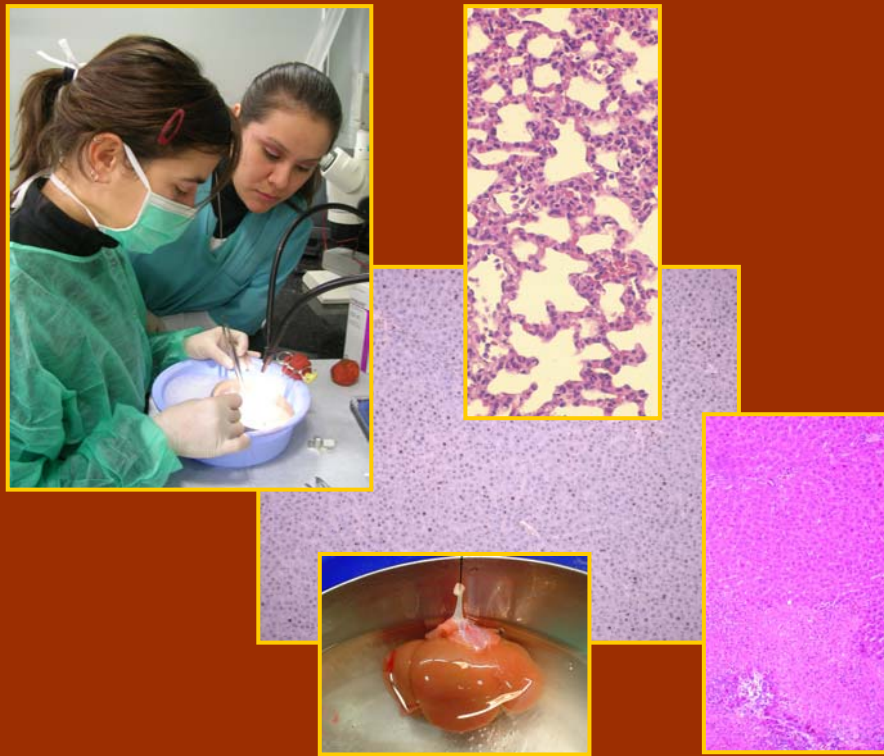


TESIS DOCTORAL

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



Rosa Franco Gou

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

5. DISCUSIÓN

PRIMER ESTUDIO

Numerosos estudios experimentales han demostrado que el HGF promueve el crecimiento y la regeneración hepática. En el campo del trasplante hepático, se ha visto que la administración exógena de este factor de crecimiento a animales receptores de un injerto de tamaño reducido, promueve la recuperación del volumen del órgano, estimula la regeneración hepática y ofrece una protección frente al rechazo inmunológico. Los resultados de este estudio indican que tanto el PC como el donador de NO protege frente a la lesión hepática por I/R y mejora la regeneración hepática en el modelo experimental de ROLT. Tanto la estrategia quirúrgica, como la farmacológica han demostrado estimular la liberación de factores que promueven la regeneración hepática como es el HGF. Sin embargo, la inhibición de la síntesis de NO no revirtió completamente los efectos beneficiosos del PC, lo cual indica que el NO es un factor implicado en el PC, pero no es el único.

Resultados obtenidos en modelos experimentales de isquemia normotérmica combinada con una hepatectomía parcial han demostrado que los RLO dañan las lipoproteínas y péptidos, causando lipoperoxidación lipídica e inhibiendo la síntesis de DNA. Además, se ha sugerido que los RLO que pueden dañar receptores de membrana, inhibiendo así las vías metabólicas de regeneración hepática. Entonces, cabe de esperar que el PC a través la disminución en la generación de RLO, en el modelo de ROLT, mejore la respuesta regenerativa del injerto trasplantado. Es conocida la implicación del sistema xantina/XOD en la lesión por estrés oxidativo asociada al trasplante hepático; altos niveles de hipoxantina y xantina después de un trasplante son considerados marcadores de una baja supervivencia. Ya han sido publicado los beneficios que el PC ejerce a través de la modulación del sistema xantina/XOD; de esta manera, en un modelo experimental de trasplante hepático con 6 horas de isquemia fría, el PC redujo la conversión de XDH a XOD y la acumulación de hipoxantina, sugiriendo al NO como posible mediador en la protección ejercida por el PC. De hecho, se ha demostrado que el NO inhibe, in vivo, la actividad XOD de las células endoteliales y macrófagos activados. Ichimori et al, demostraron que el NO reacciona con la XDH/XOD y lo transforma en la forma inactiva desulfo en condiciones anaerobias. En nuestro caso, sin embargo, la disminución de los RLO producida por el PC no se explica mediante cambios en la actividad XDH/XOD o cambios en la acumulación de hipoxantina/xantina. Los resultados del presente estudio están de acuerdo con la hipótesis de que el PC reduce la producción de RLO procedente de las células de Kupffer. De hecho, la inhibición de las células de kupffer redujo los RLO

después del ROLT y este hecho fue asociado con una menor lesión hepática y con una mejor regeneración del injerto. Este resultado está en consonancia con los resultados obtenidos en un modelo de hepatectomía parcial. Sin embargo, no debe ser descartada la posibilidad que el PC pueda modular otros sistemas implicados en la producción de RLO, como la mitocondria, o sistemas antioxidantes, como el glutation.

El estado energético de la célula es un factor que influye en su capacidad de regeneración, pues resultados obtenidos en un modelo de hepatectomía del 70%, mostraron que la regeneración hepática estaba fuertemente ligada a los niveles de ATP del hígado remanente. En contraste con lo que sucede en la isquemia normotérmica, nuestros resultados sugieren que el PC no afecta al “pool” de nucleótidos de adenina de las células hepáticas, ni modifica la capacidad de los hepatocitos de regenerar el ATP después de la reperusión. Por lo tanto, el efecto beneficioso del PC sobre la regeneración no puede explicarse en base a la preservación de los nucleótidos de adenina.

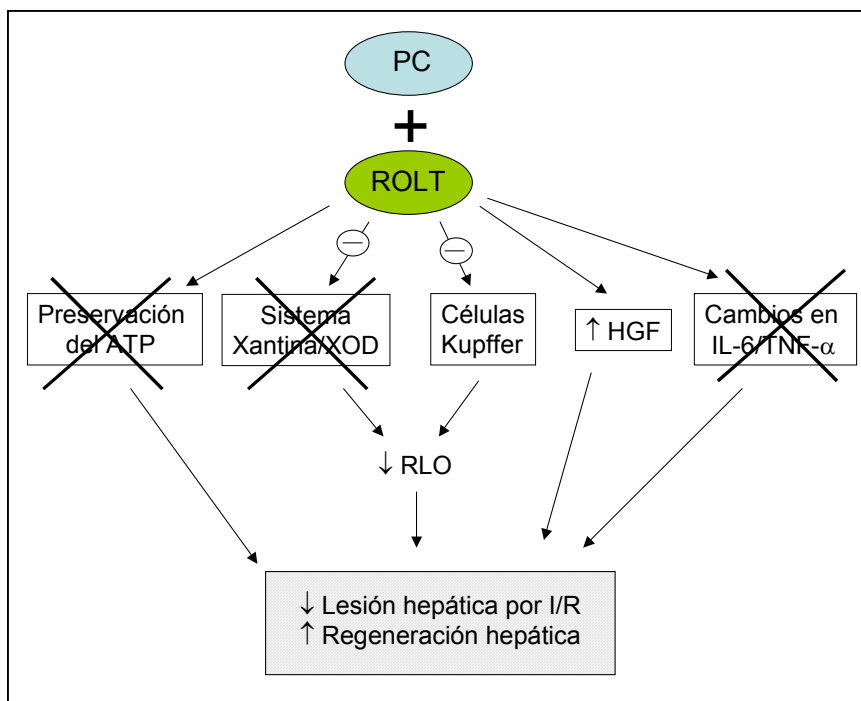


Figura 5.1. Parámetros estudiados en el primer estudio

Seguidamente, estudiamos si el PC protegía de la lesión hepática y mejoraba la regeneración mediante la liberación de IL-6. Este hecho podría proteger de los efectos adversos del TNF- α sobre el hígado y estimular la regeneración del injerto después del ROLT. Existen trabajos en la literatura que indican que el PC es capaz de reducir la liberación de TNF- α después de una I/R hepática en condiciones

normotérmicas y de isquemia fría sin hepatectomía. Además, se sabe que la IL-6 podría ejercer su efecto protector inhibiendo las acciones nocivas del TNF. Nuestros resultados indican que el PC no modificó ni los niveles de TNF- α ni los de IL-6 en los injertos de tamaño reducido después del trasplante. Es importante remarcar que a pesar de los efectos adversos del TNF- α en I/R hepática, resultados obtenidos en un modelo experimental de hepatectomía parcial han sugerido que esta citoquina juega un papel estimulador de la regeneración hepática. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que ni el TNF- α ni la IL-6 son cruciales en la regeneración de nuestro modelo experimental, puesto que los cambios ocurridos en los parámetros de lesión y regeneración hepática no se reflejan en cambios en los niveles de estas dos citoquinas. Estos resultados son consecuentes con las observaciones publicadas por otros autores, indicando que la proliferación hepatocitaria puede ser inducida, al menos, por dos vías diferentes: una regeneración compensatoria dependiente de TNF- α y IL-6 y otra inducida directamente por mitógenos que no requiere de estas dos citoquinas. Ratones que no tienen el gen del TNF- α y la IL-6, en un modelo de hepatectomía parcial, se trataron con mitógenos primarios y la proliferación hepatocitaria fue la misma que la de los ratones de fenotipo salvaje.

El PC ya ha sido aplicado en clínica, en isquemia normotérmica asociada a la resección de tumores. Los resultados del presente estudio sugieren una nueva potencial aplicación del PC en trasplante hepático procedente de injertos de tamaño reducido como es el caso del trasplante hepático procedente de donante vivo.

SEGUNDO ESTUDIO

Los resultados del presente estudio sugieren que los beneficios proporcionados por el PC y el donador de NO sobre la regeneración hepática asociada al ROLT son debidos a un balance entre el TGF- β y el HGF. Ambas estrategias protectoras redujeron los niveles de TGF- β después del ROLT, lo cual fue acompañado de un aumento en los niveles de HGF. Estos resultados están en consonancia con un estudio experimental de isquemia hepática en el que se vio que altos niveles de TGF- β y bajos niveles de HGF inhibían la proliferación de los hepatocitos.

Además de los factores de crecimiento, una hepatectomía parcial induce la activación de citoquinas. IL-1 β ha sido propuesta como un posible agente inhibidor de

la proliferación de hepatocitos “in vitro” y en modelos experimentales de hepatectomía sin isquemia, al igual que el TGF- β . Nuestros resultados indican que la IL-1 β parece no jugar ningún papel en la lesión hepática por I/R y en la regeneración asociadas al ROLT. Este no es el caso de la IL-1 α , cuyos niveles aumentaron después del ROLT, respecto al grupo Sham. Estrategias, tal como el tratamiento con IL-1ra, que modulan la acción de la IL-1 α pueden ser de importancia en la disminución de la lesión por I/R hepática y en la mejora de la regeneración hepática asociadas al ROLT. Con la intención de establecer la función de la IL-1 en el ROLT, obtuvimos resultados sobre la capacidad de la IL-1 para modular los factores de crecimiento, HGF y TGF- β .

De igual manera que el IL-1ra, el PC puede ser considerado una estrategia válida para modular los efectos adversos de la IL-1 sobre la lesión por I/R y la regeneración hepática que se da en el ROLT. Dados los precedentes de la implicación del NO en el PC y en la liberación de la IL-1, nos propusimos estudiar si los beneficios del PC modulando la IL-1 en el ROLT estaban mediados por el NO. Los resultados experimentales parecen confirmar esta hipótesis, ya que la inhibición de la síntesis de NO en el grupo con PC incrementó los niveles de IL-1 después del ROLT, haciendo desaparecer los beneficios del PC sobre la lesión hepática, el estrés oxidativo y la regeneración hepática. Sin embargo, cuando se inhibió la acción de la IL-1, mediante la administración del IL-1ra, los efectos adversos que provocó la inhibición de la síntesis de NO desaparecieron. Además la administración de un donador de NO simuló los efectos del PC.

En resumen, nuestros resultados indican que el PC, a través del NO, inhibe la liberación de IL-1, protegiendo, de este modo, frente a la lesión por I/R hepática y mejorando la regeneración hepática asociada al ROLT. Esto resultó en la regulación de los factores de crecimiento y el estrés oxidativo. Aunque serán necesarios más estudios para establecer una relación entre los factores de crecimiento y el estrés oxidativo, esta posibilidad no debe ser descartada. De hecho, en modelos experimentales de hipoxia/oxigenación en hepatocitos y de I/R hepática, el tratamiento con HGF inhibió la producción de RLO. Por otra parte, el TGF- β induce procesos de estrés oxidativo en cultivos de hepatocitos. Son bien conocidos los efectos adversos de los RLO sobre la regeneración hepática.

Datos obtenidos en cultivos de células pancreáticas y pulmonares y modelos experimentales de toxicidad inducida por LPS, muestran que la inducción de las HSPs es responsable de la inhibición de la biosíntesis de IL-1. Por otro lado, ha sido probado el papel del NO en la regulación de la expresión de las HSPs en diferentes modelos de

I/R hepática. Teniendo en cuenta todos estos datos nuestra hipótesis fue que el PC a través del NO inducía la sobreexpresión de las HSPs, con lo que se reduciría la liberación de IL-1, mejorando así la lesión por I/R y la regeneración asociada al ROLT. Sin embargo, los resultados obtenidos no abalaron esta hipótesis; mostraron que los beneficios del PC sobre la IL-1 α no eran dependientes de las HSPs. Sugerimos un mecanismo de protección del PC; el PC protege frente a la lesión por IR hepática y estimula la regeneración hepática a través de, al menos, dos vías diferentes (Figura 5.2):

1) El PC, a través del NO, inhibe la liberación de IL-1 α , lo que se ve reflejado en cambios en la liberación de factores de crecimiento (HGF y TGF- β) y en la reducción del estrés oxidativo.

2) Por un mecanismo independiente del NO, el PC induce la expresión de la HSP70 y la HO-1, con una disminución de la lesión por I/R, y sólo en el caso de la HO-1 se estimula la regeneración hepática.

Con los resultados obtenidos a las 6, 12 y 24 horas después del trasplante, la inducción de la HO-1 parece ser un elemento clave en mantener la protección del injerto durante la reperfusión. La protección que ejerce la HSP70 en el PC se relaciona sólo con procesos de proliferación celular y se observa sólo en periodos prolongados de reperfusión.

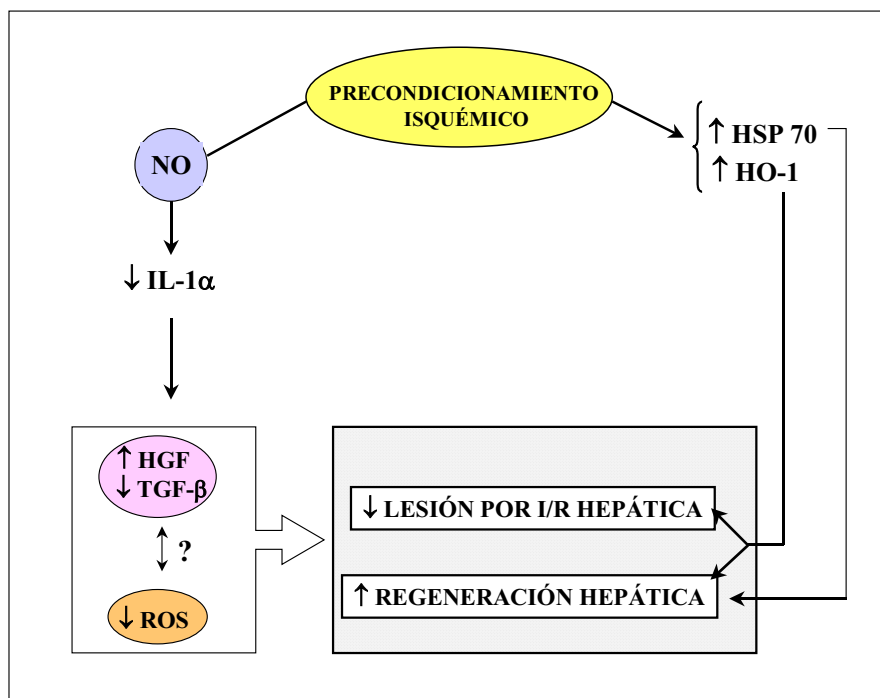


Figura 5.2. Mecanismos protectores del PC en el ROLT.

Este estudio abre camino a nuevas estrategia quirúrgicas y/o farmacológicas para la protección de injertos de tamaño reducido frente a los efectos nocivos de la I/R sobre la lesión y la regeneración hepáticas.

TERCER ESTUDIO

Las complicaciones pulmonares han sido descritas como una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en receptores pediátricos de injertos hepáticos de tamaño reducido. Existen evidencias que este proceso está mediado por la infiltración de neutrófilos y la liberación de mediadores inflamatorios como los RLO. La protección frente a la infiltración de neutrófilos y del estrés oxidativo observada en el pulmón después del tratamiento con IL-1ra propone a la IL-1 (que podría ser liberada por las células de kupffer) como responsable del daño pulmonar asociado al ROLT. El PC redujo la liberación hepática de IL-1 α y protegió del daño pulmonar asociado al ROLT. La inhibición de la síntesis de NO en el grupo con PC produjo un aumento en la liberación de la IL-1 α , y inhibió los efectos del PC sobre el daño pulmonar asociado al ROLT. Sin embargo, cuando se inhibió la acción de IL-1, los efectos adversos de la inhibición de la síntesis de NO desaparecieron. Además, el donador de NO administrado al ROLT resultó en una reducción de la IL-1 α y en unos parámetros bioquímicos e histológicos pulmonares similares a los del grupo precondicionado. Estos resultados indican que el PC, a través del NO, inhibe la liberación de la IL-1 α en hígado, protegiendo frente al daño pulmonar asociado al ROLT.

Teniendo en cuenta los datos publicados en la literatura indicando que 1) la IL-1 producida en el hígado durante un proceso de isquemia caliente es responsable de la liberación del TNF- α a la circulación sistémica y 2) que el daño pulmonar asociado al trasplante hepático parece estar ligado a la liberación de TNF- α en plasma, hemos decidido investigar si los beneficios observados en el pulmón como consecuencia de la inhibición de la acción de la IL-1 pueden ser explicados por cambios en los niveles sistémicos de TNF- α /sTNFR. Para ello, primero investigamos el efecto del PC sobre los niveles plasmáticos de TNF- α /sTNFR después del ROLT.

En la mayoría de estudios basados en procesos inflamatorios, el aumento del TNF- α observado se da en paralelo a un aumento en sus receptores solubles. El PC está asociado a un descenso de los niveles de TNF- α plasmáticos, por lo que es lógico esperar una disminución de los sTNFRs. Pero también sería correcto pensar que el

PC podría estimular algún mecanismo que provocara un aumento en los sTNFRs, ya que se ha visto que la administración de sTNFRs, en situaciones en las cuales no hay suficiente cantidad de sTNFRs endógeno, reduce los niveles de TNF- α , inhibiendo sus efectos adversos. Nuestros resultados están de acuerdo con la segunda hipótesis, ya que el PC estimuló la liberación del sTNFR2, disminuyó el TNF- α plasmático, reduciendo, así, la relación TNF- α /sTNFR2. Este hecho puede contribuir a la protección del PC frente al daño pulmonar en el ROLT. Además, hemos establecido una relación entre IL-1, daño pulmonar y sTNFR en el ROLT. En resumen, el tratamiento con IL-1ra, el cual protegió del daño pulmonar, incrementó el sTNFR2 en plasma y esto resultó en una disminución del TNF- α plasmático después del ROLT. Entonces, se puede hipotetizar que cualquier estrategia que sea capaz de disminuir la producción de IL-1 protegería frente al daño pulmonar. Tanto el PC como el tratamiento con un donador de NO fueron capaces de aumentar los niveles plasmáticos de sTNFR y disminuir los del TNF- α plasmático, resultando en una relación TNF- α /sTNFR2 menor después del ROLT. La inhibición de la síntesis de NO con L-NAME en el grupo precondicionado resultó en unos altos niveles de IL-1, una relación TNF- α /sTNFR2 mayor y unos parámetros bioquímicos relacionados con el daño pulmonar similares a los observados en el grupo ROLT. Por otro lado, la inhibición de la acción de la IL-1 en el grupo precondicionado y tratado con NAME hizo desaparecer la lesión pulmonar a la vez que resultó en niveles plasmáticos de sTNFRs, TNF- α y TNF- α /sTNFR2 similares a los del grupo con PC.

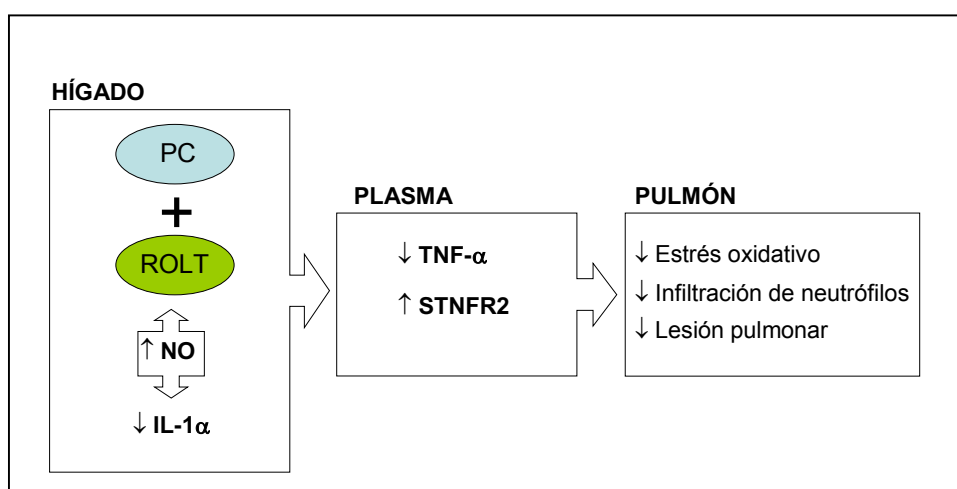


Figura 5.3. Protección del PC en el pulmón en el ROLT

Podemos sugerir, entonces, un mecanismo a través del cual el PC protege frente al daño pulmonar asociado al ROLT. El PC, a través del NO, inhibe la liberación de la IL-1 que de algún modo regula la liberación sistémica de TNF- α /sTNFR, protegiendo así del daño pulmonar asociado al ROLT. Serían necesarios estudios con ratas deficientes en TNFR2, con anticuerpos anti-sTNFR2 o tratando de bloquear la liberación del sTNFR2 para determinar como el sTNFR2 está implicado en la protección pulmonar ejercida por el PC, pero estos serían unos resultados difíciles de interpretar.

Los resultados del presente estudio indican que:

- 1) La IL-1 está implicada en el daño pulmonar asociado al ROLT.
- 2) El PC, a través del NO, inhibe la producción de IL-1, protegiendo así frente al daño pulmonar asociado a ROL.
- 3) El PC regula los niveles sistémicos de TNF- α y sTNFR2.
- 4) Existe una relación entre el NO, la IL-1 y el TNF- α /sTNFR y los efectos beneficiosos del PC sobre el daño pulmonar asociado al ROLT.