbert Tilg. 2018. “Cytokines and Fatty Liver Diseases.” *Liver Research* 2(1): 14–20.

Ning, Frank Chenfei et al. 2020. “VEGF-B Ablation in Pancreatic  $\beta$ -Cells Upregulates Insulin Expression without Affecting Glucose Homeostasis or Islet Lipid Uptake.” *Scientific reports* 10(1): 923.

Nishii, Kenichiro et al. 2018. “Shear Stress Upregulates Regeneration-Related Immediate Early Genes in Liver Progenitors in 3D ECM-like Microenvironments.” *Journal of cellular physiology* 233(5): 4272–81.

Nishizawa, Hitoshi et al. 2012. “Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adult Hypopituitary Patients with GH Deficiency and the Impact of GH Replacement Therapy.” *European journal of*

*endocrinology* 167(1): 67–74.

Nishizawa, Hitoshi et al. 2016. “IGF-I Induces Senescence of Hepatic Stellate Cells and Limits Fibrosis in a P53-Dependent Manner.” *Scientific reports* 6: 34605.

Oduk, Yasin et al. 2018. “VEGF Nanoparticles Repair the Heart after Myocardial Infarction.” *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 314(2): H278–84.

Okamura, Yurika, Akira Omori, Norihiko Asada, and Akifumi Ono. 2018. “Effects of Vitamin C and E on Toxic Action of Alcohol on Partial Hepatectomy-Induced Liver Regeneration in Rats.” *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 63(1): 50–57.

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

Ozaki, Michitaka. 2020. “Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Regeneration: Proliferation, Growth, Death and Protection of Hepatocytes.” *Seminars in cell & developmental biology* 100: 62–73.

De Palo, E F et al. 2001. “GH/IGF System, Cirrhosis and Liver Transplantation.” *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 310(1): 31–37.

Pan, Evelyn T. et al. 2018. “Cold Ischemia Time Is an Important Risk Factor for Post–Liver Transplant Prolonged Length of Stay.” *Liver Transplantation* 24(6): 762–68.

Patel, Parita Virendra, and Steven L Flamm. 2023. “Alcohol-Related Liver Disease Including New Developments.” *Clinics in liver disease* 27(1): 157–72.

Pennisi, Patricia A et al. 2004. “Role of Growth Hormone (GH) in Liver Regeneration.” *Endocrinology* 145(10): 4748–55.

Peralta, C. et al. 2000. “Hepatic Preconditioning Preserves Energy Metabolism during Sustained Ischemia.” *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 279(1 42-1): 163–71.

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.

Perry, Brandon C., Douglas Soltys, Alexander H. Toledo, and Luis H. Toledo-Pereyra. 2011. “Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Liver Ischemia/Reperfusion Injury.” *Journal of Investigative Surgery* 24(4): 178–88.

- Piazza, Verónica G et al. 2020. "Exposure to Growth Hormone Is Associated with Hepatic Up-Regulation of CPLA2 $\alpha$  and COX." *Molecular and cellular endocrinology* 509: 110802.
- Pickup, John C. 2004. "Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes." *Diabetes Care* 27(3): 813–23.
- Plöckinger, Ursula et al. 2007. "Hepatitis-C Patients Have Reduced Growth Hormone (GH) Secretion Which Improves during Long-Term Therapy with Pegylated Interferon-Alpha." *The American journal of gastroenterology* 102(12): 2724–31.
- Poon, R T et al. 2001. "Serum Vascular Endothelial Growth Factor Predicts Venous Invasion in Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Study." *Annals of surgery* 233(2): 227–35.
- Poon, R T, S T Fan, and J Wong. 2001. "Clinical Implications of Circulating Angiogenic Factors in Cancer Patients." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19(4): 1207–25.
- Pugh, Christopher W, and Peter J Ratcliffe. 2003. "Regulation of Angiogenesis by Hypoxia: Role of the HIF System." *Nature medicine* 9(6): 677–84.
- Radic, I. et al. 2019. "Protective Effects of Whey on Rat Liver Damage Induced by Chronic Alcohol Intake." *Human and Experimental Toxicology* 38(6): 632–45.
- Ran, Tao et al. 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.
- Robciuc, Marius R et al. 2016. "VEGFB/VEGFR1-Induced Expansion of Adipose Vasculature Counteracts Obesity and Related Metabolic Complications." *Cell metabolism* 23(4): 712–24.
- Le Roy, B. et al. 2018. "Liver Hypertrophy: Underlying Mechanisms and Promoting Procedures before Major Hepatectomy." *Journal of Visceral Surgery* 155(5): 393–401.
- Ruze, Rexiati et al. 2023. "Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus: Connections in Epidemiology, Pathogenesis, and Treatments." *Frontiers in Endocrinology* 14(April): 1–23.
- Salcedo Mora, X. et al. 2005. "Association between Angiogenesis Soluble Factors and Disease Progression Markers in Chronic Hepatitis C Patients." *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 97(10): 699–702.

- Santolaria, F et al. 1995. "Effects of Alcohol and Liver Cirrhosis on the GH-IGF-I Axis." *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 30(6): 703–8.
- Sato, Keisaku et al. 2019. "Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 69(1): 420–30.
- Sato, Yoshinobu, Shuntaro Koyama, Kazuhiro Tsukada, and Katsuyoshi Hatakeyama. 1997. "Acute Portal Hypertension Reflecting Shear Stress as a Trigger of Liver Regeneration Following Partial Hepatectomy." *Surgery today* 27(6): 518–26.
- Scacchi, M, A I Pincelli, and F Cavagnini. 1999. "Growth Hormone in Obesity." *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 23(3): 260–71.
- Scheving, Lawrence A et al. 2002. "Integral Role of the EGF Receptor in HGF-Mediated Hepatocyte Proliferation." *Biochemical and biophysical research communications* 290(1): 197–203.
- Schwabe, Robert F, and David A Brenner. 2006. "Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-Alpha-Induced Liver Injury: Role of IKK, JNK, and ROS Pathways." *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 290(4): G583–9.
- Schwanhüusser, Björn et al. 2011. "Global Quantification of Mammalian Gene Expression Control." *Nature* 473(7347): 337–42.
- Segnani, Cristina et al. 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.
- Seitz, Helmut K et al. 2018. "Alcoholic Liver Disease." *Nature reviews. Disease primers* 4(1): 16.
- Selzner, Markus, Carlos A. Camargo, and Pierre Alain Clavien. 1999. "Ischemia Impairs Liver Regeneration after Major Tissue Loss in Rodents: Protective Effects of Interleukin-6." *Hepatology* 30(2): 469–75.
- Serafín, Anna et al. 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.
- Shen, Zhijie, Zhihui Zhang, Xiaoyan Wang, and Kan Yang. 2018. "VEGFB-VEGFR1 Ameliorates

- Ang II-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy through Ca(2+) -Mediated PKG I Pathway.” *Journal of cellular biochemistry* 119(2): 1511–20.
- Shibuya, Masabumi, Haruka Matsui, Tadashi Sasagawa, and Takeshi Nagamatsu. 2021. “A Simple Detection Method for the Serum SFLT1 Protein in Preeclampsia.” *Scientific reports* 11(1): 20613.
- Shido, Koji et al. 2017. “Platelets Prime Hematopoietic–Vascular Niche to Drive Angiocrine-Mediated Liver Regeneration.” *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2(November 2016): 1–9.
- Sindram, David et al. 2000. “Platelets Induce Sinusoidal Endothelial Cell Apoptosis upon Reperfusion of the Cold Ischemic Rat Liver.” *Gastroenterology* 118(1): 183–91.
- Sobrevals, Luciano et al. 2010. “Insulin-like Growth Factor I Gene Transfer to Cirrhotic Liver Induces Fibrolysis and Reduces Fibrogenesis Leading to Cirrhosis Reversion in Rats.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51(3): 912–21.
- Song, Junyoung, Kicheol Park, Hakil Lee, and Minyoung Kim. 2012. “The Effect of Recombinant Human Growth Hormone Therapy in Patients with Completed Stroke: A Pilot Trial.” *Annals of rehabilitation medicine* 36(4): 447–57.
- Søreide, Jon Arne, and Rahul Deshpande. 2021. “Post Hepatectomy Liver Failure (PHLF) – Recent Advances in Prevention and Clinical Management.” *European Journal of Surgical Oncology* 47(2): 216–24.
- Staels, Willem, Yves Heremans, Harry Heimberg, and Nico De Leu. 2019. “VEGF-A and Blood Vessels: A Beta Cell Perspective.” *Diabetologia* 62(11): 1961–68.
- Szarka, Nikolett et al. 2021. “Effect of Growth Hormone on Neuropsychological Outcomes and Quality of Life of Patients with Traumatic Brain Injury: A Systematic Review.” *Journal of neurotrauma* 38(11): 1467–83.
- Takeishi, Toshiyuki et al. 1999. “The Role of Kupffer Cells in Liver Regeneration.” *Archives of histology and cytology* 62(5): 413–22.
- Tamagawa, Koji et al. 2008. “Hepatic Ischemia-Reperfusion Increases Vascular Endothelial Growth Factor and Cancer Growth in Rats.” *The Journal of surgical research* 148(2): 158–63.

- Tanase, Daniela Maria et al. 2020. "The Intricate Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Insulin Resistance (IR), and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)." *Journal of diabetes research* 2020: 3920196.
- Thursz, Mark, and Anne Lingford-Hughes. 2023. "Advances in the Understanding and Management of Alcohol-Related Liver Disease." *BMJ (Clinical research ed.)* 383: e077090.
- Tilg, Herbert, Timon E Adolph, and Michael Trauner. 2022. "Gut-Liver Axis: Pathophysiological Concepts and Clinical Implications." *Cell metabolism* 34(11): 1700–1718.
- Trefts, Elijah, Maureen Gannon, and David H Wasserman. 2017. "The Liver." *Current biology : CB* 27(21): R1147–51.
- Tsuchihashi, Sei Ichiro et al. 2006. "Vascular Endothelial Growth Factor Antagonist Modulates Leukocyte Trafficking and Protects Mouse Livers against Ischemia/Reperfusion Injury." *American Journal of Pathology* 168(2): 695–705.
- Uda, Yugo et al. 2013. "Angiogenesis Is Crucial for Liver Regeneration after Partial Hepatectomy." *Surgery (United States)* 153(1): 70–77.
- Urias, Elizabeth A et al. 2017. "Novel Therapeutic Targets in Diabetic Macular Edema: Beyond VEGF." *Vision research* 139: 221–27.
- Ushio-Fukai, Masuko, and Yoshimasa Nakamura. 2008. "Reactive Oxygen Species and Angiogenesis: NADPH Oxidase as Target for Cancer Therapy." *Cancer letters* 266(1): 37–52.
- Valdecantos, M. Pilar et al. 2018. "Differential Effects of a Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonist in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and in Response to Hepatectomy." *Scientific Reports* 8(1): 1–15.
- Viigimaa, Margus et al. 2020. "Macrovascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus." *Current vascular pharmacology* 18(2): 110–16.
- Vogel, Christine et al. 2010. "Sequence Signatures and mRNA Concentration Can Explain Two-Thirds of Protein Abundance Variation in a Human Cell Line." *Molecular Systems Biology* 6(400): 1–9.
- Wajant, H, K Pfizenmaier, and P Scheurich. 2003. "Tumor Necrosis Factor Signaling." *Cell death and differentiation* 10(1): 45–65.

- Wallace, Jennifer D et al. 2002. "GH Treatment in Adults with Chronic Liver Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Cross-over Study." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87(6): 2751–59.
- Wang, Kewei, Minhua Wang, Maureen Gannon, and AiXuan Holterman. 2016. "Growth Hormone Mediates Its Protective Effect in Hepatic Apoptosis through Hnf6." *PLoS one* 11(12): e0167085.
- Wang, Wenjie et al. 2019. "GDF11 Impairs Liver Regeneration in Mice after Partial Hepatectomy." *Clinical science (London, England : 1979)* 133(20): 2069–84.
- Wang, Xiangdong et al. 2020. "Susceptibility of Rat Steatotic Liver to Ischemia-Reperfusion Is Treatable With Liver-Selective Matrix Metalloproteinase Inhibition." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 72(5): 1771–85.
- Wang, Xiangdong, Ana C Maretti-Mira, Lei Wang, and Laurie D DeLeve. 2019. "Liver-Selective MMP-9 Inhibition in the Rat Eliminates Ischemia-Reperfusion Injury and Accelerates Liver Regeneration." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 69(1): 314–28.
- Wang, Zheng et al. 2011. "RhGH Attenuates Ischemia Injury of Intrahepatic Bile Ducts Relating to Liver Transplantation." *The Journal of surgical research* 171(1): 300–310.
- Weddell, Jared C, Si Chen, and P I Imoukhuede. 2018. "VEGFR1 Promotes Cell Migration and Proliferation through PLC $\gamma$  and PI3K Pathways." *NPJ systems biology and applications* 4: 1.
- Wells, John A et al. 2016. "Aflibercept, Bevacizumab, or Ranibizumab for Diabetic Macular Edema: Two-Year Results from a Comparative Effectiveness Randomized Clinical Trial." *Ophthalmology* 123(6): 1351–59.
- White, Amanda Louise, and Gregory Jaye Bix. 2023. "VEGFA Isoforms as Pro-Angiogenic Therapeutics for Cerebrovascular Diseases." *Biomolecules* 13(4).
- Wu, Yi et al. 2023. "Biomechanics in Liver Regeneration after Partial Hepatectomy." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 11(May): 1–16.
- Xu, Cui-Ping, Wen-Min Ji, Gijs R van den Brink, and Maikel P Peppelenbosch. 2006. "Bone Morphogenetic Protein-2 Is a Negative Regulator of Hepatocyte Proliferation Downregulated in the Regenerating Liver." *World journal of gastroenterology* 12(47): 7621–25.

- Xu, Fengyun, Changwei Liu, Dandan Zhou, and Lei Zhang. 2016. "TGF- $\beta$ /SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis." *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 64(3): 157–67.
- Xu, Lei et al. 2012. "Association between Serum Growth Hormone Levels and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Cross-Sectional Study." *PloS one* 7(8): e44136.
- Xue, Jiang, Shuang Liang, Jiahui Ma, and Yanfeng Xiao. 2022. "Effect of Growth Hormone Therapy on Liver Enzyme and Other Cardiometabolic Risk Factors in Boys with Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *BMC endocrine disorders* 22(1): 49.
- Yagi, Shintaro, Masaaki Hirata, Yosuke Miyachi, and Shinji Uemoto. 2020. "Liver Regeneration after Hepatectomy and Partial Liver Transplantation." *International Journal of Molecular Sciences* 21(21): 1–23.
- Yang, Shi-Ye et al. 2022. "Impact of Type 2 Diabetes Mellitus on the Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma after Laparoscopic Liver Resection: A Multicenter Retrospective Study." *Frontiers in oncology* 12: 979434.
- Zafar, Mohammad Ishraq et al. 2017. "The Role of Vascular Endothelial Growth Factor-B in Metabolic Homeostasis: Current Evidence." *Bioscience reports* 37(4).
- Zdujic, Predrag et al. 2024. "Impact of Prolonged Liver Ischemia during Intermittent Pringle Maneuver on Postoperative Outcome Following Liver Resection." *Asian Journal of Surgery*. Mar 13:S1015-9584(24)00432-9.
- Zhang, Changwen, Jillian L Ellis, and Chunyue Yin. 2016. "Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Facilitates Liver Repair from Acute Ethanol-Induced Injury in Zebrafish." *Disease models & mechanisms* 9(11): 1383–96.
- Zhang, Chunyan et al. 2024. "Signaling Pathways of Liver Regeneration: Biological Mechanisms and Implications." *iScience* 27(1): 108683.
- Zhang, Feng et al. 2018. "Lacteal Junction Zippering Protects against Diet-Induced Obesity." *Science* 361(6402): 599–603.
- Zhang, Yuli, Tuming Shen, and Songtao Wang. 2022. "Progression from Prediabetes to Type 2 Diabetes Mellitus Induced by Overnutrition." *Hormones* 21(4): 591–97.
- Zhao, Yang, Wenling Ye, Yan-Dong Wang, and Wei-Dong Chen. 2022. "HGF/c-Met: A Key

Promoter in Liver Regeneration." *Frontiers in pharmacology* 13: 808855.

Zhong, Hua et al. 2019. "Panax Notoginseng Saponins Promote Liver Regeneration through Activation of the PI3K/AKT/MTOR Cell Proliferation Pathway and Upregulation of the AKT/Bad Cell Survival Pathway in Mice." *BMC complementary and alternative medicine* 19(1): 122.

## Anexo

Los artículos en los que el doctorando ha participado relacionados con el tema de la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1) **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

- 2) 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

- 3) 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.

IF: 6.706

- 4) 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.

IF: 4.7

- 5) 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.

IF: 6.081

- 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.

IF: 5.924

- 7) 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.

IF: 7.666

- 8) 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.

IF: 6.0

- 9) 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.

IF: 4.757

# 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 <sup>1,2†</sup>, Marc Micó-Carnero <sup>1,2†</sup>, Cristina Maroto-Serrat <sup>1,2</sup>, Arani Casillas-Ramírez <sup>3,4\*</sup> and Carmen Peralta <sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, 08036, Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain.

<sup>3</sup> Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria, IMSS-BIENESTAR, 87087 Ciudad Victoria, Mexico.

<sup>4</sup> 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; arany@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.

# 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<sup>1,2,†</sup>, Carlos Rojano-Alfonso<sup>1,2,†</sup>, Cristina Maroto-Serrat<sup>1,2</sup>, Juan Carlos**  
4     **Cutrin<sup>3</sup>, Araní Casillas-Ramírez<sup>4,5,‡</sup> and Carmen Peralta<sup>1,‡\*</sup>**

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

7     <sup>2</sup>Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

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

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

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

14

15    <sup>†</sup> These authors contributed equally to this work

16    <sup>‡</sup> These authors contributed equally to this work

17    \*Correspondence: [cperalta@recerca.clinic.cat](mailto:cperalta@recerca.clinic.cat); [aranyc@yahoo.com](mailto: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 Dietary Nutritional Treatment on Hepatic and Intestinal Damage in Transplantation with Steatotic and Non-Steatotic Liver Grafts from Brain Dead Donors

Marc Micó-Carnero <sup>1,†</sup>, Araní Casillas-Ramírez <sup>2,3,†</sup>, Albert Caballeria-Casals <sup>1</sup>, Carlos Rojano-Alfonso <sup>1</sup>, Alfredo Sánchez-González <sup>2</sup> and Carmen Peralta <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 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.)

<sup>2</sup> Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria "Bicentenario 2010", 87087 Ciudad Victoria, Mexico; arany@yahoo.com (A.C.-R.); asg\_4@live.com (A.S.-G.)

<sup>3</sup> 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-Carnero, 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/>).

**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 <sup>1,†</sup>, Araní Casillas-Ramírez <sup>2,3,†</sup>, Alfredo Sánchez-González <sup>2</sup>, Carlos Rojano-Alfonso <sup>1</sup> and Carmen Peralta <sup>1,\*</sup>

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

<sup>2</sup> Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria "Bicentenario 2010", Ciudad Victoria 87087, Mexico; aranyr@yahoo.com (A.C.-R.); asg\_4@live.com (A.S.-G.)

<sup>3</sup> 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 NRG-1-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



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

Ana Isabel Álvarez-Mercado<sup>1,2,3†</sup>, Carlos Rojano-Alfonso<sup>4†</sup>, Marc Micó-Carnero<sup>4</sup>, Albert Caballeria-Casals<sup>4</sup>, Carmen Peralta<sup>4\*†</sup> and Arani Casillas-Ramírez<sup>5,6\*†</sup>

## 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  
aranc@yaho.com

<sup>†</sup>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

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology II, School of Pharmacy, Granada, Spain, <sup>2</sup> Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Biomedical Research Center, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Granada, Spain, <sup>3</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria Ibs. GRANADA, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Granada, Spain, <sup>4</sup> Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, <sup>5</sup> Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria "Bicentenario 2010", Ciudad Victoria, Mexico, <sup>6</sup> 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

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

Marc Micó-Carnero <sup>1,†</sup>, Carlos Rojano-Alfonso <sup>1,†</sup>, Ana Isabel Álvarez-Mercado <sup>2,3,4</sup>, Jordi Gracia-Sancho <sup>5,6</sup>, Araní Casillas-Ramírez <sup>7,8,‡</sup> and Carmen Peralta <sup>1,\*,‡</sup>

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

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Escuela de Farmacia, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain; analvarezmercado@gmail.com

<sup>3</sup> Institut of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Center of Biomedical Research, University of Granada, 18016 Granada, Spain

<sup>4</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs, GRANADA, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, 18014 Granada, Spain

<sup>5</sup> Liver Vascular Biology Research Group, Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory IDIBAPS, 03036 Barcelona, Spain; Jordi.gracia@idibaps.org

<sup>6</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), 08036 Barcelona, Spain

<sup>7</sup> Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria "Bicentenario 2010", Ciudad Victoria 87087, Mexico; aranyca@yahoo.com

<sup>8</sup> 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.



check for  
updates

**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

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

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

- <sup>1</sup> 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.)
  - <sup>2</sup> Aplicacions i Muntatge Torelló SL (AMT), 08570 Torelló, Spain; cristina.maroto@uivc.cat
  - <sup>3</sup> Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria "Bicentenario 2010", Ciudad Victoria 87087, Mexico; acasillas@docentes.uat.edu.mx
  - <sup>4</sup> Facultad de Medicina e Ingeniería en Sistemas Computacionales de Matamoros, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Matamoros 87300, Mexico
  - <sup>5</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Escuela de Farmacia, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain; alvarezmercado@ugr.es
  - <sup>6</sup> Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Center of Biomedical Research, University of Granada, 18016 Armilla, Spain
  - <sup>7</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, 18014 Granada, Spain
  - <sup>8</sup> Liver Vascular Biology Research Group, Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory IDIBAPS, 03036 Barcelona, Spain
  - <sup>9</sup> 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 Małgorzata 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

Review

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

Marc Micó-Carnero <sup>1</sup>, Mohamed Amine Zaouali <sup>2</sup>, Carlos Rojano-Alfonso <sup>1</sup>, Cristina Maroto-Serrat <sup>1</sup>, Hassen Ben Abdennebi <sup>2,†</sup> and Carmen Peralta <sup>1,\*,†</sup>

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

<sup>2</sup> 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.



**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/>).

**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

## 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

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

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

- <sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain
  - <sup>2</sup> Institute of Nutrition and Food Technology, Biomedical Research Center, University of Granada, 18016 Armilla, Spain
  - <sup>3</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Complejo Hospitalario Universitario de Granada, 18014 Granada, Spain
  - <sup>4</sup> Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury Department, Institut de Recerca Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; acabalca31@alumnos.ub.edu (A.C.-C.); rojano@clinic.cat (C.R.-A.); mico@clinic.cat (M.M.-C.)
  - <sup>5</sup> 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.)
  - <sup>6</sup> Teaching and Research Department, Hospital Regional de Alta Especialidad de Ciudad Victoria "Bicentenario 2010", Ciudad Victoria 87087, Mexico; asg\_4@live.com
  - <sup>7</sup> Liver Vascular Biology Research Group, Barcelona Hepatic Hemodynamic Laboratory, IDIBAPS Biomedical Research Institute, CIBEREHD, 03036 Barcelona, Spain; jordi.gracia@idibaps.org
  - <sup>8</sup> 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