

Programa de Doctorado de Fisiología. Bienio 2002-2004

**MECANISMOS DE PROTECCIÓN DEL
PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EN EL
TRASPLANTE HEPÁTICO DE INJERTOS
ESTEATÓSICOS**

Tesis Doctoral presentada por Esther Carrasco Chaumel para optar al Título de
Doctora por la Universidad de Barcelona

Directores: Dr. Joan Roselló Catafau

Dra. Carmen Peralta Uroz

Tutora: Dra. M^a Teresa Mitjavila Cors

Barcelona 2005

A todos aquellos que han estado a mi lado en todo momento dándome su apoyo, porque sin ellos no hubiera sido posible esta tesis. Y en especial a los que han sabido transmitirme la pasión por la ciencia, por hacerme cómplice de su pasión y entusiasmo.

Gracias a Carlos y a Anabela que hicieron de mi estancia en Coimbra algo muy especial.

A mi familia, y sobretodo a mis hermanos a los que adoro, y que espero que sigan estando siempre a mi lado.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. El hígado.....	3
1.1 Generalidades	3
1.2 Organización del hígado	3
1.3 Sistema vascular hepático	5
1.4 Células hepáticas	6
1.4.1 Hepatocitos	6
1.4.2 Células del sinusoides hepático	7
2. Trasplante hepático.....	8
2.1 Problemática del trasplante hepático	8
2.1.1 Estrategias para aumentar los órganos disponibles para ser trasplantados	9
2.2 Disfunción y retrasplante hepático	12
3. Lesión de I/R asociada al trasplante hepático.....	13
3.1 Mecanismos de lesión en el proceso de I/R	14
3.1.1 Isquemia	14
3.1.2 Reperfusión	15
3.2 Mediadores implicados en la lesión de I/R	19
3.2.1 Óxido nítrico	19
3.2.2 Radicales libres de oxígeno	21
3.2.3 Citoquinas	27
3.3 Efectos sistémicos derivados del proceso de I/R hepático	28
4. Trasplante hepático de injertos grasos o esteatósicos.....	30
4.1 Definición y clasificación de hígados grasos	30
4.2 Evaluación de los hígados esteatósicos para el trasplante	31
5. Lesión de I/R asociada al trasplante de hígados grasos.....	34
5.1 Alteraciones de la microcirculación	34
5.2 Peroxidación lipídica	35
5.3 Acumulación de neutrófilos	36
5.4 Activación de células de Kupffer	36
5.5 Metabolismo energético	37
6. Estrategias terapéuticas para disminuir la lesión de I/R.....	39
6.1 Precondicionamiento isquémico	42
6.1.1 Mecanismos moleculares del PC isquémico	43
6.1.2 Efectos del PC isquémico sobre los mecanismos de lesión de la I/R hepática	46
6.1.3 Efectos del PC isquémico sobre la lesión pulmonar a asociada a la I/R hepática	48

6.2 PC isquémico e hígados grasos	49
6.3 Implicaciones clínicas del PC isquémico	49
II. OBJETIVOS.....	53
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
1. Material.....	59
1.1 Animales de experimentación	59
1.2 Disolventes y reactivos	60
1.3 Anticuerpos, proteínas recombinantes y kits comerciales	61
1.4 Instrumental	62
2. Métodos.....	64
2.1 Modelo experimental: Trasplante ortotópico de hígado	64
2.1.1 Anestesia	64
2.1.2 Trasplante hepático: técnica del doble "cuff"	64
2.1.3 PC isquémico	67
2.2 Recogida y procesamiento de las muestras	68
2.3 Grupos experimentales	68
2.3.1 Objetivo 1	68
2.3.2 Objetivo 2	71
2.4 Determinaciones bioquímicas	74
2.4.1 Actividad transaminasas	74
2.4.2 Análisis de nucleótidos	75
2.4.3 Actividad proteinquinasa dependiente de AMP	75
2.4.4 Actividad mieloperoxidasa	76
2.4.5 Niveles de factor de necrosis tumoral alfa	76
2.4.6 Niveles de malonildialdehído	76
2.4.7 Niveles de nitrotirosinas	77
2.4.8 Niveles de nitrato/nitrito	78
2.4.9 Actividad óxido nítrico sintasa	79
2.4.10 Actividad xantina deshidrogenasa, xantina oxidasa	79
2.4.11 Actividad superóxido dismutasa	80
2.4.12 Niveles de glutatión	81
2.4.13 Actividad caspasa-3	81
2.4.14 Western Blot de AMPK, eNOS, iNOS	82
2.4.15 Proteínas	83
2.5 Microcirculación hepática	83
2.6 Estudio histológico	84

2.7 Técnicas de inmunohistoquímica	84
2.7.1 Nitrotirosinas	84
2.7.2 TUNEL	85
2.8 Estudio estadístico	86
IV. RESULTADOS.....	87
1. Efecto del PC isquémico sobre la lesión hepática de I/R asociada al trasplante de hígados esteatósicos.....	89
2. Efecto del PC isquémico sobre la lesión pulmonar asociada al trasplante de hígados esteatósicos.....	92
3. Efecto del PC isquémico sobre los mecanismos involucrados en la menor tolerancia de los hígados esteatósicos a la lesión de I/R.....	94
3.1 Alteraciones de la microcirculación hepática	94
3.2 Infiltración de neutrófilos en el tejido hepático	94
3.3 Niveles de factor de necrosis tumoral alfa	95
3.4 Lesión por estrés oxidativo	96
3.4.1 Antioxidantes: glutatión, superóxido dismutasa	96
3.4.2 Sistema xantina/xantina oxidasa	96
3.4.3 Peroxidación lipídica: malonildialdehído	98
4. Implicación de la AMPK en la lesión hepática de I/R asociada al trasplante de hígados esteatósicos.....	99
5. Relación entre AMPK y NO.....	100
6. Efectos de la AMPK y el NO sobre los niveles de ATP y nucleótidos de adenina.....	103
7. Efectos de la AMPK y el NO sobre el estrés oxidativo.....	103
7.1 Peroxidación lipídica: malonildialdehído	103
7.2 Nitrotirosinas	104
V. DISCUSIÓN.....	107
1. Efecto del PC isquémico sobre la lesión hepática de I/R asociada al trasplante de hígados esteatósicos.....	109
2. Efecto del PC isquémico sobre la lesión pulmonar asociada al trasplante de hígados esteatósicos.....	109
3. Efecto del PC isquémico sobre los mecanismos responsables de la menor tolerancia de los hígados esteatósicos a la lesión de I/R.....	110
3.1 Alteraciones de la microcirculación hepática	110
3.2 Infiltración de neutrófilos en el tejido hepático	110
3.3 Niveles de factor de necrosis tumoral alfa	111

3.4 Lesión por estrés oxidativo	111
4. Implicación de la AMPK en la lesión hepática. Efecto de la AMPK sobre los niveles de ATP y nucleótidos de adenina.....	114
5. Relación entre AMPK y NO. Efectos de la AMPK y el NO sobre el estrés oxidativo	114
VI. CONCLUSIONES.....	117
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	121
VIII. ANEXO.....	152

ABREVIATURAS

Ac-DEVD-pNA: N-acetil-Asp-Glut-Val-Asp-p-nitroanilina
ADP: Adenosina difosfato
AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleósido
ALT: Alanina aminotransferasa
AMP: Adenosina monofosfato
AMPK: Proteinkinasa adenosina fosfato dependiente
AraA: Adenina 9βD-arabinofuranósido
AST: Aspartato aminotransferasa
ATP: Adenosina trifosfato
AP-1: Activador de proteínas-1
ATP: Adenosina trifosfato
BSA: Albúmina de suero bovino
CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno
DAB: Diaminobencidina
DAG: Diacilglicerol
DMSO: Dimetilsulfóxido
DTT: Ditioneitol
ELISA: Ensayo inmunoenzimático (del inglés "Enzyme linked immunoabsorbent assay")
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial
ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares
FAD: Flavina adenina dinucleótido
FPI: Fallo primario del injerto
GSH: Glutathion
GSHPx: Glutathion peroxidasa
GSSG: Glutathion disulfuro
GST: Glutathion transferasa
HNE: 4-hidroxinonenal
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
HO-1: Hemooxigenasa
HSP: Proteínas de shock térmico
HTBA: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular-1
IFN-γ: Interferon γ
IgG: Inmunoglobulina G
IL: Interleuquina
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
I/R: Isquemia/reperfusión
Ln: Rata Zucker delgada
L-NAME: Nω-nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro
LPS: Lipopolisacárido
JNK: c-jun N-terminal quinasas
MAPK: Proteinkinasa mitógeno activada
MDA: Malonildialdehído
MPO: Mieloperoxidasa
NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NBT: Azul de nitritetrazolio
NF-κB: Factor nuclear κB
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintasa
Ob: Rata Zucker obesa
ONT: Organización Nacional de Trasplante

PAF: Factor de agregación plaquetaria
PBS: Tampón fosfato salino
PC: Precondicionamiento
PKC: Protein quinasa C
PMSF: Floururo de fenilmetilsulfonilo
RLO: Radicales libres de oxígeno
SAMS péptido: péptido sintético His-Met-Arg-Ser-Ala-Met-Ser-Gly-Leu-His-Leu-Val-Lys-Arg-Arg
SDS: Dodecil sulfato sódico
SOD: Superóxido dismutasa
STAT-3: Traductor de señales y activador de la transcripción-3
TBA: Ácido tiobarbitúrico
TCA: Ácido tricloroacético
TMB: Tetrametilbenzidina
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
TUNEL: Método inmunohistoquímico de determinación de células apoptóticas (del inglés "Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin Nick-End Labeling")
UW: Universidad de Wisconsin
XDH: Xantina deshidrogenasa
XOD: Xantina oxidasa

I. INTRODUCCIÓN

1. EL HÍGADO

1.1 Generalidades

El hígado es un órgano de importancia vital con múltiples y complejas funciones (Tabla 1). Una de sus principales funciones es la captación de numerosos substratos absorbidos en el intestino y su posterior depósito, metabolización y distribución a la circulación sistémica y la bilis. Desempeña un papel central en la regulación de múltiples procesos metabólicos, bioquímicos y homeostáticos; y además es un órgano crucial en los mecanismos de defensa contra las infecciones (Cingolani y cols. 2000; Ganong 2001; Pocock y cols. 2002; Sherlock y cols. 2002; Zakim y cols. 2002).

Tabla 1. Principales funciones del hígado

<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo de carbohidratos Captación de glucosa Síntesis y almacenamiento de glucógeno Glucogenolisis y gluconeogénesis • Metabolismo lipídico Oxidación de ácidos grasos Síntesis de lipoproteínas, colesterol, triglicéridos y fosfolípidos Cetogénesis • Metabolismo proteico Degradación de aminoácidos Síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y urea • Metabolismo del grupo hemo: Síntesis del grupo hemo y de porfirinógenos • Formación y secreción de bilis • Inactivación de diversas sustancias: tóxicos, esteroides y otras hormonas • Síntesis de proteínas plasmáticas: albúmina y proteínas de fase aguda • Inmunidad: Células de Kupffer
--

1.2 Organización del hígado

A nivel microscópico, el hígado está formado por miles de lobulillos hepáticos separados entre sí por septos. El lobulillo hepático es la unidad funcional básica del hígado (Figura 1). Consiste en una estructura más o menos hexagonal organizada alrededor de una vena central que desemboca en la vena hepática y a partir de la cual irradian columnas de hepatocitos distribuidos en forma de cordones. Entre las columnas de hepatocitos se encuentran los sinusoides, capilares venosos que reciben sangre de la vena porta y de la arteria hepática, que

fluye hacia la vena central del lobulillo, y que juegan un papel muy importante en el mantenimiento de una correcta función hepática. Los sinusoides hepáticos se encuentran revestidos por dos tipos de células, las células endoteliales típicas y las células de Kupffer. Cada hepatocito está en contacto directo con la sangre sinusoidal debido a la marcada porosidad de las paredes de los sinusoides. El espacio que existe entre los cordones de hepatocitos y la pared del sinusoide se denomina espacio de Disse, y contiene un sistema de fibras de colágeno con funciones de soporte.

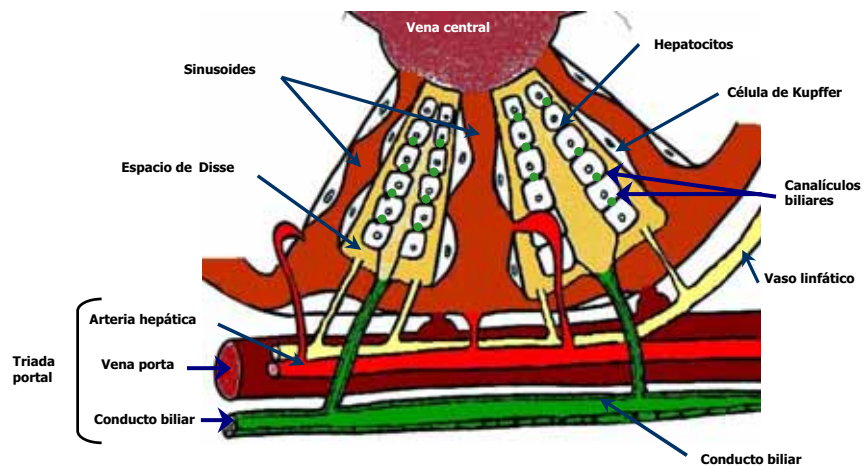


Figura 1. Lobulillo hepático.

Los diversos espacios de Disse conectan a su vez con los vasos linfáticos, a través de los cuales se elimina el exceso de líquido. En el interior de los cordones de hepatocitos existe una red de canaliculos biliares, donde es secretada la bilis producida de forma continua por las células hepáticas, que desembocan en conductos biliares mayores. Los canaliculos biliares están separados del espacio de Disse por uniones estrechas que son impermeables, evitando de ese modo la mezcla de los contenidos de ambos (Figura 2). En cada lobulillo hepático se sitúa una triada portal, denominada así porque en ella existen siempre tres estructuras: una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un conducto biliar (Cingolani y cols. 2000; Ganong 2001; Pocock y cols. 2002; Sherlock y cols. 2002; Zakim y cols. 2002).

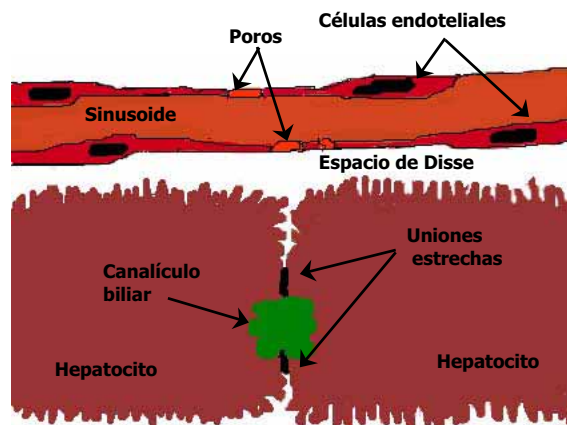


Figura 2. Relación entre hepatocitos, espacio de Disse y sinusoide.

A nivel macroscópico, podemos considerar que el hígado se encuentra dividido en sectores y segmentos atendiendo a que cada uno de los ellos posee su propia rama de la vena porta, de la arteria hepática y del conducto biliar. Al llegar al hígado la vena porta se bifurca en dos ramas que dividen al hígado en dos partes, la izquierda y la derecha, cada una de las cuales tiene un aporte sanguíneo independiente, tanto desde la vena porta como desde la arteria hepática; y de la misma forma, el drenaje biliar también es independiente en cada una de estas dos partes. Las dos ramas de la vena porta se separan a su vez en dos ramas, dividiendo al hígado en cuatro sectores, que a su vez se dividen posteriormente en segmentos, hasta llegar a un total de 8 segmentos. Esta división del hígado en segmentos facilita ciertas intervenciones hepáticas que incluyen resecciones hepáticas así como técnicas aplicadas al trasplante hepático como son la técnica de Split y la realización de trasplantes desde un donante vivo (Sherlock y cols. 2002).

1.3 Sistema vascular hepático

A diferencia de cualquier otro órgano, el hígado recibe sangre de dos vías diferentes: la vena porta, que transporta la sangre proveniente del territorio esplácnico, que característicamente tiene un bajo contenido de oxígeno pero que es rica en sustancias absorbidas por el intestino así como también en hormonas y otros elementos que se producen en el intestino, bazo y en el páncreas; y la arteria hepática, que transporta sangre rica en oxígeno procedente del corazón (Figura 3).

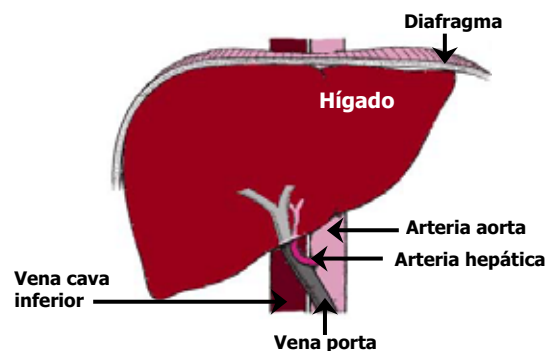


Figura 3. Esquema del sistema vascular hepático.

Tanto la sangre proveniente de la vena porta como de la arteria hepática, finalmente alcanzará los sinusoides hepáticos, que es el lugar donde tiene lugar el intercambio entre la sangre y los hepatocitos. Debido a la marcada porosidad de las paredes de los sinusoides, los nutrientes pueden intercambiarse con facilidad entre la sangre y el hepatocito, y se produce la difusión de la mayor parte de las proteínas sanguíneas al espacio extravascular. La sangre de los sinusoides fluye desde la rama de la vena porta a la entrada de los sinusoides hacia la vena central del lobulillo hepático, que desemboca en las vénulas hepáticas y finalmente en la vena cava inferior justo por debajo del diafragma. De esta manera, las características de la sangre que llega a cada hepatocito es diferente dependiendo de su distancia de la vena portal, menos oxigenada

cuanto más alejada de ésta, y trae como consecuencia, una gran heterogeneidad funcional entre los hepatocitos (Figura 4). Probablemente, todos los hepatocitos tienen capacidad para realizar todas las funciones, pero sin embargo, presentan diferencias tanto en su estructura como en su actividad enzimática dependiendo de la concentración de oxígeno y de solutos de la sangre de la zona del lobulillo hepático donde se encuentren ubicados (*Cingolani y cols. 2000; Ganong 2001; Pocock y cols. 2002; Sherlock y cols. 2002; Zakim y cols. 2002*).

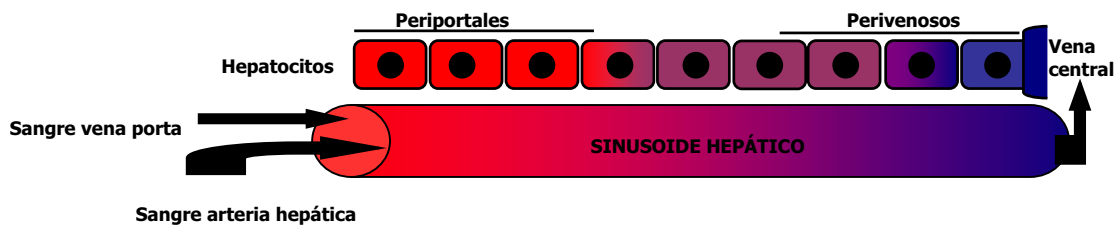


Figura 4. Esquema de un cordón de hepatocitos distribuida entre una rama de la vena porta y la vena central.

1.4 Células hepáticas

1.4.1 Hepatocitos

Los hepatocitos son las células del parénquima hepático y representan aproximadamente el 90% de la masa hepática total. A nivel metabólico son una de las células más complejas y diversas presentes en el organismo, y llevan a cabo una gran variedad de funciones, entre las que se incluyen: la obtención, almacenamiento y liberación a la circulación sanguínea de un gran número de nutrientes (glúcidos, proteínas, lípidos y vitaminas); la síntesis de proteínas plasmáticas, lipoproteínas, glucosa, ácidos grasos, colesterol y fosfolípidos; la digestión y absorción de las grasas alimenticias a través de la secreción de la bilis; y la detoxificación de compuestos endógenos y exógenos tóxicos para el organismo.

Poseen forma poliédrica y se disponen en cordones entre los sinusoides hepáticos, de modo que cada hepatocito está en contacto directo con los hepatocitos adyacentes, el canalículo biliar y el sinusoides hepático (espacio de Disse). La parte del hepatocito que está en contacto con el sinusoides recibe el nombre de región sinusoidal, y a través de ésta los hepatocitos realizan su función endocrina, es decir, la síntesis de proteínas y otros compuestos que liberan al sinusoides; mientras que la parte del hepatocito en contacto con los hepatocitos adyacentes recibe el nombre de región lateral, y a través de ésta realizan su función exocrina, es decir, la secreción de bilis al canalículo biliar presente en esta región (*Cingolani y cols. 2000; Ganong 2001; Pocock y cols. 2002; Sherlock y cols. 2002; Zakim y cols. 2002*).

1.4.2 Células del sinusoides hepático.

Células endoteliales

Las células endoteliales constituyen la pared de los sinusoides hepáticos. Están separadas de los hepatocitos por el espacio de Disse, creando un compartimiento extravascular hacia el cual los hepatocitos proyectan microvellosidades, para aumentar la superficie de contacto entre el hepatocito y el espacio vascular. Entre las células endoteliales sinusoidales existen poros o fenestraciones de gran tamaño. Estos poros permiten el intercambio de fluidos y compuestos macromoleculares -incluso proteínas- entre los sinusoides y el espacio de Disse.

Vasoconstrictores y vasodilatadores (tales, como endotelinas y óxido nítrico) derivados del endotelio sinusoidal son importantes para el control del flujo sanguíneo hepático tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Además, ante ciertos estímulos, las células endoteliales pueden liberar una serie de mediadores que participan activamente en la respuesta inflamatoria (*Cingolani y cols. 2000; Ganong 2001; Pocock y cols. 2002; Sherlock y cols. 2002; Zakim y cols. 2002*).

Células de Kupffer

Las células de Kupffer se encuentran localizadas principalmente en la pared de los sinusoides hepáticos. Actúan como barrera protectora por su capacidad de eliminar por endocitosis diversas sustancias potencialmente dañinas para el organismo tales como microorganismos, endotoxinas, complejos inmunes, células tumorales, lípidos, etc. Al activarse, las células de Kupffer comienzan a generar diversos mediadores citotóxicos como son citoquinas inflamatorias, radicales libres de oxígeno (RLO) y proteasas (*Cingolani y cols. 2000; Ganong 2001; Pocock y cols. 2002; Sherlock y cols. 2002; Zakim y cols. 2002*).

Células estrelladas

Las células estrelladas, también conocidas como células de Ito, están localizadas en el espacio de Disse, en estrecho contacto con las células endoteliales, y constituyen el principal almacén de vitamina A del organismo. Además las células estrelladas sintetizan proteínas de la matriz extracelular (colágenos de distintos tipos), son mediadores importantes de procesos de reparación del tejido hepático (cicatrización) en diversas patologías hepáticas y poseen capacidad para promover y amplificar la respuesta inflamatoria (*Cingolani y cols. 2000; Ganong 2001; Pocock y cols. 2002; Sherlock y cols. 2002; Zakim y cols. 2002*).

2. TRASPLANTE HEPÁTICO

El trasplante hepático está indicado en las enfermedades hepáticas progresivas en las que no sean posibles otras medidas terapéuticas, y en las que la supervivencia esperada sea inferior a la que se conseguiría con el trasplante (Lucey y cols. 1998; Devlin y cols. 1999). Consiste en reemplazar el hígado del paciente enfermo por otro que se implanta en el mismo lugar, y en la actualidad es una de las intervenciones quirúrgicas más complejas. En los últimos 20 años la técnica del trasplante de hígado ha evolucionado de tal manera que ha pasado de ser un procedimiento experimental con éxito moderado, a convertirse en una operación rutinaria con tasas de supervivencia altas para pacientes que anteriormente tenían mal pronóstico ante una enfermedad hepática avanzada e irreversible. Los avances más importantes que han contribuido a esta evolución son la introducción de nuevos fármacos que combaten de forma eficaz el rechazo inmunológico, el perfeccionamiento de la técnica quirúrgica y los avances producidos en la obtención y preservación de órganos, en especial la introducción de la solución de la Universidad de Wisconsin (UW) como solución de preservación hepática (Adam y cols. 2003; Haberal y cols. 2004; Schulak 2005).

2.1 Problemática del trasplante hepático

Actualmente la principal limitación del trasplante hepático es la falta de donantes. Aunque España tiene una tasa muy alta de donantes de órganos, una de las mayores a nivel mundial según la Organización Nacional de Trasplante (ONT) (Figura 5), el número de pacientes en lista de espera de un hígado supera al número de donantes.

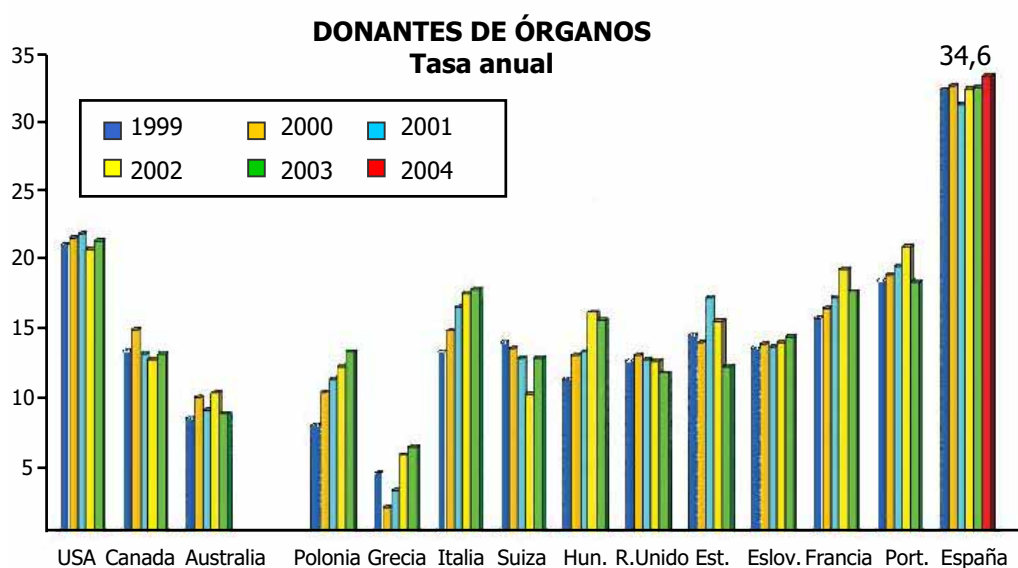


Figura 5. Tasa de donantes de órganos de diversos países según la Organización Nacional de Trasplante.

Pese a todos los esfuerzos llevados a cabo para aumentar la donación de órganos, en los últimos años la tasa de donación de órganos permanece relativamente estancada según los datos de la Organización Nacional de Trasplante (Figura 6).

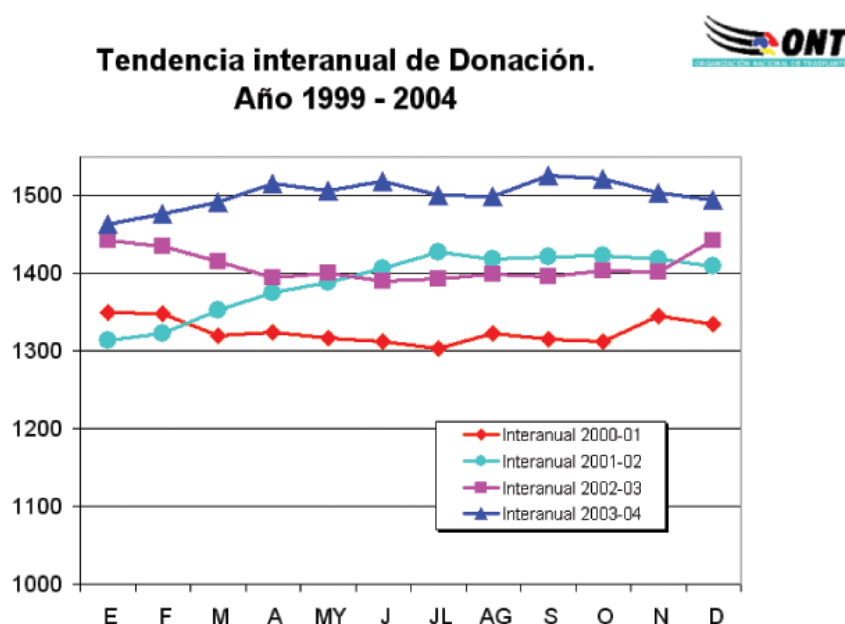


Figura 6. Tasa de donación de órganos en España en los últimos años según la ONT.

Para contrarrestar la falta de órganos disponibles para ser trasplantados se han desarrollado diversas estrategias con el fin de optimizar el uso de los órganos de los que se dispone. Estas estrategias han ido encaminadas a aumentar, entre los órganos disponibles, el número de órganos que son trasplantados mediante: la reevaluación y ampliación de las variables de aceptación de un órgano para ser trasplantado; y el desarrollo de diversas técnicas de trasplante alternativas a la convencional (*Montalti y cols. 2004; Neuberger 2004*).

2.1.1 Estrategias para aumentar los órganos disponibles para ser trasplantados

Reevaluación y ampliación de la variables de aceptación de órganos

No todos los órganos disponibles para ser trasplantados son aceptados. Los órganos son sometidos a una valoración individual y una vez conocidas sus características, son aceptados o no para ser trasplantados según unos criterios preestablecidos en la práctica clínica. Debido a la experiencia acumulada con el paso de los años, actualmente el número de órganos aceptados para ser trasplantados ha aumentado debido a que se han ampliado las variables de aceptación de un órgano. De este modo, la edad máxima y media de los donantes de hígado ha ido ampliándose con los años y este factor ya no es considerado limitante a la hora de seleccionar o no como aceptable un órgano para ser trasplantado (*Grande y cols. 1999; Jiménez Romero y cols. 1999; Melendez y cols. 1999; Keswani y cols. 2004*). De la misma forma, enfermedades crónicas padecidas por el donante, como la hipertensión arterial o la diabetes mellitus que anteriormente

provocaban que los órganos fueran descartados para trasplantar, no son consideradas actualmente como condición indispensable para que el órgano no sea utilizado (*Loinaz y cols. 2000; Sherlock y cols. 2002*).

Pese a todas estas consideraciones, una proporción elevada de los órganos disponibles para ser trasplantados son desechados por considerarse que no son aptos para el trasplante debido a que presentan un alto riesgo de desarrollar disfunción tras la intervención, son los denominados hígados subóptimos o marginales (*Neuberger 2000; Loinaz y cols. 2000*). Actualmente aproximadamente el 54% de los hígados marginales desechados por ser considerados no aptos para el trasplante son descartados por presentar infiltración grasa (esteatosis hepática) (*Organización Nacional de Trasplante*).

Técnicas de trasplante hepático alternativas a la convencional

Con la intención de practicar el trasplante hepático en un número creciente de pacientes se han optimizado diversas técnicas de trasplante alternativas a la convencional (*Sherlock y cols. 2002; Neuberger 2004*). Algunas de ellas se realizan actualmente en la práctica clínica con bastante frecuencia.

Técnica de Split. La técnica de Split o bipartición hepática permite el uso de un solo hígado para trasplantar a dos pacientes diferentes. Inicialmente se desarrolló ante la dificultad de obtener hígados para pacientes pediátricos, ya que éstos requieren un escaso volumen hepático. De esta forma, esta técnica comenzó a realizarse utilizando un mismo hígado que se implantaba en un receptor pediátrico y en otro adulto. Con posterioridad comenzó a utilizarse para realizar el trasplante a dos receptores adultos, uno de ellos de peso inferior a 60 Kg. La frecuencia de esta técnica ha aumentado en los últimos años con resultados satisfactorios (*Busuttil y cols. 1999; Azoulay y cols. 2001; Yersiz y cols. 2003*).

Trasplante dominó. Pacientes con un hígado de estructura y función correcta son sometidos en algunas ocasiones al trasplante del órgano para controlar el avance de un trastorno metabólico que afecta gravemente a su salud, es lo que sucede en pacientes con polineuropatía amiloidótica familiar. La polineuropatía amiloidótica familiar es una enfermedad metabólica crónica, en la que el hígado posee una estructura y función correcta salvo la síntesis anómala de una proteína denominada transferrina, que provoca el depósito de sustancia amiloide en varios órganos, pero sobre todo en el sistema nervioso. Los síntomas de la enfermedad comienzan a manifestarse entre la 2ª-3ª década de la vida, aunque en algunos casos tarda incluso 75 años en aparecer. El hígado sustraído de estos pacientes puede ser aprovechado para ser trasplantado a su vez en pacientes de edad avanzada o con tumores hepáticos de mal pronóstico en los que la supervivencia esperada tras el trasplante sea menor que el tiempo de

desarrollo de los síntomas de polineuropatía amiloidótica familiar (*Monteiro y cols. 1998; Azoulay y cols. 1999; Schmidt y cols. 1999; Furtado 2000; Carrera y cols. 2003; Pacheco-Moreira y cols. 2003*).

Trasplante hepático con injerto procedente de donante vivo. Consiste en la escisión de un segmento de uno de los lóbulos del hígado de un donante vivo y su posterior implante, generalmente a un familiar con relación sanguínea con el donante. Al principio, esta técnica fue utilizada para pacientes pediátricos (*Raia y cols. 1989*), pero en 1994 se realizó el primer trasplante hepático a un adulto realizado con el lóbulo derecho de un donante vivo (*Yamaoka y cols. 1994*). Actualmente esta modalidad quirúrgica representa una alternativa válida y segura en centros con experiencia en cirugía hepática llegando a representar el 25% del total de los trasplantes realizados (*Habib y cols. 1995; Marcos y cols. 2000; Shimada y cols. 2005*).

Donante a corazón parado. El donante a corazón parado fue en el inicio del trasplante hepático la única fuente de órganos hasta que se aceptó el concepto de muerte cerebral. Actualmente se distinguen dos tipos de donantes a corazón parado, controlados y no controlados. Muchos centros descartan el uso de los donantes no controlados (en los que el fallecimiento del donante ocurre en una situación fuera del control hospitalario) puesto que en este tipo de donantes no se puede conocer con exactitud el tiempo en el que el órgano permanece en el interior del organismo sin irrigación sanguínea antes de su extracción (tiempo de isquemia caliente) y las distintas experiencias en trasplante no son muy alentadoras (*D'Alessandro y cols. 1995; Casavilla y cols. 1995; D'Alessandro y cols. 2000*). Sin embargo, numerosos estudios muestran que el trasplante de hígados y otros órganos, tales como el riñón, procedentes de donantes controlados (en los que el fallecimiento del donante tiene lugar bajo control hospitalario y por lo tanto en los que se puede minimizar el tiempo de isquemia caliente) da lugar a resultados semejantes a los obtenidos con donantes cadavéricos aunque con un mayor riesgo de complicaciones biliares, y por tanto podrían constituir una fuente importante de donantes de hígado (*Shiroki y cols. 1997; Cho y cols. 1998; Hattori y cols. 1999; Light y cols. 1999; Abt y cols. 2003; Cooper y cols. 2004; Manzarbeitia y cols. 2004; Reddy S. y cols. 2004*).

El desarrollo de algunas de estas técnicas ha sido posible debido a la capacidad de regeneración del hígado ante el daño tisular, que a diferencia de otros tejidos con capacidad de regeneración, no depende de un grupo de células germinales (células stem) sino que se produce por la proliferación de las células hepáticas maduras (*Sherlock y cols. 2002, Fausto 2004*). Diversos estudios han mostrado que la respuesta regenerativa del hígado es proporcional a la cantidad de hígado removida, y tiene como resultado la recuperación del tamaño original del mismo al poco tiempo.

Pese a los esfuerzos realizados por aumentar la donación de órganos y aunque las estrategias adoptadas han permitido aumentar el número de órganos disponibles para ser trasplantados, éstas siguen siendo insuficientes para resolver el problema de la falta de órganos.

2.2 Disfunción y trasplante hepático

Todos los avances llevados a cabo en los últimos años han permitido mejorar significativamente el pronóstico del trasplante hepático, aumentando la supervivencia de los receptores y han convertido al trasplante hepático en la terapia de elección en niños y adultos con enfermedades hepáticas avanzadas sin tratamiento alternativo. Pero pese a todas las mejoras introducidas en la técnica del trasplante hepático, todos los hígados sufren durante la intervención quirúrgica un daño englobado bajo el término de lesión de isquemia/reperfusión (I/R). Este fenómeno es en la actualidad la causa principal tanto del mal funcionamiento inicial como del fallo primario del injerto hepático (FPI) tras el trasplante (*Clavien y cols. 1992; Jaeschke 1996; Henderson 1999; Farmer y cols. 2000; Fondevila y cols. 2003; Organización Nacional de Trasplante*). Tras la intervención quirúrgica es normal que el hígado sufra un periodo de disfunción que es reversible, pero si no logra recuperarse, entonces desemboca en el FPI, que normalmente causa la muerte del paciente a menos que éste sea retrasplantado urgentemente (*Bzeizi y cols. 1997; Moreno y cols. 1997*). El FPI es el responsable del 81% de los retrasplantes durante la primera semana tras la intervención quirúrgica (*Organización Nacional de Trasplante*). Aunque el retrasplante es factible si se obtiene otro hígado compatible en un tiempo razonable, ya que es un procedimiento relativamente fácil desde el punto de vista quirúrgico, supone el desaprovechamiento de los hígados trasplantados, acentuando aún más el problema de la falta de órganos.

En el trasplante de hígados marginales, la lesión de I/R se agrava, aumentando los casos de malfunción primaria y retrasplante tras la intervención quirúrgica (*Adam y cols. 1991; D'Alessandro y cols. 1991; Ploeg y cols. 1993; Marsman y cols. 1996; Trevisani y cols. 1996; Hayashi y cols. 1999; Ureña y cols. 1999; Selzner M. y cols. 2001; Koneru y cols. 2002*). El desarrollo de estrategias encaminadas a minimizar los efectos adversos del proceso de I/R en el trasplante hepático podría por un lado aumentar los órganos disponibles para el trasplante al permitir la utilización de los hígados marginales y por otro aumentar el número de pacientes que se recuperen exitosamente tras un trasplante hepático, reduciendo el número de retrasplantes y evitando de ese modo el desaprovechamiento de órganos.

3. LESIÓN DE I/R ASOCIADA AL TRASPLANTE HEPÁTICO

La lesión de I/R es un proceso complejo que tiene lugar cuando un órgano se ve privado de forma temporal del aporte sanguíneo (isquemia) y se manifiesta de forma predominante después del posterior restablecimiento del flujo sanguíneo (reperfusión). Existen numerosas situaciones en la práctica clínica en las que el hígado se ve sometido a un situación de isquemia y posterior perfusión, entre ellas, el trasplante hepático. Durante el trasplante hepático tienen lugar las siguientes fases de isquemia-reperfusión:

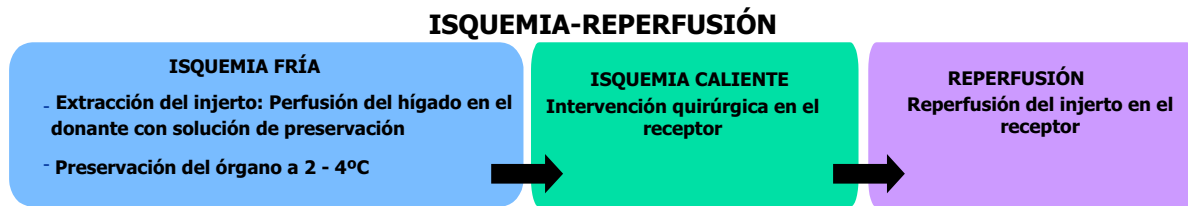


Figura 7. Isquemia-reperfusión en el trasplante hepático.

El procedimiento estándar para el trasplante hepático se inicia con la extracción del hígado del donante. Antes de su extracción el hígado es perfundido con la solución de preservación de la UW, a una temperatura de 4°C. En este momento comienza la fase de isquemia fría. A continuación, el hígado es extraído del donante y colocado en solución de preservación a bajas temperaturas (2-4°C), con la finalidad de enlentecer al máximo el metabolismo hepático hasta su posterior implante en el receptor. Este periodo de isquemia fría suele durar en la práctica clínica de 6 a 8 h. Tras este periodo de isquemia fría, el órgano es sometido a un periodo de isquemia caliente, que se prolonga desde que el órgano es situado en la cavidad abdominal del receptor hasta que se restablece el flujo sanguíneo en el hígado trasplantado. Es decir, este periodo de isquemia caliente corresponde al tiempo empleado en realizar la anastomosis de los vasos sanguíneos hepáticos en la intervención quirúrgica. Al restablecerse el flujo sanguíneo en el órgano comienza la fase de perfusión (Figura 7).

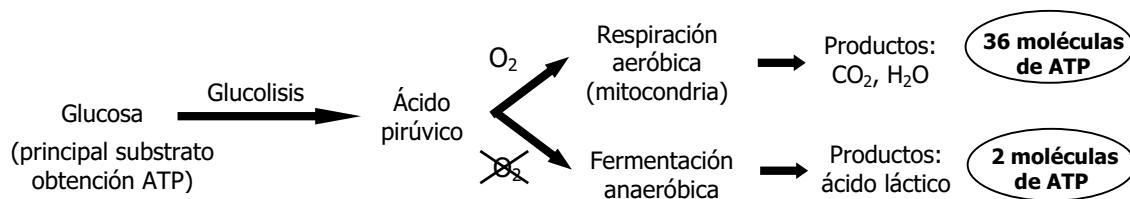
Estos periodos de isquemia fría y caliente, y posterior perfusión que tienen lugar en el trasplante hepático provocan la activación de toda una serie de mecanismos que dan lugar a la denominada lesión de I/R. Los mecanismos responsables de la lesión de I/R no están totalmente definidos pues se trata de procesos complejos en los que están implicados múltiples mediadores de la inflamación, plaquetas, neutrófilos y el endotelio vascular, los cuales al interactuar derivan en la lesión por perfusión. En la actualidad muchas de las investigaciones en el campo del trasplante hepático van encaminadas a comprender los mecanismos responsables de esta lesión con la finalidad de desarrollar estrategias terapéuticas que nos permitan minimizarla y minimizar así el riesgo de FPI y retrasplante asociada a la misma.

3.1 Mecanismos de lesión en el proceso I/R

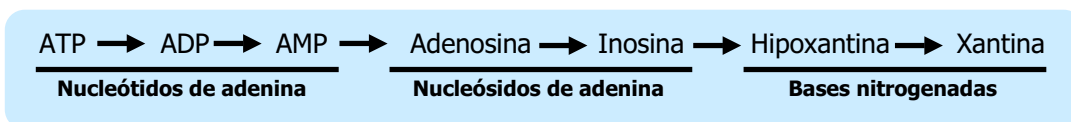
La lesión derivada del proceso de I/R tiene dos componentes fundamentales: la lesión por la isquemia debida a la falta de oxígeno, y la lesión por reperfusión provocada principalmente por la síntesis de diversos mediadores inflamatorios que son liberados al tejido y al torrente sanguíneo tras la restauración del flujo sanguíneo. En la introducción de esta tesis hemos recopilado exclusivamente los datos existentes en la literatura sobre los mediadores y mecanismos implicados en la lesión de I/R hepática objeto de esta tesis.

3.1.1 Isquemia

En la fase de isquemia, la falta de oxígeno detiene la cadena respiratoria mitocondrial y se produce la depleción de los niveles de ATP. La disminución del nivel energético conduce hacia el metabolismo anaerobio (vía glucolisis y fermentación láctica), con un rendimiento energético inferior que en condiciones aeróbicas, y a la acumulación de sus metabolitos tales como el ácido láctico. La acidosis metabólica resultante altera la cinética normal de los enzimas.



La depleción de ATP provoca la acumulación de sus productos de degradación, tales como la hipoxantina y la xantina:



Esto comporta la alteración de todos los sistemas ATP-dependientes, entre ellos las bombas de sodio/potasio y de calcio, con la consecuente pérdida del gradiente a través de las membranas celulares. Una consecuencia de estas alteraciones es la acumulación del Ca^{2+} citosólico, el cual activa diferentes sistemas enzimáticos, tales como fosfolipasas y proteasas implicadas fundamentales en la respuesta inflamatoria que posteriormente se desarrollará en la fase de reperfusión. Las proteasas tras su activación catalizan la conversión de la xantina deshidrogenasa (XDH) a xantina oxidasa (XOD), enzima implicado en la formación de RLO durante la reperfusión (Figura 8).

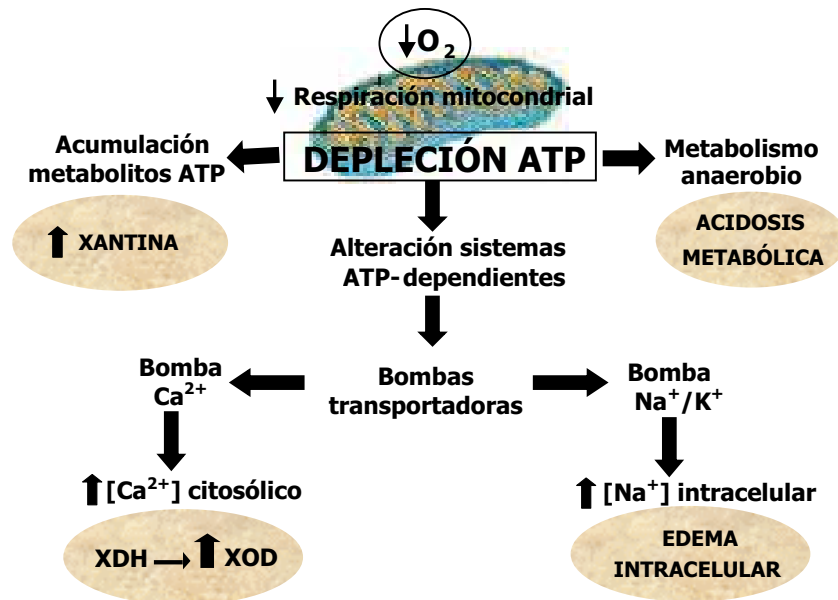


Figura 8. Esquema de los fenómenos que tienen lugar durante la isquemia.

Todos estos fenómenos inducen alteraciones en la permeabilidad e integridad de la membrana citoplasmática y de los orgánulos intracelulares, que pueden producir el edema de células de Kupffer y células endoteliales, y finalmente la muerte celular (*Lemasters y cols. 1995a; Bilzer y cols. 2000; Kang 2002; Jaeschke 2003a; Fondevila y cols. 2003*).

3.1.2 Reperfusión

Durante la reperfusión se produce el restablecimiento del flujo sanguíneo y con él ocurren la mayoría de las lesiones. Aunque produce efectos beneficiosos en el tejido isquémico al recuperarse los niveles de ATP deplecionados durante la isquemia, también se ponen de manifiesto los efectos de los metabolitos tóxicos formados durante la fase previa, que tienen repercusión a nivel sistémico y local.

Diversos autores sugieren que la lesión de reperfusión ocurre de forma bifásica (*Lemasters y cols. 1997; Jaeschke 1998; Fan y cols. 1999; Lichtman y cols. 1999*), así se distingue entre fase inicial o aguda y fase tardía o subaguda.

Fase inicial o aguda. Tiene lugar en las primeras h de reperfusión (< 6 h), y se caracteriza por la lesión inducida por la generación de RLO liberados tras la activación de las células Kupffer.

Durante el periodo de isquemia las células de Kupffer sinusoidales sufren una serie de alteraciones que derivan en su activación al inicio de la reperfusión (*Caldwell-Kenkel y cols. 1991; Arai y cols. 1994; Mochida y cols. 1994; Imamura y cols. 1995; Wanner y cols. 1996; Shibuya y cols. 1997; Farmer y cols. 2000*). Una vez activadas, liberan RLO al espacio vascular sinusoidal (anión superóxido y peróxido de hidrógeno, principalmente) (*Lentsch y cols. 2000*). Numerosos estudios apuntan a que la producción intracelular de RLO por el sistema xantina/XOD y por la mitocondria también contribuye a la lesión de I/R (*Pesonen y cols. 1998; Grattagliano y cols. 1999;*

Kang 2002). Los RLO inducen la liberación de numerosas citoquinas; el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleuquina 1 β (IL-1 β) son las citoquinas más comúnmente implicadas en la I/R hepática (Suzuki y cols. 1994b; Serracino-Inglott y cols. 2001). Ambas son potentes proinflamatorias que inducen la síntesis de otras citoquinas y de quemoquinas (como la IL-8), y regulan la expresión de moléculas de adhesión (como selectinas y β -integrinas) favoreciendo la acumulación de neutrófilos en el espacio vascular sinusoidal y su posterior interacción con las células endoteliales sinusoidales (Colleti y cols. 1998; Lentsch y cols. 2000). La producción de citoquinas proinflamatorias, quemoquinas y moléculas de adhesión en esta fase es regulada por factores de transcripción, tales como el factor nuclear κ B (NF- κ B) y el activador de proteínas-1 (AP-1), activados por los RLO liberados por las células de Kupffer (Zhou y cols. 1992; Le Moine y cols. 1997; Fan y cols. 1999; Jaeschke 2000).

La implicación de las células de Kupffer en el desarrollo de la lesión de I/R hepática ha sido demostrada en diversos estudios realizados en modelos experimentales de trasplante hepático y otros modelos de I/R hepática mediante la administración de activadores e inhibidores de su actividad. En estos trabajos se constató que la administración de cloruro de gadolinio (GdCl₃), un inhibidor de la activación de las células de Kupffer, disminuyó la lesión hepática asociada a la I/R hepática (Shiratori y cols. 1994; von Frankenberg y cols. 2003; Chung y cols. 2004); mientras que la administración de partículas de latex durante la reperfusión (que aumentan la actividad de las células de Kupffer) la agravó (Shiratori y cols. 1994).

En esta fase inicial de reperfusión además se produce un desequilibrio entre los vasoconstrictores (endotelinas, tromboxano) y vasodilatadores (óxido nítrico –NO-, prostaciclina) liberados al espacio vascular sinusoidal que tiene como consecuencia la vasoconstricción de los sinusoides hepáticos, que junto con el edema de células endoteliales y células de Kupffer, y el acúmulo de neutrófilos en los sinusoides hepáticos al inicio de la reperfusión causa el deterioro de la microcirculación hepática, dando lugar al denominado fenómeno de "no reflujo" (Figura 9) que contribuirá a agravar la lesión por reperfusión (Kawada y cols. 1993; Zhang JX. y cols. 1994 y 1995; Kawamura y cols. 1995; Lemasters y cols. 1995b; Pannen y cols. 1998; Clemens 1999; Menger y cols. 1999; Shimamura y cols. 1999; Carden y cols. 2000; Kawachi y cols. 2000; Uhlmann y cols. 2000; Cutrin y cols. 2002).

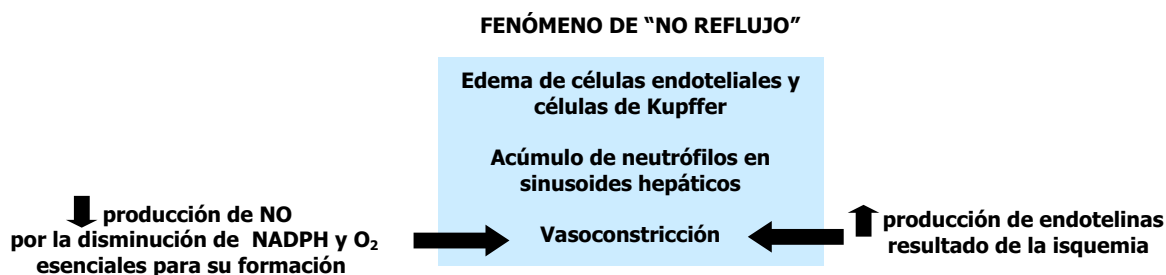


Figura 9. Mecanismos de las alteraciones microcirculatorias de los sinusoides hepáticos.

También se produce la adhesión de las plaquetas a las células endoteliales sinusoidales produciendo su muerte por apoptosis y contribuyendo de este modo a la disfunción hepática (Clavien 1998; Sindram y cols. 2000).

Fase tardía o subaguda. Comienza a tiempos más largos de reperfusión (> 6 h) y se prolonga durante algunos días. Se caracteriza por la lesión inflamatoria provocada por la infiltración masiva de neutrófilos en el tejido hepático y la liberación de mediadores citotóxicos (Vollmar y cols. 1995; Farmer y cols. 2000). La sucesión de fenómenos implicados en la acumulación y activación de neutrófilos se caracteriza por el rodamiento, adhesión, activación y extravasación de neutrófilos desde el endotelio vascular hasta el parénquima hepático (Suzuki y cols. 1994a; Jaeschke y cols. 1997 y 1998; Thiel y cols. 1998) (Figura 10).

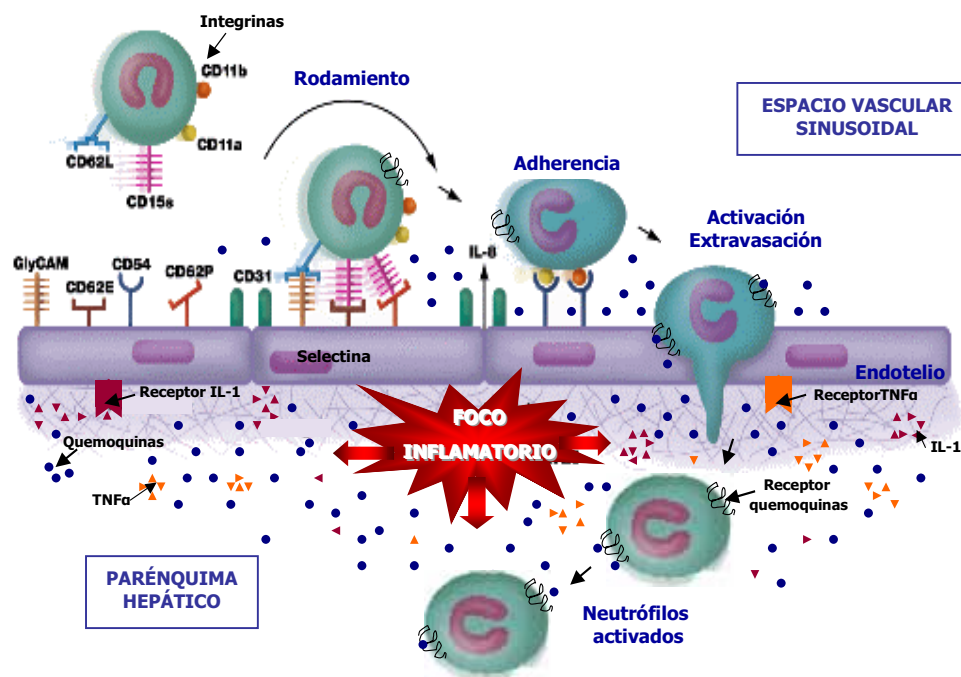
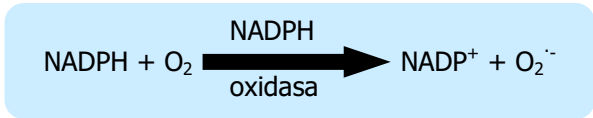


Figura 10. Mecanismos de adhesión y extravasación de neutrófilos.

La acumulación de neutrófilos activados en el parénquima hepático induce numerosas respuestas proinflamatorias: liberación de quemoquinas por parte de las células endoteliales y hepatocitos, activación de macrófagos y neutrófilos, producción de citoquinas proinflamatorias desde las células de Kupffer y aumento en la expresión de moléculas de adhesión. A su vez los neutrófilos activados liberarán mediadores citotóxicos que contribuirán a agravar la lesión hepática (Jaeschke y cols. 1997; Lentsch y cols. 2000; Serracino-Inglott y cols. 2001). Los principales mediadores citotóxicos liberados por los neutrófilos implicados en la lesión de I/R hepática son: las proteasas, sobre todo la catepsina y la elastasa responsables de la necrosis de los hepatocitos (Soejima y cols. 1999; Otsuka y cols. 2001); y los RLO. En la vía principal de generación de los RLO de los neutrófilos interviene la NADPH oxidasa. La enzima activada oxida el NADPH produciendo anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$).



La posterior reducción del anión superóxido produce peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que puede ser transformado en radical hidroxilo (HO·), o en ácido hipocloroso (HOCl) por acción de la liberación de mieloperoxidasa (MPO) presente en el interior de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos (Eiserich y cols. 1998). Estos RLO contribuirán a agravar la lesión hepática por diferentes mecanismos, por ejemplo facilitando la acción de las proteasas liberadas por los neutrófilos (Lentsch y cols. 2000).

Numerosos autores han concluido que la activación de los neutrófilos está implicada en el daño del parénquima hepático y en las alteraciones de la microcirculación asociados con la I/R hepática (Jaeschke y cols. 1990; 1991a; 1991b; 1991c; 1992a y 1993; Hisama y cols. 1996; Cutrin y cols. 2000), tras observar en diferentes modelos animales de I/R que al prevenir la infiltración de neutrófilos a los tejidos –tanto disminuyendo el número de neutrófilos como previniendo la adhesión de éstos- se redujo significativamente el fallo microcirculatorio y el daño tisular asociado al proceso de I/R (Lentsch y cols. 2000; Martínez-Mier y cols. 2001).

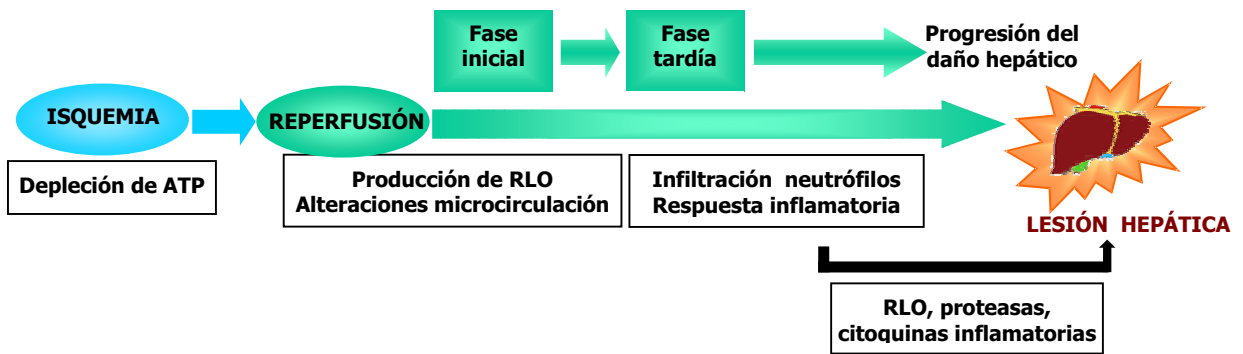


Figura 11. Mecanismos de la lesión hepática en las distintas etapas de la I/R.

La I/R hepática puede tener como consecuencia final la muerte de hepatocitos y células endoteliales sinusoidales. Existe controversia en cuanto al tipo de muerte que sufren los hepatocitos tras la I/R hepática si por necrosis o por apoptosis (Jaeschke 2000 y 2002b; Clavien y cols. 2001), pero numerosos estudios apuntan a que ambos tipos de procesos ocurren tras el trasplante hepático (Gao y cols. 1998; Yagnik y cols. 2002; Jaeschke y cols. 2003b). Diversos autores sugieren que existe correlación entre el porcentaje de hepatocitos y células sinusoidales que sufren apoptosis tras la I/R y el daño hepático y la supervivencia del animal tras el trasplante hepático (Gao y cols. 1998; Kohli y cols. 1999; Natori y cols. 1999 y 2003); en este sentido numerosas estrategias antiapoptóticas han resultado ser protectoras frente a la lesión de I/R hepática (Cursio y cols. 1999; Natori y cols. 2003).

3.2 Mediadores implicados en la lesión de I/R

Los numerosos trabajos realizados hasta el día de hoy en distintos modelos de I/R hepática nos han permitido conocer algunos de los mediadores implicados en el desarrollo de esta lesión y su participación en la misma, pero continuamente surgen nuevos trabajos implicando nuevos mediadores o esclareciendo algunas de las vías responsables de la lesión de I/R hepática.

3.2.1 Óxido nítrico

El NO es una molécula gaseosa producida por una familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintasas (NOS) a través de la conversión de L-arginina en L-citrulina. Se han descrito tres isoformas de la NOS: dos formas constitutivas, la NOS endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS), y una forma inducible (iNOS). En numerosos trabajos se observado que en la I/R hepática están implicadas la eNOS y la iNOS (*Wang Y. y cols. 1995; Hur y cols. 1999; Kawachi y cols. 2000; Farzaneh-Far y cols. 2001*).

La eNOS se expresa de forma constitutiva en las células endoteliales del hígado, aunque puede inducirse su expresión en respuesta a ciertos estímulos extracelulares como la adenosina o la bradiquinina. Su actividad depende de los niveles intracelulares de calcio (*Shah y cols. 1997*) (Figura 12).

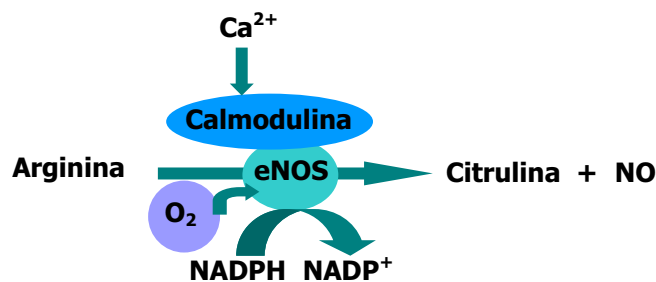


Figura 12. NOS constitutiva, dependiente de calcio-calmodulina.

El NO es un potente vasodilatador, y a través de la guanilato ciclasa produce relajación del músculo liso. En condiciones fisiológicas la producción basal de NO por la eNOS es responsable del mantenimiento del tono vascular de los sinusoides hepáticos actuando como regulador del flujo sanguíneo en los mismos (*Shah y cols. 1997; Rokey y cols. 1998*).

Por el contrario, la iNOS se expresa en células endoteliales, hepatocitos, células de Kupffer, neutrófilos y otros tipos celulares en respuesta a un estímulo, generalmente mediadores inflamatorios (tales como el TNF- α , la IL-1 β o el lipopolisacárido -LPS-). Su expresión esta regulada a nivel de transcripción y tiene lugar varias h después de la producción del estímulo (*Kitade y cols. 1996; Shiratori y cols. 1998; Hur y cols. 1999*). Su actividad es independiente de los niveles de calcio (*Shah y cols. 1997; Rokey y cols. 1998*) (Figura 13).

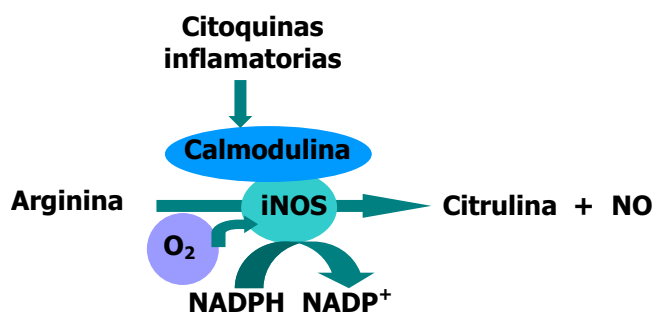


Figura 13. NOS inducible por citoquinas no dependiente de calcio.

Numerosos trabajos ponen de manifiesto la implicación del NO en la lesión de I/R hepática, pero el papel que desempeña en la misma no está totalmente esclarecido. Algunos autores indican que el NO tiene efectos beneficiosos en el proceso de I/R (*Kobayashi y cols. 1995; Peralta y cols. 1997; Liu y cols. 1998a; Koken y cols. 1999*), mientras que otros autores apuntan que el NO no participa en la respuesta ante una I/R o incluso que su papel es perjudicial (*Jaeschke y cols. 1992b*). Estos datos contradictorios podrían ser debidos al papel dual del NO. Por una parte, el NO puede tener un papel beneficioso sobre la lesión de I/R por sus acciones como vasodilatador, inhibidor de la adhesión de neutrófilos y plaquetas o secuestrador de RLO (*Koepfel y cols. 1997*). En este sentido, estudios llevados a cabo en diferentes modelos animales de I/R hepática han mostrado que la inhibición de la síntesis de NO está asociada con el aumento de la lesión de I/R, y con el descenso de la supervivencia en un modelo de trasplante hepático (*Wang Y. y cols. 1995; Koepfel y cols. 1997; Langle y cols. 1997; Liu y cols. 1998b; Cottart y cols. 1999; Shimamura y cols. 1999; Inglott y cols. 2000; Geller y cols. 2001; Peralta y cols. 2001a; Yagnik y cols. 2002*); mientras que la administración de L-Arginina, el precursor del NO endógeno, y otros precursores de NO, disminuye el daño por I/R y mejora la supervivencia tras el trasplante (*Kobayashi y cols. 1995; Jones y cols. 1996; Calabrese y cols. 1997; Koepfel y cols. 1997; Langle y cols. 1997; Ohmori y cols. 1998; Uhlmann y cols. 1998; Cottart y cols. 1999; Shimamura y cols. 1999; Geller y cols. 2001; Peralta y cols. 2001a; Rivera-Chavez y cols. 2001; Yagnik y cols. 2002*). Los autores de estos trabajos postulan que los efectos beneficiosos del NO sobre la lesión de I/R hepática podrían ser debidos a que mejora las alteraciones en la microcirculación asociadas a la I/R (*Kobayashi y cols. 1995; Jones y cols. 1996; Koepfel y cols. 1997; Pannen y cols. 1998; Uhlmann y cols. 1998; Cottart y cols. 1999;*), disminuye la adherencia e infiltración de neutrófilos (*Koepfel y cols. 1997; Liu y cols. 1998a; Uhlmann y cols. 1998*) y disminuye los RLO (*Peralta y cols. 1997; Yang BC. y cols. 1997*) tras la I/R hepática. Los mecanismos por los que el NO ejerce estos efectos beneficiosos en la I/R hepática no están totalmente definidos. Diversos autores sugieren que el NO liberado durante la I/R hepática podría modular la liberación de ciertas citoquinas proinflamatorias tales como el TNF- α y la IL-1 β modulando la activación de NF- κ B (*Hur y cols. 1999; Mojena y cols. 2001*), disminuyendo así la adherencia e infiltración de neutrófilos en el parénquima hepático y reduciendo las alteraciones microcirculatorias durante la reperusión. En cuanto al papel del NO sobre los RLO, diversos estudios muestran que el NO a bajas

concentraciones protege frente al estrés oxidativo (*Wink y cols. 1995*). Algunos autores indican que el NO podría preservar el contenido de glutatión (GSH) durante un proceso de I/R en un modelo de isquemia caliente (*Peralta y cols. 1997*). También se ha apuntado la posibilidad de que el NO pueda actuar sobre el sistema generador de RLO xantina/XOD, puesto que se ha demostrado que el NO puede inhibir la actividad de la XOD en un modelo experimental de trasplante hepático (*Fernández y cols. 2002*).

Por otra parte, una producción excesiva de NO puede ser citotóxica. Además el NO puede reaccionar con el anión superóxido y formar peroxinitrito, una especie reactiva altamente oxidante que puede producir peroxidación de los lípidos de membrana y nitración de los residuos tirosina de las proteínas (nitrotirosinas), produciendo importantes alteraciones funcionales en las mismas (*Stamler 1994; Beckman y cols. 1996; Szabo y cols. 1996; Liu y cols. 1997*). En este sentido, algunos autores sugieren que el NO derivado de la forma endotelial tiene un papel protector en la I/R, mientras que el NO derivado de la forma inducible podría contribuir a la lesión de I/R a través de la formación de especies oxidantes tales como el peroxinitrito, y atribuyen a este hecho el papel dual del NO (*Wang Y. y cols. 1998; Isobe y cols. 1999; Kawachi y cols. 2000; Lee y cols. 2001; Hines y cols. 2002; Yagnik y cols. 2002; Lanteri y cols. 2003; Serracino-Inglott y cols. 2003*). Un estudio reciente en trasplante hepático en humanos muestra que en la fase inicial de la reperfusión hepática hay una disminución de la producción de NO por la eNOS, lo que contribuye a las alteraciones en la microcirculación que tienen lugar en esta fase de la reperfusión; varias h después de iniciarse la reperfusión, continúa disminuida la expresión de la eNOS mientras que se ha inducido la expresión de la iNOS, y la expresión de la iNOS está asociada con la formación de nitrotirosinas, lo que sugiere el papel perjudicial del NO formado por la iNOS en la I/R hepática (*Varadarajan y cols. 2004*).

3.2.2 Radicales libres de oxígeno.

Los radicales libres son moléculas, iones o átomos que contienen uno o más electrones desapareados en su estructura. Por ello son sustancias inestables y poseen una gran capacidad reactiva. Pueden captar o ceder electrones muy fácilmente, generando reacciones en cadena hasta dar lugar a compuestos más estables. Los radicales libres que contienen oxígeno se denominan radicales libres de oxígeno. Los RLO mayormente implicados en la I/R hepática son: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y el peroxinitrito ($OONO^{\cdot}$). El H_2O_2 no es estrictamente un RLO ya que no tiene un electrón libre, pero se considera junto con los RLO por su capacidad de formar radicales hidroxilo.

Estas especies reactivas se generan a partir del oxígeno molecular (O_2), y pueden producirse en el organismo humano en condiciones fisiológicas. El O_2 puede ser convertido en $O_2^{\cdot-}$ por diferentes vías. Cuando dos $O_2^{\cdot-}$ interactúan, se forma H_2O_2 , reacción que es catalizada por la superóxido dismutasa (SOD). A su vez, H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ pueden reaccionar para dar lugar al radical

$\text{OH}\cdot$, y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el NO pueden reaccionar para formar $\text{OONO}\cdot$. Estas interconversiones se pueden producir simultáneamente; de este modo, la formación del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) comporta la producción rápida de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito ($\text{OONO}\cdot$) y radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) (Figura 15).

Los RLO son uno de los principales mediadores implicados en la lesión de I/R asociada al trasplante hepático (Connor y cols. 1992; Ardite y cols. 1999; Farmer y cols. 2000). La implicación de los RLO en la generación de la lesión asociada a la I/R ha sido demostrada en diversos estudios en los que se observó que la administración de sustancias como el alopurinol (inhibidor de la xantina oxidasa), el glutatión, la N-acetilcisteína o el α -tocoferol, que reducen el estrés oxidativo, redujo de forma significativa la lesión de I/R hepática (Koepfel y cols. 1996; Mizoe y cols. 1997; Fernández y cols. 2002; Gondolesi y cols. 2002; Peralta y cols. 2002; Schauer y cols. 2004).

Los RLO pueden actuar de una manera directa sobre diferentes dianas en el tejido afectado (proteínas, lípidos, azúcares, DNA) causando de esta manera una lesión. De entre las lesiones que producen los RLO de este modo destaca el daño que producen actuando a nivel de los lípidos de membrana produciendo su peroxidación. Algunos estudios apuntan a que la peroxidación lipídica parece ser el mecanismo principal de lesión de los RLO (Mathews y cols. 1994), ya que se ha observado que los marcadores de peroxidación lipídica están aumentados durante la reperfusión en trasplantes y resecciones hepáticas (Biasi y cols. 1995; Galley y cols. 1995; Cerwenka y cols. 1999). La lipoperoxidación es producida preferentemente por el anión superóxido o por el radical hidroxilo. Los productos generados por la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y de los fosfolípidos de la membrana son por sí mismos agentes oxidantes que generan una reacción en cadena ampliando el efecto lesivo a toda la membrana. El daño de la membrana celular puede afectar a su integridad o la de los orgánulos celulares, comprometiendo la correcta función celular. De este modo, se ha observado en modelos de isquemia normotérmica que tras la I/R hepática la acción de los RLO sobre la membrana mitocondrial da lugar a la formación de poros de transición y a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Qian y cols. 1997; Elimadi y cols. 2001; Leducq y cols. 2000).

Pero éste no es el único mecanismo por el cual los RLO lesionan el tejido hepático, también pueden inducir la lesión en el tejido afectado actuando como segundos mensajeros desencadenando cascadas de transducción de señales. Diferentes estudios demuestran que los RLO modulan la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, implicados en la expresión de citoquinas proinflamatorias, quemoquinas y moléculas de adhesión en la I/R hepática (tales como TNF- α , IL-10 y el factor de agregación plaquetaria -PAF-) (Zhou y cols. 1992; Le Moine y cols. 1997; Fan y cols. 1999; Jaeschke 2000). Además los RLO pueden modular las proteinquinas mitógeno activadas (MAPK), una familia de proteínas envueltas en distintas vías de señalización celular y que son responsables de la activación de distintos factores nucleares de transcripción. En un modelo experimental de trasplante hepático se ha demostrado tras la

I/R aumenta la actividad de las MAPK reguladas por señales extracelulares (ERK) y de las MAPK c-jun N-terminal quinasas (JNK), implicadas en la proliferación celular y la inducción de la apoptosis, respectivamente (*Schlossberg y cols. 1996; Bradham y cols. 1997*).

El estrés oxidativo que acompaña a un proceso de I/R hepática es la consecuencia del desequilibrio entre el aumento de la producción de RLO por parte de los sistemas generadores de RLO y la falta de eficacia de los sistemas antioxidantes para neutralizarlos. Se sabe que durante la I/R debido al aumento de la producción de RLO tiene lugar la inactivación de la SOD y la depleción de los niveles de glutatión, ambos sistemas de defensa frente a los RLO, contribuyendo aún más a los efectos nocivos de los RLO (*Peralta y cols. 2002*).

Sistemas generadores de RLO en la I/R hepática.

Generación mitocondrial

Las mitocondrias son una fuente de radicales libres, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En condiciones fisiológicas la cadena respiratoria mitocondrial transfiere 4 electrones a la molécula de oxígeno, para dar lugar a una molécula de agua. El mecanismo no es 100% eficaz y se generan pequeñas cantidades de anión superóxido. En determinadas situaciones, tales como en la I/R hepática, la cadena respiratoria mitocondrial puede verse afectada y producir una proporción mucho más elevada de RLO que en condiciones fisiológicas. De este modo, durante el proceso de isquemia, la falta de aporte de oxígeno al tejido hepático detiene el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial y se produce la disminución del nivel energético celular. Tras el inicio de la reperfusión, se producen alteraciones en los complejos de la cadena respiratoria y, como consecuencia hay una mayor producción de anión superóxido, que en última instancia lleva a la formación de poros de transición en la membrana mitocondrial y a la pérdida del potencial de membrana (*Qian y cols. 1997; Elimadi y cols. 2001; Leducq y cols. 2000*).

Generación por fagocitos

La producción extracelular de RLO por parte de las células de Kupffer y los neutrófilos es un mecanismo fisiológico de defensa del que disponen los fagocitos frente a las células bacterianas. Ahora bien, en determinadas situaciones este mecanismo puede estar implicado en lesiones tisulares. Durante la I/R hepática, la activación de las células de Kupffer y neutrófilos tiene como consecuencia, entre otros efectos, la producción extracelular de RLO los cuales contribuyen de una forma importante al daño vascular y tisular que tiene lugar durante la reperfusión (*Connor y cols. 1992; Farmer y cols. 2000*). En la producción de RLO por parte de los fagocitos está implicada la NADPH oxidasa asociada a la membrana celular.

Sistema xantina/xantina oxidasa

En los procesos de I/R el sistema xantina/XOD está considerado como una de las principales fuentes de radicales libres (*Saugstad 1996; Zhong y cols. 1997; Fernández y cols. 2002; Peralta y cols. 2002*).

El enzima XDH/XOD presenta dos isoformas que catalizan las mismas reacciones: el paso de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico. Se diferencian en la molécula que utilizan como aceptor de electrones, mientras que la forma deshidrogenasa utiliza NAD^+ como aceptor de electrones, la forma oxidasa utiliza la molécula de oxígeno generando radicales superóxido (*Kooij 1994; Harris y cols. 1997*). La conversión de XDH a XOD puede tener lugar de manera reversible por oxidación de los puentes disulfuro que estabilizan el enzima o bien de forma irreversible por proteólisis limitada.

En la fase de isquemia los compuestos con fosfatos de alta energía (ATP) se degradan dando lugar a la acumulación de hipoxantina y xantina. De forma paralela, se alteran los sistemas dependientes de ATP, tales como la bomba de calcio y se produce la acumulación de calcio en el citosol celular, que activa los enzimas proteolíticos que conllevan la transformación de XDH en XOD (*Saugstad 1980*). Al iniciarse la reperfusión hepática y como consecuencia del aporte de oxígeno, la hipoxantina y xantina acumuladas durante la isquemia son metabolizadas por la xantina oxidasa, dando lugar al anión superóxido que juega un papel muy importante en el daño por I/R (Figura 14).

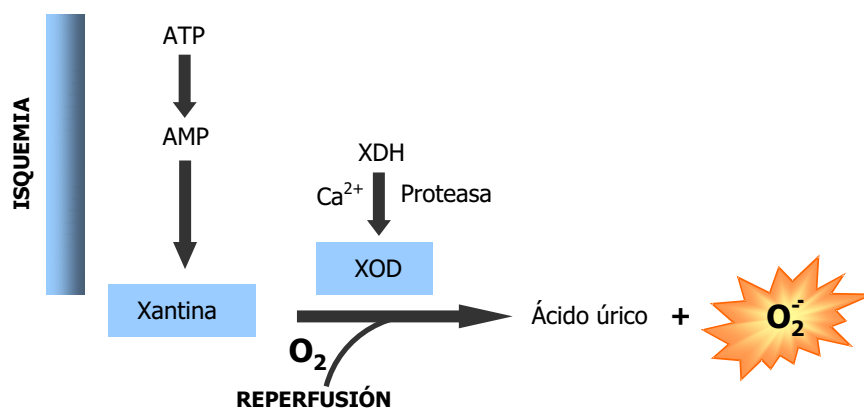


Figura 14. Sistema xantina/xantina oxidasa como generador de RLO.

En diferentes modelos experimentales de I/R normotérmica y de trasplante hepático se ha observado que durante la reperfusión la forma predominante de la XDH/XOD es la XOD, y que la administración de alopurinol disminuye el daño por I/R hepática, apuntando hacia el sistema xantina/XOD como un sistema clave en la generación de RLO asociada a una I/R hepática (*Zhong y cols. 1997; Fernández y cols. 2002; Peralta y cols. 2002*). A nivel clínico, también se ha observado tras el trasplante hepático un aumento en la concentración plasmática de XOD y de

xantina e hipoxantina y se apunta a estos parámetros como posibles reflejos de viabilidad del injerto durante un trasplante hepático (*Pesonen y cols. 1998*).

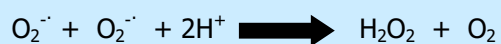
Además, la utilización de antagonistas del calcio en modelos experimentales de isquemia normotérmica mostró que protegen frente a la lesión de I/R hepática cuando se administran antes de la realización de la misma, implicándose en su acción protectora la inhibición de la activación de las proteasas que convierten la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa. (*Nauta y cols. 1991; Kito y cols. 1993; Stein y cols. 1993; Chavez-Cartaya y cols. 1996*).

Los efectos nocivos del sistema xantina/XOD no están limitados al hígado. Al restablecerse el flujo sanguíneo, tanto la xantina como la XOD son liberadas a la circulación sistémica y pueden alcanzar otros órganos. El sistema xantina/XOD ha sido implicado en alteraciones pulmonares (estrés oxidativo y acumulación de neutrófilos) asociadas al trasplante hepático (*Grum y cols. 1991; Weinbroum y cols. 1995; Pesonen y cols. 1998; Fan y cols. 1999; Fernández y cols. 2002*).

Sistemas de defensa frente al estrés oxidativo

Mecanismos enzimáticos

Superóxido dismutasa. La superóxido dismutasa es el primer enzima de la vía de detoxificación de los RLO (Figura 15). Contiene cobre y zinc en su molécula y se encuentra presente en el citoplasma y en el espacio intermembrana mitocondrial. La SOD cataliza la reacción entre dos radicales superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y da lugar a una molécula de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), de esta forma disminuye la cantidad de radical $O_2^{\cdot -}$.



La síntesis de SOD está regulada a nivel genético y puede modificarse en respuesta a concentraciones de oxígeno altas, generación de radicales superóxido o disponibilidad de metales. La disponibilidad de este enzima es indicativa de la capacidad de la célula para hacer frente a un estrés oxidativo.

Durante un proceso de I/R hepática se produce el aumento de radicales $O_2^{\cdot -}$, lo que provoca la inactivación de la SOD (*Peralta y cols. 2002*), acentuándose aún más los efectos nocivos de los RLO. En modelos experimentales de trasplante hepático se ha demostrado que la sobreexpresión del gen de la SOD protege frente a la lesión de I/R asociada al trasplante disminuyendo la producción de RLO (*Lehmann y cols. 2003*)

Catalasa. La catalasa se encuentra presente en prácticamente todos los tejidos pero en cantidades muy diferentes; los eritrocitos y los hepatocitos son especialmente ricos en catalasa. Este enzima cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno a agua (Figura 15). Dentro de la célula la actividad catalasa se encuentra confinada en orgánulos subcelulares, principalmente

en los peroxisomas, pero también se puede encontrar catalasa no peroxisomal en células de ciertos tejidos (*Link 1990*).

Peroxidasas. De todas las peroxidasas, la más importante es la glutatión peroxidasa (GSHPx), enzima que se localiza en el citosol y la matriz mitocondrial de las células de la mayoría de las especies. Cataliza la reacción de paso de glutatión reducida a glutatión oxidada (Figura 15).

Mecanismos no enzimáticos: glutatión

El glutatión es un tripéptido formado por los aminoácidos: ácido glutámico-cisteína-glicina. Está presente en concentraciones pequeñas en el hígado y juega un papel importante en su protección frente al daño oxidativo actuando como secuestrador de RLO y como sustrato de la glutatión peroxidasa (*Koken y cols. 1999*). Existe en forma reducida (GSH) y en forma oxidada (GSSG); en la forma oxidada dos moléculas de glutatión se unen a través de un puente disulfuro formado entre los grupos tiol de la cisteína. El paso de GSH a GSSG consume peróxido de hidrógeno, neutralizando esta molécula (Figura 15). El cociente GSH/GSSG es indicativo del estrés oxidativo de un tejido, así cuando este cociente es alto, el tejido cuenta con defensas ante los RLO, y cuando éste disminuye el tejido está sometido a un estrés oxidativo que hace que predomine la forma oxidada del glutatión.

Tras someter al hígado a un proceso de I/R se ha observado que disminuyen los niveles de GSH. Este descenso de GSH aumenta la vulnerabilidad del mismo ante la producción aumentada de RLO que acompaña a un proceso de I/R (*Koken y cols. 1999; Peralta y cols. 2002*).

También existen otros sistemas de defensa no enzimáticos. Las células disponen de un número elevado de sustancias con capacidad de reaccionar directamente con las especies activadas y los radicales libres, o bien con productos de reacción de éstos sin necesidad de ningún enzima. Entre estos antioxidantes se encuentran la vitamina C, la vitamina E o tocoferol, los β -carotenos, el ácido úrico y los flavonoides (*Serracino-Inglott y cols. 2001*).

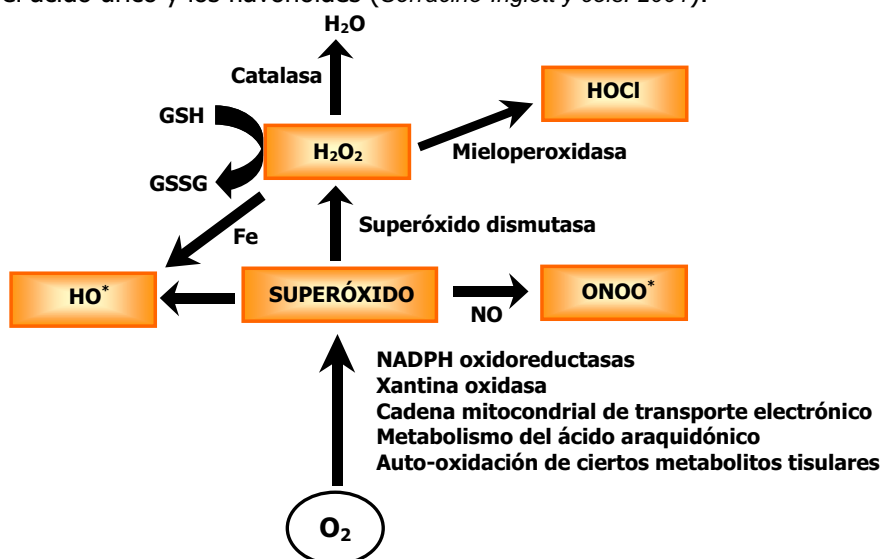


Figura 15. Radicales libres de oxígeno: formación, interconversiones y detoxificación.

3.2.3 Citoquinas

Las citoquinas son un grupo de proteínas no estructurales producidas por una amplia variedad de células en respuesta a diferentes estímulos, que promueven y regulan la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Su síntesis está regulada a nivel de transcripción, y una vez sintetizadas su secreción es breve, autolimitada y no se almacenan como moléculas preformadas. Actúan sobre diferentes tipos celulares, y a menudo, tienen efectos diferentes sobre la misma célula diana. Inician su acción al unirse a receptores específicos de la membrana de la célula diana. La célula diana sobre la que actúan puede ser la misma célula que secreta la citoquina (acción autocrina), una célula próxima (acción paracrina) o bien una célula distante a la que llega a través de la circulación (acción endocrina). La expresión de los receptores de las citoquinas está regulada por citoquinas, que permiten la amplificación positiva o retroalimentación negativa de la respuesta inflamatoria e inmunitaria inducida por las mismas.

En un proceso de I/R hepática se encuentran implicadas numerosas citoquinas que modulan la respuesta inflamatoria asociada a la I/R. Entre estas citoquinas se encuentra la IL-10, que es una citoquina anti-inflamatoria producida por linfocitos y macrófagos, que modula la respuesta de otras citoquinas y quemoquinas en diversos modelos de inflamación. Se sabe que la IL-10 suprime la activación de los macrófagos, mediante la inhibición de la síntesis de citoquinas proinflamatorias y de la generación de RLO, durante la fase aguda de la inflamación. En diferentes modelos de I/R hepática se ha observado que existe liberación de IL-10, y se piensa que ésta puede tener un papel esencial en la supervivencia de los animales (*Yoshidome y cols. 1999; Yagihashi y cols. 2000; Zou y cols. 2000*). Recientemente un estudio en un modelo experimental de trasplante hepático ha demostrado que la administración de IL-10 reduce la lesión hepática de I/R asociada al trasplante (*Donckier y cols. 2003*).

Otra citoquina implicada en la I/R hepática es la IL-6 (*Lemasters y cols. 1997*). Algunos autores han observado que el daño por reperfusión disminuye al administrar IL-6 recombinante o se agrava en ratones deficientes en IL-6 (*Camargo y cols. 1997; Selzner M. y cols. 1999*). Su liberación está asociada con el inicio de la respuesta regenerativa del hígado, y en un modelo de trasplante hepático en ratón se ha observado que sus niveles son proporcionales al tiempo de isquemia fría (*Que y cols. 2004*). Por otro lado, la IL-6 puede tener efectos antiinflamatorios regulando el mRNA de TNF- α durante la reperfusión (*Camargo y cols. 1997*).

Las citoquinas que tienen un papel más importante en la lesión local (hígado) y sistémica (pulmón) asociada I/R hepática son el TNF- α y la IL-1 β , ambas con potentes acciones proinflamatorias. Estas citoquinas inician y mantienen la respuesta inflamatoria asociada al proceso de I/R que es responsable de la lesión del parénquima hepático. Ambas inducen la síntesis de quemoquinas como la IL-8 y regulan la expresión de moléculas de adhesión, favoreciendo la acumulación de neutrófilos en el espacio sinusoidal y su posterior interacción

con las células endoteliales sinusoidales (*Lentsch y cols. 2000*). La sucesión de fenómenos de adhesión lleva a la infiltración de neutrófilos en el parénquima hepático y la lesión inflamatoria del mismo. Además se ha observado en diferentes modelos de I/R que ambas citoquinas están implicadas en la producción de RLO; y que el TNF- α bajo determinadas circunstancias puede inducir directamente la muerte de los hepatocitos por apoptosis (*Colletti y cols. 1996; Shibuya y cols. 1997; Shirasugi y cols. 1997; Shito y cols. 1997; Rudiger y cols. 2002a*). El papel de estas dos citoquinas en la I/R ha sido demostrado en diversos estudios en los que se observó que la administración de anticuerpos y antagonistas de sus receptores, disminuyeron la lesión hepática asociada a la I/R (*Shirasugi y cols. 1997; Shito y cols. 1997; Hashimoto y cols. 2000; Harada y cols. 2002*).

El TNF- α tiene un papel central en la I/R hepática (*Colletti y cols. 1990a; Suzuki y cols. 1994b; Rudiger y cols. 2002a; Teoh y cols. 2004*). Diversos estudios en modelos de isquemia hepática normotérmica y fría muestran que la activación de las células de Kupffer es muy importante en el desarrollo de la lesión de I/R, siendo el TNF- α el principal efector de estas células (*Colletti y cols. 1990a; Goto y cols. 1992*). Varios autores relacionan el papel del TNF- α con la supervivencia en distintos modelos de I/R hepática; en los trabajos llevados a cabo por dichos autores se observa que la administración de inhibidores del TNF- α , como la talidomida o la pentoxifilina, disminuye de forma importante la lesión de I/R y aumenta la supervivencia de los animales (*Urata y cols. 2000; Rudiger y cols. 2002a*). Además el TNF- α no ejerce su acción solamente a nivel hepático; al iniciarse la reperfusión es liberado a la circulación sistémica pudiendo alcanzar órganos remotos produciendo su lesión. Se sabe que el TNF- α está implicado en la lesión pulmonar asociada a la I/R hepática. Los resultados obtenidos tras la administración de anticuerpos dirigidos contra TNF- α en un modelo de I/R normotérmica corroboran estas afirmaciones (*Colletti y cols. 1990a y 1998*).

Sin embargo, el TNF- α puede tener numerosos efectos que van desde inducir la muerte celular en determinadas circunstancias a promover la regeneración celular en otras. Puesto que el TNF- α está envuelto en la regeneración hepática, podría ser necesario a largo plazo para la recuperación del daño de I/R (*Akerman y cols. 1992; Camargo y cols. 1997; Teoh y cols. 2003a*).

3.3 Efectos sistémicos derivados del proceso de I/R hepático

La lesión por reperfusión asociada a la I/R que se produce tras el trasplante hepático, no se limita exclusivamente al hígado, sino que también la I/R puede producir alteraciones en órganos remotos, entre las cuales cabe destacar las alteraciones pulmonares. Tras un trasplante hepático se ha descrito a nivel pulmonar la presencia de edema y hemorragias, acumulación de neutrófilos y cambios en la permeabilidad vascular. Estas alteraciones en su forma más grave pueden desembocar en distrés respiratorio, el cual ocurre casi siempre en el

contexto de un fallo multisistémico, que puede estar en relación con la lesión de I/R hepática y sus repercusiones sistémicas (Goto y cols. 1992; Yost y cols. 2001).

Existen dos hipótesis que intentan explicar las lesiones hepática y pulmonar asociadas al trasplante de hígado. Una primera hipótesis sugiere que en el momento de la reperfusión se liberan a la circulación sistémica sustancias proinflamatorias –como el TNF- α –, procedentes del intestino y del bazo, formadas en los mismos como consecuencia de la congestión esplácnica que tiene lugar durante la intervención quirúrgica del trasplante por la oclusión de la vena porta (Figura 16). Estas sustancias proinflamatorias serían las responsables de inducir la lesión hepática y pulmonar asociada al trasplante hepático (Sankary y cols. 1996 y 1999; Okuaki y cols. 1996; Carvalho y cols. 1999). La segunda hipótesis apunta a que es el propio hígado el responsable de inducir la síntesis de estos mediadores proinflamatorios durante la reperfusión (Colletti y cols. 1990a; Strieter y cols. 1993; Shibuya y cols. 1997; Urata y cols. 2000). Y estos mediadores no sólo serían los responsables de la lesión hepática, sino que su paso al torrente sanguíneo tendría efectos sistémicos nocivos (Figura 16). En algunos estudios se apunta al TNF- α sintetizado en el hígado durante la reperfusión como principal mediador implicado (Colletti y cols. 1990b; Goto y cols. 1992; Sheron y cols. 1992; Nishimura y cols. 1993; Suzuki y cols. 1996), mientras que otros estudios apuntan a que el sistema xantina/XOD generado en el hígado durante el periodo de isquemia podría liberarse a la circulación general tras la reperfusión y de este modo provocar daño a nivel pulmonar (Grum y cols. 1991; Weinbroum y cols. 1995; Pesonen y cols. 1998; Fan y cols. 1999; Fernández y cols. 2002; Peralta y cols. 2002).

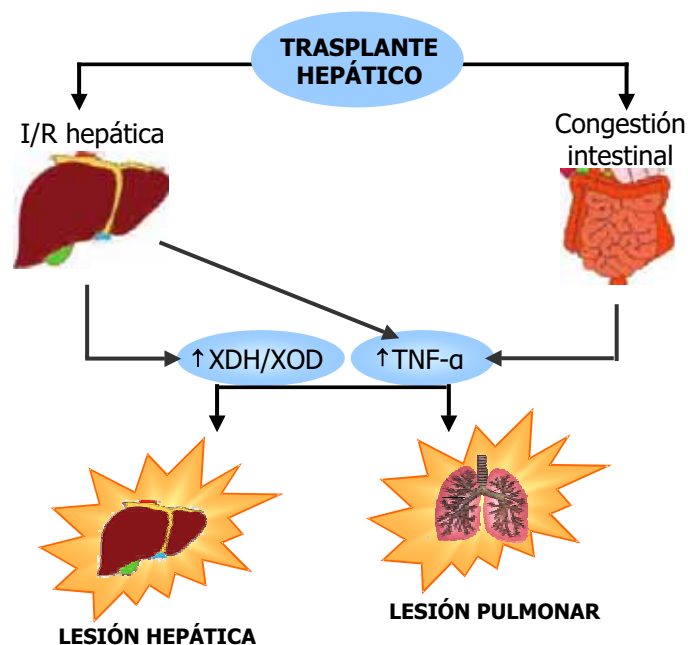


Figura 16. Lesión pulmonar asociada al trasplante hepático.

4. TRASPLANTE HEPÁTICO DE INJERTOS GRASOS O ESTEATÓSICOS

Debido a la falta de donantes, muchas de las investigaciones actuales en el campo del trasplante hepático van dirigidas a la posible utilización de los órganos subóptimos o marginales como estrategia para aumentar el número de órganos disponibles para ser trasplantados (Neuberger 2004; Rocha y cols. 2004). En este grupo son de especial interés los órganos grasos o esteatósicos, debido a su alta prevalencia entre los posibles donantes de hígado (D'Alessandro y cols. 1991; Miki y cols. 1998; Selzner M. y cols. 2001; Koneru y cols. 2002). Actualmente la principal causa por la que son descartados los hígados para ser trasplantados es la esteatosis hepática (54% de los hígados deshechados) (Organización Nacional de Trasplante).

4.1 Definición y clasificación de hígados grasos

Un hígado normal posee aproximadamente un contenido de grasa de un 5% de su peso total, siendo los fosfolípidos las grasas más abundantes, y en menor medida triglicéridos y colesterol no esterificado. Se considera que un hígado es graso cuando su contenido lipídico supera el 5% de su peso total y éste está constituido principalmente por triglicéridos (Sherlock y cols. 2002).

Un hígado graso se caracteriza por presentar un tamaño aumentado, consistencia pastosa, color amarillento y bordes romos; y su presencia está asociada a una gran variedad de condiciones como la ingesta de alcohol, la obesidad, la malnutrición, la alimentación parenteral, enfermedades metabólicas o endocrinas como la diabetes, el consumo de ciertos fármacos y ciertos tipos de hepatitis infecciosas (Koneru y cols. 2002; Busuttil y cols. 2003). En general se diagnostica de forma casual durante exploraciones de abdomen realizadas por otros motivos o en el momento de la donación.

En un hígado esteatósico la grasa se acumula en el citoplasma de los hepatocitos y de las células endoteliales de los sinusoides hepáticos. Atendiendo a como se distribuye la grasa en el citoplasma celular se distinguen los siguientes tipos de esteatosis hepática:

- esteatosis microvesicular, en la que aparecen múltiples vacuolas pequeñas de grasa en el citoplasma de las células sin desplazamiento del núcleo y que son positivas en las tinciones de grasas. Normalmente está asociada a trastornos metabólicos (Sherlock y cols. 2002; D'Alessandro y cols. 1991; Imber y cols. 2002), y a situaciones de déficit energético celular (Fromenty y cols. 1997a y 1997b) (Figura 17).

- esteatosis macrovesicular, en la que aparece una sola vacuola de gran tamaño, que desplaza el citoplasma y el núcleo hacia la periferia. Este tipo de esteatosis está asociada comúnmente a obesidad, diabetes o abuso de alcohol. Es la forma más común en los donantes de hígado (Sherlock y cols. 2002; D'Alessandro y cols. 1991; Imber y cols. 2002) (Figura 17).

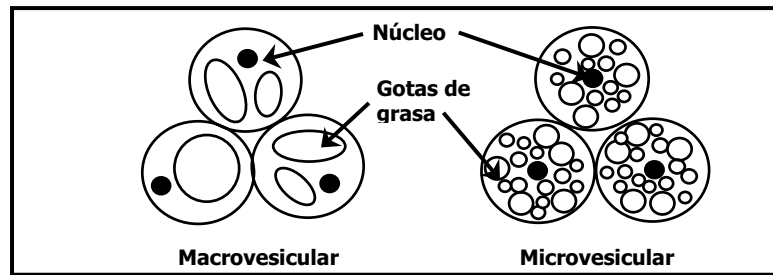


Figura 17. Diferencia entre esteatosis macro- y microvesicular.

Cuantitativamente, la esteatosis se puede clasificar atendiendo al porcentaje de hepatocitos que muestran vacuolas lipídicas en su citoplasma (Adam y cols. 1991; D'Alessandro y cols. 1991). De este modo, se puede distinguir entre esteatosis:

- leve: menos del 30% de los hepatocitos muestra grasa en su citoplasma.
- moderada: entre el 30-60% de los hepatocitos presenta grasa en el citoplasma.
- severa: más del 60% de los hepatocitos presenta vacuolas lipídicas en su citoplasma.

4.2 Evaluación de los hígados esteatósicos para el trasplante

La esteatosis hepática es uno de los factores más importantes a la hora de considerar un órgano apto o no para ser trasplantado, ya que el riesgo de sufrir FPI tras el trasplante es muy alto en este tipo de hígados (Adam y cols. 1991; D'Alessandro y cols. 1991; Ploeg y cols. 1993; Marsman y cols. 1996; Trevisani y cols. 1996; Hayashi y cols. 1999; Ureña y cols. 1999; Selzer y cols. 2001; Koneru y cols. 2002). Un problema importante relativo a este tipo de hígados es establecer el grado de esteatosis que permite descartar a un órgano esteatósico para el trasplante. Prácticamente todos los autores coinciden en que los hígados con esteatosis severa (> 60% de infiltración grasa) no deben ser trasplantados, ya que su uso está asociada a disfunciones postoperatorias tras el trasplante (D'Alessandro y cols. 1991; Ploeg y cols. 1993; Canelo y cols. 1999; Loinaz y cols. 2000; Fan y cols. 2001; Koneru y cols. 2002); mientras que la utilización de hígados con esteatosis leve (< 30% de infiltración grasa) parece no afectar al resultado del trasplante (Markin y cols. 1993; Ureña y cols. 1999; Koneru y cols. 2002). Los resultados que se obtienen con hígados con infiltración grasa moderada (entre 30-60%) son más variables; hay estudios que muestran que aunque la supervivencia de los receptores que han recibido un hígado de este tipo es similar a la de un receptor con un hígado no grasa (Adam y cols. 1991; Markin y cols. 1993; Strasberg y cols. 1994; Hayashi y cols. 1999;), el porcentaje de disfunción es mayor en los que el hígado era esteatósico (Strasberg y cols. 1994; Chui y cols. 1998). Los hígados con esteatosis moderada no deberían ser descartados para el trasplante, pero preferentemente estos hígados deberían utilizarse cuando no haya riesgos adicionales en el donante ni en el receptor (Clavien y cols. 1992; Strasberg y cols. 1994; Salizzoni y cols. 2003) (Figura 18).

El efecto que tiene el tipo de esteatosis, macro o microvesicular, sobre el éxito del trasplante no está del todo claro puesto que hay diferentes estudios con resultados contradictorios. Casi todos los autores coinciden en que el trasplante de hígados con esteatosis macrovesicular severa está asociado a un mayor riesgo de disfunción y menor supervivencia tras el trasplante (*Strasberg y cols. 1994; Marsman y cols. 1996; Fishbein y cols. 1997; Ureña y cols. 1998; Melendez y cols. 1999; Fan y cols. 2001*). En cuanto al trasplante de hígados con esteatosis microvesicular de cualquier grado, hay algunos autores que apuntan a que su utilización no conlleva un mayor riesgo de disfunción (*Fishbein y cols. 1997; Melendez y cols. 1999; Crowley y cols. 2000*) y a que la supervivencia de los pacientes receptores es similar a los receptores de un hígado no esteatósico (*Fishbein y cols. 1997; Ureña y cols. 1998; Fan y cols. 2001; Crowley y cols. 2000*), mientras que otros autores apuntan a que sí afecta a la supervivencia de los pacientes tras el trasplante, reduciéndola de manera significativa (*Yoong y cols. 1999*). Recientemente, un estudio concluye que la presencia de esteatosis macro- o microvesicular no compromete la supervivencia de los pacientes transplantados (*Afonso y cols. 2004*) (Figura 18).

En la práctica clínica se ha establecido el siguiente protocolo de actuación ante el trasplante de un hígado graso:

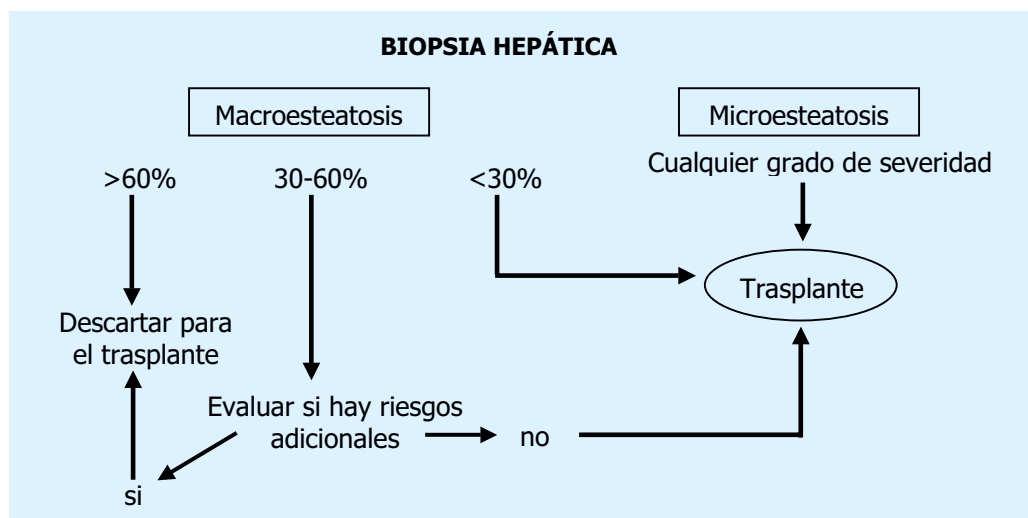


Figura 18. Uso racional de los hígados esteatósicos.

La evaluación de los hígados donantes es una de las tareas más difíciles durante un trasplante hepático (*Nomura y cols. 2004*). Existen datos muy variables en cuanto a la prevalencia de hígados esteatósicos entre los potenciales donantes (desde un 9-26%), esta variabilidad es debida a las diferentes técnicas utilizadas para su cuantificación (*Brandhagen y cols. 2003; Burke y cols. 2004*). Aunque la identificación de la infiltración grasa severa se realiza fácilmente por el cirujano que lleva a cabo la extracción ya que son hígados más duros al tacto, de coloración amarillenta y de borde romo; la identificación de la infiltración moderada y leve entraña más dificultades (*García Ureña y cols. 1998; Imber y cols. 2002*); de esta forma puede que el órgano

provenga de un donante considerado óptimo y desarrollar FPI tras el trasplante. Por esta razón es necesario recurrir a la realización de biopsias para evaluar el estado del hígado, principalmente en relación a la presencia de infiltración grasa que presenta el injerto. No obstante, las técnicas actuales para evaluar la infiltración grasa pueden infravalorar la cantidad de grasa que existe realmente en el tejido hepático y ésta podría ser la causa de que se puedan considerar como normales hígados con esteatosis moderada y que sufran disfunción tras el trasplante (*Ureña y cols. 1998*).

Una de las cuestiones por resolver sería por qué un hígado graso con aparentemente una función normal en el potencial donante no es capaz de realizar estas mismas funciones cuando es trasplantado en el receptor. Se sabe que los hígados esteatósicos son más susceptibles al daño producido por la I/R (*D'Alessandro y cols. 1991; Ploeg y cols. 1993; Hayashi y cols. 1999; Yang SQ. 1997 y 2001; Selzner M. y cols. 2000 y 2001*), pero los mecanismos responsables del desarrollo de la disfunción primaria tras su trasplante son todavía inciertos.

5. LESIÓN DE I/R ASOCIADA AL TRASPLANTE DE HÍGADOS GRASOS

Diversos autores afirman que los hígados esteatósicos son mucho más susceptibles a la lesión de I/R asociada al trasplante hepático que los hígados no grasos (*D'Alessandro y cols. 1991; Ploeg y cols. 1993; Hayashi y cols. 1999; Yang SQ. y cols. 1997 y 2001; Selzner M. y cols. 2000 y 2001*), y que por ello presentan un mayor riesgo de sufrir FPI tras ser trasplantados. Sin embargo, las causas de la mayor susceptibilidad de este tipo de hígados a la lesión de I/R no están totalmente definidas. Diversos autores sugieren que algunos de los siguientes mecanismos de lesión podrían contribuir a la menor tolerancia de los hígados grasos al proceso de I/R:

- alteraciones en la microcirculación hepática sinusoidal
- mayor lesión por estrés oxidativo y por tanto mayor grado de peroxidación lipídica
- aumento en la infiltración de neutrófilos en el tejido hepático
- aumento de la activación de células de kupffer y de la liberación de sustancias proinflamatorias tales como el TNF- α
- alteraciones en las funciones mitocondriales hepáticas y por tanto un mayor deterioro del metabolismo energético

5.1 Alteraciones de la microcirculación

Las alteraciones a nivel de la microcirculación sinusoidal hepática que presentan los órganos esteatósicos son consideradas por diversos autores como uno de los factores principales de la menor tolerancia de los hígados grasos a la I/R hepática (*Behrms y cols. 1998; Caraceni y cols. 1999*).

En los hígados grasos la acumulación de grasa en el citoplasma de los hepatocitos está asociada a un aumento del volumen celular de los mismos. Diversos autores defienden que el aumento del volumen celular puede producir la compresión y distorsión de la luz sinusoidal y puede derivar en la obstrucción parcial o total de la luz del sinusoides hepático, causando un aumento de la resistencia intraportal hepática y una disminución del flujo sanguíneo que reciben los hepatocitos con infiltración grasa (*Teramoto y cols. 1993b; Hui y cols. 1994; Hakamada y cols. 1997; Ricci y cols. 1997*). En clínica y en experimentación animal se ha observado que los hígados esteatósicos presentan un flujo sanguíneo disminuido –en aproximadamente un 50%– con respecto al flujo sanguíneo de los hígados no grasos, lo que podría inducir un estado de hipoxia crónica en los mismos (*Teramoto y cols. 1993b y 1994; Hakamada y cols. 1997; Seifalian y cols. 1997; 1998 y 1999*); y se cree que la disminución del flujo podría ser debida al aumento de volumen celular de los hepatocitos y al estrechamiento de la luz sinusoidal. Diversos autores sugieren que estas alteraciones en la microcirculación sinusoidal de los hígados grasos podrían amplificar los efectos negativos producidos por la I/R agravando de este modo la lesión que

sufren este tipo de hígados tras la misma (Hui y cols. 1994; Seifalian y cols. 1999; Ijaz y cols. 2003). De esta forma, en el proceso de I/R el deterioro del endotelio sinusoidal y la liberación de glóbulos de grasa a la luz sinusoidal durante la preservación del órgano, así como la formación de pequeños trombos de fibrina y elementos celulares en la sangre, y la adhesión de neutrófilos y plaquetas al endotelio sinusoidal durante la reperfusión, en combinación con la reducción del espacio sinusoidal que presentan los hígados grasos puede contribuir a la mayor susceptibilidad que presentan los hígados grasos a la lesión de I/R (Hayashi y cols. 1993; Teramoto y cols. 1993b; Lemasters y cols. 1994; Risby y cols. 1994; Letteron y cols. 1996; Fukumori y cols. 1999).

5.2 Peroxidación lipídica

Numerosos estudios muestran que durante la reperfusión hepática hay una mayor cantidad de RLO en un hígado graso que en un hígado no graso (Koneru y cols. 1995; Letteron y cols. 1996; Nakano y cols. 1997; Zhong y cols. 1997; Vendemiale y cols. 2001; Serafin y cols. 2002). La causa de este aumento podría deberse a que: (a) existe una mayor producción de RLO tras la I/R en un hígado graso que en un hígado no graso (Koneru y cols. 1995; Letteron y cols. 1996; Reddy MC. y cols. 1996; Leclercq y cols. 2000; Vendemiale y cols. 2001; Nardo y cols. 2001); (b) a la menor presencia de antioxidantes que contrarresten los efectos nocivos de los RLO (Dikdan y cols. 2004); (c) o a la combinación de ambos mecanismos (Soltys y cols. 2001; Caraceni y cols. 2005).

Estudios llevados a cabo en diferentes modelos de hígado graso, tanto en isquemia normotérmica como en trasplante hepático, muestran que los RLO tienen un papel fundamental en la mayor susceptibilidad de los mismos frente a un proceso de I/R (Nakano y cols. 1997; Zhong y cols. 1997; Day y cols. 1998a y 1998b; Taneja y cols. 1998; Laight y cols. 1999; Soltys y cols. 2001). En trabajos llevados a cabo en modelos de isquemia normotérmica en ratas de la cepa Zucker se ha observado que los hígados grasos tienen una menor tolerancia ante el estrés oxidativo que los hígados no grasos debido a que presentan una actividad catalasa disminuida y a que sufren tras la isquemia una depleción en los niveles de glutatión mucho más pronunciada que los hígados no grasos (Hayashi y cols. 1993; Hui y cols. 1994; Koneru y cols. 1995; Reddy MC. y cols. 1996; Soltys y cols. 2001). La administración de precursores del glutatión o de sustancias antioxidantes –tales como el tocoferol- disminuye la lesión hepática asociada a la I/R, preserva en mayor medida la integridad de los hepatocitos en el hígado graso (Nakano y cols. 1998), y aumenta la supervivencia en este tipo de ratas ante un proceso de I/R hepática (Soltys y cols. 2001). El aumento de la supervivencia de los hígados grasos observado en estos trabajos es mayor cuando los enzimas antioxidantes administrados están disponibles intracelularmente que cuando son administrados a la circulación, lo que sugiere que el estrés oxidativo es principalmente intracelular (Amersi y cols. 1999; Lehman y cols. 2000).

Diversos estudios en modelos experimentales de trasplante de hígado graso inducido mediante la ingesta de alcohol, relacionan el aumento en la producción de RLO con el desarrollo de FPI

tras el trasplante (*Zhong y cols. 1997; Day y cols. 1998b; Soltys y cols. 2001*), y muestran que la administración de alopurinol –un inhibidor de la XOD- disminuyó el estrés oxidativo asociado al trasplante hepático y de esta manera disminuyó también la lesión hepática asociada al mismo (*Zhong y cols. 1997*).

5.3 Acumulación de neutrófilos

El exceso de grasa en un hígado esteatósico produce alteraciones en la fluidez de las membranas debido a la menor presencia de colesterol y de ácidos grasos poliinsaturados en las mismas (*Fukumori y cols. 1999*). La alteración a nivel de las membranas del endotelio sinusoidal de los hígados grasos, junto con el mayor deterioro que sufren las células endoteliales tras la preservación fría en este tipo de hígados, podría derivar en un aumento de la adhesión y activación de los neutrófilos en la reperfusión, y por tanto en un aumento de la infiltración de neutrófilos en el tejido hepático (*Hui y cols. 1994; Nakano y cols. 1997; Fukumori y cols. 1999*).

Diversos estudios llevados a cabo en modelos de hígado graso inducido por alcohol implican a los neutrófilos en la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos frente a la lesión de I/R (*Nakano y cols. 1997; Stachlewitz y cols. 1998; Yamada y cols. 2000*); sin embargo, el papel de los neutrófilos en otros modelos de esteatosis hepática no parece ser determinante en la menor tolerancia que presentan los hígados grasos a la I/R (*Yamada y cols. 2000; Serafin y cols. 2002*), así lo demuestran trabajos llevados a cabo en modelos de isquemia normotérmica en ratas de la cepa Zucker y en modelos de hígado graso inducido por la ingesta de una dieta rica en colesterol en los que se observan niveles similares de acumulación de neutrófilos en el parénquima de hígados grasos y no grasos tras la I/R hepática (*Koneru y cols. 1995; Sun CK. y cols. 2001*).

Trabajos realizados recientemente en un modelo experimental de trasplante hepático en ratas Zucker han mostrado que el bloqueo integrinas y selectinas, moléculas implicadas en la adhesión de los neutrófilos al endotelio sinusoidal, redujo la lesión hepática y aumentó la supervivencia de las mismas tras el trasplante hepático (*Amersi y cols. 2002 y 2003; Fondevila y cols. 2004*).

5.4 Activación de las células de Kupffer

Diversos estudios muestran que tras la I/R existe un mayor número y una mayor actividad fagocítica de las células de Kupffer en los hígados grasos que en los que no presentan infiltración grasa (*Teramoto y cols. 1993a; Zhong y cols. 1997*), lo que podría explicar la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos a la lesión de I/R. Es bien conocido que las células de Kupffer producen sustancias capaces de modular el flujo sanguíneo sinusoidal y son una fuente muy importante de RLO y citoquinas como TNF- α e IL-1 β . Así lo demuestran los trabajos llevados a cabo en un modelo de hígado graso inducido por alcohol en el que se ha observado

tras la I/R una mayor producción de TNF- α e IL-1 β durante la etapa de reperfusión (Yamada y cols. 2000).

La inhibición de la actividad de las células de Kupffer con cloruro de gadolinio en modelos experimentales de isquemia normotérmica y trasplante hepático con injertos esteatósicos inducidos por alcohol redujo sustancialmente la lesión hepática asociada a la I/R y aumentó la supervivencia tras el trasplante (Zhong y cols. 1996; Yamada y cols. 2003).

5.5 Metabolismo energético

Diversos estudios muestran que tras varias horas de isquemia normotérmica o de preservación fría los hígados grasos presentan una depleción de los niveles de ATP mayor que la sufrida por los hígados no grasos (Fukumori y cols. 1997; Selzner N. y cols. 2003a); por el contrario, en otros estudios llevados a cabo en un modelo de isquemia normotérmica se observaron niveles semejantes de ATP entre ambos tipos de hígados antes y durante la isquemia, pero se observó que tras la reperfusión los hígados grasos presentaban una recuperación del metabolismo energético más lenta (Trevisani y cols. 1996). Parece que la esteatosis no afecta directamente al metabolismo energético de los hepatocitos durante la isquemia, pero reduce la capacidad de las mitocondrias de generar ATP al iniciarse la reperfusión tanto tras la isquemia normotérmica como tras la preservación fría (Hui y cols. 1994; Fromenty y cols. 1997a y 1997b; Fukumori y cols. 1997; Miki y cols. 1998; Chavin y cols. 1999; Cortez-Pinto y cols. 1999; Rashid y cols. 1999; Caraceni y cols. 2004). Diversos autores postulan que la presencia de grasa en el hepatocito produce diversas alteraciones a nivel de las mitocondrias que se hacen mucho más evidentes tras un proceso de I/R y que dan lugar a la sobreproducción de RLO y a un significativo deterioro del metabolismo energético hepático tras el trasplante (Hui y cols. 1994; Fukumori y cols. 1997; Miki y cols. 1998; Rashid y cols. 1999; Nardo y cols. 2000; Vendemiale y cols. 2001). Las alteraciones de las funciones específicas de la mitocondria pueden eventualmente limitar la resistencia y la supervivencia de las células y órganos dañados. De este modo, el daño mitocondrial que tiene lugar durante la reperfusión de los hígados grasos preservados podría ser uno de los mecanismos responsables de la menor tolerancia de este tipo de hígados a la lesión de I/R (Fukumori y cols. 1997; Minor y cols. 2000).

Además diversos autores postulan que la reducida capacidad de recuperación del metabolismo energético que presentan los hígados grasos tras la I/R hepática también determina el tipo de lesión que sufren tras la I/R. De este modo, mientras que en los hígados no grasos predomina la muerte celular por apoptosis en los hígados grasos predomina la necrosis (Selzner M. y cols. 2000 y 2001; Selzner N. y cols. 2003a; Jaeschke y cols. 2003b; Hong y cols. 2004); para estos autores ésta podría ser una de las principales causas de la mayor susceptibilidad de los hígados grasos a la I/R. El que se produzca un tipo de lesión u otra está asociado, entre otras cosas, con la disponibilidad de ATP de la célula, puesto que la apoptosis es un proceso ATP-dependiente. El

deterioro del metabolismo energético que presentan los hígados grasos tras la I/R hepática podría explicar el fallo de la apoptosis en este tipo de hígados y el predominio de la lesión por necrosis. La muerte celular por necrosis es producida por la rotura inespecífica de los orgánulos celulares y la membrana citoplasmática y conlleva la liberación del contenido citoplasmático que contribuye a agravar la lesión inflamatoria hepática, por lo que mientras que la apoptosis es una forma de muerte celular compatible con la viabilidad del injerto, la necrosis es poco tolerada (*Behrns y cols. 1998; Crowley y cols. 2000; Selzner M. y cols. 2001*).

El estudio de los mecanismos responsables de la mayor susceptibilidad de los hígados grasos a la lesión de I/R y de las posibles estrategias para disminuir la lesión que sufren estos órganos tras ser trasplantados puede ser de interés en la práctica clínica ya que podría derivar en la disminución del riesgo de disfunción asociado al trasplante de este tipo de hígados, y por tanto en el aumento de su utilización aumentando de ese modo el número de órganos válidos para ser trasplantados.

6. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA DISMINUIR LA LESIÓN DE I/R

Una de las primeras estrategias aplicadas para reducir la lesión de I/R fue la reducción de la actividad metabólica por enfriamiento del órgano a 2-4°C (*Belzer y cols. 1988*). Mediante esta estrategia se puede preservar el hígado para el trasplante durante unas 8 h, mientras que los órganos conservados a temperatura ambiente toleran alrededor de 1 h antes de la reperfusión. El enfriamiento implica la utilización de soluciones de preservación, por lo que muchas estrategias se han encaminado a mejorar las soluciones de preservación para extender el periodo de preservación y para reducir los efectos negativos de la hipotermia sobre el órgano. A lo largo de los años han ido apareciendo diferentes soluciones (*Euro-Collins, Carolina, UW*) con la finalidad de mantener al injerto en condiciones óptimas durante la isquemia fría. La más utilizada en la clínica es la solución de la UW. A diferencia de las restantes, esta solución no contiene glucosa -lo que evita la producción de lactato y los problemas de acidosis-, en cambio contiene adenosina -que inhibe la agregación plaquetaria, la acumulación de neutrófilos, y es un sustrato para la síntesis de ATP-, y contiene antioxidantes como GSH y alopurinol para evitar los efectos nocivos de los RLO. La introducción de la solución de la UW supuso un avance importante en la preservación de órganos y con su utilización se alcanzaron periodos de preservación de los órganos más largos, sin embargo presenta algunas limitaciones. Una de estas limitaciones es la presencia de hidroxietilamidón, proagregante de glóbulos rojos que puede producir un lavado incompleto del injerto hepático con el consiguiente éstasis venoso y respuesta inflamatoria. Además algunas de las sustancias que se encuentran en la solución de la UW (*alopurinol, lactobionato*) no protegen bien por no estar en concentraciones adecuadas o por tener dificultades para llegar al lugar de acción (*Southard y cols. 1990 y 1995; Sumimoto y cols. 1990; Porte y cols. 1998; Mühlbacher y cols. 1999; Lutterová y cols. 2001; Bessens y cols. 2004; Pedotti y cols. 2004*). Probablemente ni la concentración de las sustancias que componen las soluciones de preservación, ni la formulación utilizada siguen sin ser las más adecuadas para prevenir la aparición y desarrollo de la lesión de I/R asociada al trasplante hepático; ya que diferentes estudios han demostrado que la eliminación de algunos de los componentes de las soluciones de preservación no modifica la viabilidad del órgano ni tampoco el índice de complicaciones postrasplante (*Southard y cols. 1990; Sumimoto y cols. 1990; Cofer y cols. 1992; Garcia-Valdecasas y cols. 1992; Spiegel y cols. 1998; Cohen y cols. 2000*).

Además se han desarrollado otro tipo de estrategias encaminadas a minimizar esta lesión entre las que se incluyen intervenciones quirúrgicas, el uso de agentes farmacológicos y la terapia génica. Algunas de ellas son preventivas, induciendo una mayor tolerancia del tejido a la I/R, y son englobadas bajo el término precondicionamiento; mientras que otras interfieren directamente en alguna de las vías responsables de la lesión de I/R inhibiendo alguna de las moléculas implicadas o potenciando una posible vía protectora.

Estrategias quirúrgicas. Diversas estrategias quirúrgicas han demostrado ser protectoras frente a la lesión de I/R hepática en modelos de experimentación animal, tales como el preconditionamiento por hipertermia (*Terajima y cols. 2000; Matsumoto y cols. 2001; Yonezawa y cols. 2001*), el shunt portosistémico (*Marzi y cols. 1991; Sankary y cols. 1999; Fernández y cols. 2003*), el clampaje intermitente (*Rudiger y cols. 2002b*) o el preconditionamiento (PC) isquémico (*Yin y cols. 1998; Yoshizumi y cols. 1998; Peralta y cols. 1999b; Arai y cols. 2000 y 2001; Carini y cols. 2000; Nilsson y cols. 2000*). Éstas dos últimas estrategias además se han aplicado en la práctica clínica en pacientes sometidos a hepatectomías, donde se han puesto de manifiesto sus efectos beneficiosos (*Belghiti y cols. 1999; Clavien y cols. 2000*), pero los mecanismos responsables de sus efectos protectores todavía no se conocen con exactitud. Estudios llevados a cabo en modelos animales de I/R hepática donde se comparan ambas técnicas quirúrgicas han demostrado que la aplicación del PC isquémico tuvo mayores efectos beneficiosos (*Rudiger y cols. 2002b; Fernández y cols. 2003*).

Agentes farmacológicos. Se conocen un gran número de agentes farmacológicos que muestran un efecto protector sobre la lesión de I/R hepática al inhibir los efectos nocivos de la isquemia o la respuesta inflamatoria asociada a la reperfusión. Con esta finalidad, se han administrado agentes como la clorpromazina o el ATP-MgCl₂ para prevenir las disfunciones mitocondriales (*Mitnacht y cols. 1979; Jeong y cols. 2000*); cloroquina para prevenir la degradación de fosfolípidos durante la isquemia hepática (*Wang D. y cols. 1999*); antioxidantes tales como tocoferol, N-acetilcisteína, GSH-éster, o alopurinol para inhibir las acciones de los RLO durante la reperfusión (*Koeppel y cols. 1996; Grattagliano y cols. 1999; Soltys y cols. 2001; Fernández y cols. 2002; Gondolesi y cols. 2002; Peralta y cols. 2002; Schauer y cols. 2004*); anticuerpos anti-TNF- α para bloquear las acciones nocivas de esta citoquina (*Colletti y cols. 1990a y 1998*); y fármacos como dopamina, adenosina, donadores de NO, L-arginina, y anticuerpos anti-molécula de adhesión intracelular (ICAM)-1 y anti-P-selectina para reducir la acumulación de neutrófilos en el parénquima hepático durante la reperfusión (*Suzuki y cols. 1994c; Toledo-Pereyra y cols. 1994; Kobayashi y cols. 1995; Jones y cols. 1996; Calabrese y cols. 1997; Koeppel y cols. 1997; Kuzume y cols. 1997; Langle y cols. 1997; Marubayashi y cols. 1997; Ohmori y cols. 1998; Uhlmann y cols. 1998; Cottart y cols. 1999; Shimamura y cols. 1999; Geller y cols. 2001; Peralta y cols. 2001; Rivera-Chavez y cols. 2001; Yagnik y cols. 2002; van der Woude y cols. 2004*). Sin embargo, ninguno de estos tratamientos ha logrado frenar la lesión de I/R hepática. Hay que tener en cuenta las dificultades de frenar la inflamación asociada a este proceso, debido entre otros factores a los múltiples mediadores y tipos celulares implicados en esta respuesta inflamatoria. Además, hay que considerar las dificultades derivadas del tratamiento farmacológico. Así por ejemplo, la administración de anticuerpos anti-TNF- α provoca sólo una inactivación parcial de la proteína, el GSH-éster no llega al lugar de acción a concentraciones óptimas ni en el momento adecuado, pequeñas variaciones en la dosis de donadores de NO tienen efectos totalmente opuestos, etc. Además, no hay que descartar los posibles efectos secundarios derivados de los fármacos, ya que en el

caso de la dopamina, adenosina y donadores de NO se han descrito efectos nocivos sistémicos. Y si esto ocurre en hígados sanos, aún son mayores los problemas para modular la lesión de I/R en hígados esteatósicos. Este tipo de hígados generan RLO que son insensibles a la acción de antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa (Gao y cols. 1995). La diferencia en los mecanismos de acción entre hígados sanos y esteatósicos supone que tratamientos efectivos en hígados sanos pueden no serlo en presencia de esteatosis y además la dosis de fármaco a administrar puede ser diferente en ambos tipos de hígados, como ha sucedido con algunos inhibidores de la apoptosis (Selzner M. y cols. 2000) e interleuquinas (Serafín y cols. 2004). Hallazgos como este deben tenerse en cuenta, ya que la aplicación por igual de estrategias farmacológicas en I/R en hígados sanos y esteatósicos puede dar lugar a efectos muy diferentes en cada caso.

A excepción de los antioxidantes que han sido introducidos en algunas soluciones de preservación, ninguna de estas estrategias se utiliza en la práctica clínica.

Terapia génica. Los recientes avances en la manipulación del genoma proveen de nuevas herramientas para reducir o suprimir la lesión de I/R hepática mediante la terapia génica. Su utilización de momento se limita a modelos experimentales animales en los que parece una estrategia alternativa válida para inducir protección (Zwacka y cols. 1998; Wheeler y cols. 2001; Coito y cols. 2002). Pretratamientos con superóxido dismutasa y catalasa utilizando como vehículo adenovirus, liposomas o polientilenglicol para reducir la lesión por estrés oxidativo asociada a la I/R hepática (Yabe y cols. 1999 y 2001; Wheeler y cols. 2001; Lehmann y cols. 2003); y la sobreexpresión del gen Bcl-2 para inhibir la apoptosis, utilizando principalmente como vehículo adenovirus (Bilbao y cols. 1999; Selzner M. y cols. 2002), han resultado protectores frente a la lesión de I/R hepática. Sin embargo, la utilización de la terapia génica presenta algunos problemas tales como la toxicidad de vectores o la dificultad de conseguir una expresión óptima de la proteína en el momento y lugar adecuado. Todo esto aleja la posible utilización de la terapia génica en el trasplante de hígado, pues todavía queda mucho por investigar al respecto.

Ninguna de la estrategias desarrolladas ha resultado ser totalmente eficaz en la prevención de la lesión de I/R asociada al trasplante hepático a día de hoy, así como de la lesión pulmonar asociada al mismo. Los últimos trabajos sobre PC isquémico han demostrado que es una estrategia eficaz frente a la lesión de I/R hepática en distintos modelos animales y recientemente en humanos sometidos a hepatectomías, pero siguen sin conocerse totalmente los mecanismos por los que ejerce dichos efectos protectores. La comprensión de los mecanismos responsables del PC isquémico es de interés por su posible aplicación en el campo del trasplante hepático como estrategia para prevenir de forma eficaz la lesión de I/R hepática y la lesión pulmonar asociada al trasplante hepático, y de este modo reducir el número de retrasplantes y aumentar la utilización de los órganos marginales aumentando así la disponibilidad de órganos para ser trasplantados.

6.1 Precondicionamiento isquémico

El PC isquémico es una estrategia quirúrgica que protege a los tejidos frente a la lesión de I/R. Consiste en la aplicación de breves periodos de isquemia-reperfusión antes de que el órgano sea sometido a una I/R prolongada (Figura 19).



Figura 19. Esquema de la aplicación del PC isquémico.

Este fenómeno fue descrito por primera vez en corazón en 1986 por Murry y cols., y en trabajos posteriores se ha demostrado que es un mecanismo capaz de proteger frente a la lesión de I/R en otros órganos, como cerebro, músculo esquelético, médula espinal, retina, intestino, pulmón, riñón e hígado (*Glazier y cols. 1994; Pang y cols. 1995; Hotter y cols. 1996; Peralta y cols. 1996; Du y cols. 1996; Matsuyama y cols. 1997; Turman y cols. 1997; Roth y cols. 1998*). La aplicación del PC isquémico difiere entre los distintos órganos, de modo que en cada órgano el efecto protector se consigue tras la aplicación de diferentes ciclos de isquemia-reperfusión, así como también difieren los tiempos de isquemia y de reperusión empleados para realizar el PC isquémico en los distintos órganos y en los distintos modelos experimentales. De este modo, mientras que en el corazón se aplican varios ciclos de isquemia-reperfusión, el efecto protector del PC isquémico en el hígado se consigue mediante la aplicación de un único ciclo de isquemia-reperfusión. La aplicación de varios episodios de PC isquémico no incrementa la magnitud de la protección (*Hoshida y cols. 2002*).

El PC isquémico ofrece dos tipos de protección, que difieren en el tiempo al que tienen lugar y en los mecanismos responsables de la protección. Por esta razón, distinguimos entre fase inicial y tardía (Figura 20). La fase inicial del PC isquémico tiene lugar min después de la reperusión y se prolonga 2-3 h. Los efectos beneficiosos de esta fase del PC isquémico son independientes de la síntesis de nuevas proteínas y son mucho más potentes que los de la fase tardía. Mientras que la fase tardía del PC isquémico comienza tras 12-24 h del inicio de la reperusión, se prolonga 2-3 días y sus efectos beneficiosos son dependientes de la modulación de la expresión de genes y la síntesis de nuevas proteínas (*Bolli 2000; Pasupathy y cols. 2005*).

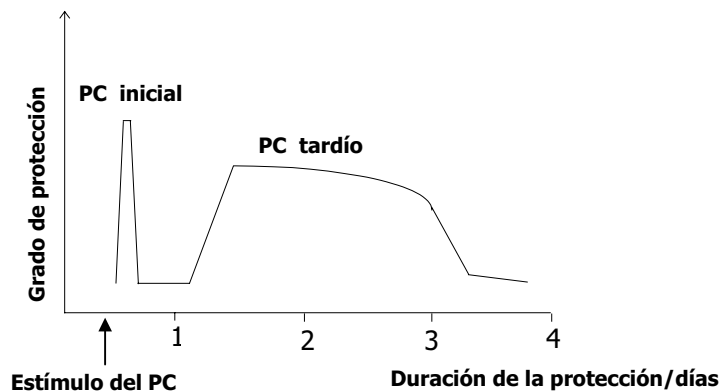


Figura 20. Protección bifásica inducida por el PC isquémico.

Pese a que existen diferentes hipótesis, los mecanismos moleculares responsables de la protección del PC isquémico frente a la lesión de I/R no se conocen con exactitud. Se han propuesto algunos de los posibles mediadores, que actuando a nivel de receptores celulares desencadenarían los diferentes efectos protectores del PC isquémico (Cutrin y cols. 2002).

6.1.1 Mecanismos moleculares del PC isquémico

Papel de la adenosina y el NO

Diversos estudios indican que en respuesta al PC isquémico, la adenosina y el NO liberados por el hígado son capaces de activar los mecanismos protectores tanto en condiciones normotérmicas así como en la isquemia fría asociada al trasplante hepático (Peralta y cols. 1997; 1998 y 1999a; Yin y cols. 1998; Arai y cols. 2000). De modo que la ventana de tiempo óptima que induce los efectos protectores del PC isquémico en el hígado viene determinada por dos factores: una concentración de adenosina lo suficientemente elevada como para inducir la generación de NO a través de la activación de los receptores de adenosina A₂, junto con una baja concentración de xantina que evite los efectos perjudiciales de la misma (Peralta y cols. 1998).

El papel de los receptores de adenosina A₂ en el efecto protector del PC isquémico ha sido demostrada mediante la administración de agonistas y antagonistas de los mismos, de modo que los agonistas reprodujeron los efectos beneficiosos del PC isquémico mientras que los antagonistas los suprimieron (Peralta y cols. 1999a).

Los efectos beneficiosos de la adenosina en el PC isquémico se considera que son debidos, en su mayor parte, a la actividad del NO. El NO inhibe la adhesión de los neutrófilos al endotelio sinusoidal al inhibir la presencia de moléculas de adhesión en el mismo, inhibe el efecto vasoconstrictor de las endotelinas y actúa como secuestrador de RLO tales como el superóxido (Pabla y cols. 1996; Peralta y cols. 1996; Koepfel y cols. 1997; Naito y cols. 1998; Gong y cols. 2004).

Diversos estudios han demostrado la implicación del NO en el PC isquémico mediante la administración de inhibidores de su síntesis y de donadores de NO, que anularon y simularon respectivamente los efectos beneficiosos del PC isquémico en modelos animales de I/R normotérmica y trasplante hepático (Wang Y. y cols. 1995; Jones y cols. 1996; Calabrese y cols. 1997; Koepfel y cols. 1997; Langle y cols. 1997; Liu y cols. 1998b; Ohmori y cols. 1998; Uhlmann y cols. 1998; Peralta y cols. 1997; 1999b y 2001a; Cottart y cols. 1999; Shimamura y cols. 1999; Geller y cols. 2001; Rivera-Chavez y cols. 2001; Yagnik y cols. 2002). Por otro lado, diversos trabajos muestran que es la forma constitutiva endotelial de la NOS la responsable de la formación del NO en la fase inicial del PC isquémico, puesto que tiene lugar su activación pocos min después de la inducción del PC isquémico; mientras que la forma inducible sería la fuente de NO en la fase tardía del PC isquémico (Peralta y cols. 1996; Takano y cols. 1998; Serracino-Inglot y cols. 2003; Koti y cols. 2005a).

Vías de señalización molecular

A parte de los mediadores extracelulares ya citados, diversos estudios de I/R hepática muestran que en los efectos protectores del PC isquémico también intervienen mensajeros intracelulares tales como la proteinquinasa C (PKC), la proteinquinasa AMP-dependiente (AMPK), la p38 MAPK, otras proteinquinasas, y diversos traductores de señales y factores de transcripción, activados tras la liberación de la adenosina (Ricciardi y cols. 2001a; 2001b y 2002; Carini y cols. 2001a; 2001b y 2003; Peralta C. 2001b; Teoh y cols. 2002) (Figura 21). De este modo, pocos segundos después del inicio de la fase de isquemia del PC isquémico, la adenosina, producto de degradación del ATP, es liberada en grandes cantidades al espacio extracelular y produce la activación de los receptores de adenosina A2 acoplados a proteína G (Nakayama y cols. 1999; Peralta y cols. 1999a). Éstos, a su vez producen la activación de una fosfolipasa de membrana (fosfolipasa C ó D), que genera: inositol trifosfato, el cual induce la liberación de calcio desde las reservas intracelulares no mitocondriales; y diacilglicerol (DAG) que activa la PKC (Speechly y cols. 1994; Ishida y cols. 1997; Ricciardi y cols. 2001a). Se sabe que la PKC tiene un papel muy importante en la protección celular, y regula algunos procesos biológicos tales como el metabolismo, el transporte de iones y la expresión de genes. Diversos estudios muestran que es responsable de algunos de los efectos beneficiosos del PC isquémico en el hígado (Carini y cols. 2001a y 2003; Ricciardi y cols. 2001a). La activación de la PKC produce la fosforilación de distintas moléculas efectoras tales como tirosinquininasas (Ricciardi y cols. 2001b) y MAPK - incluyendo la MAPK p38- (Carini y cols. 2001b), lo que conlleva un aumento de la tolerancia de los hepatocitos y de las células endoteliales frente al daño por I/R y la entrada de estas células en el ciclo celular, promoviendo la regeneración hepática (Teoh y cols. 2002).

La activación de la PKC puede inducir también la activación de diversos factores de transcripción, como NF- κ B, principales responsables de los efectos protectores de la fase tardía del PC isquémico (Funaki y cols. 2002; Ricciardi y cols. 2002). Estos factores de transcripción

modulan la expresión de determinados genes y dan lugar a la síntesis de proteínas como la SOD o las proteínas de shock térmico (HSP) que se han propuesto como efectoras del efecto protector del PC isquémico. En el hígado el PC isquémico se asocia a la síntesis de varias formas inducibles de HSP: la HSP70, HSP72 y HSP73 y de la hemooxigenasa (HO-1/HSP32) (Kume y cols. 1996; Redaelli y cols. 2002). La inducción de las HSP reduce la unión nuclear de factores de transcripción proinflamatorios y aumenta la capacidad antioxidante de las células (Bauer y cols. 2002; Uchinami y cols. 2002). Ambos efectos pueden contribuir a la disminución de la formación de TNF- α y a la atenuación de la respuesta inflamatoria en los hígados preconditionados (Arai y cols. 2001; Yonezawa y cols. 2001). También se ha sugerido que el PC isquémico puede disminuir la transcripción de genes como c-fos y c-jun, implicados en el desarrollo de la lesión de I/R hepática, y que la activación de NF- κ B podría inducir la activación del traductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT-3), implicado en la hepatoprotección y en la proliferación celular (Kume y cols. 1996; Schlossberg y cols. 1996; Carini y cols. 2001a; 2001b y 2003; Ishii y cols. 2001; Saito y cols. 2001; Teoh y cols. 2002; Sindram y cols. 2002; Xiao y cols. 2005).

El papel de NF- κ B en los efectos del PC isquémico no está totalmente esclarecido, puesto que por un lado hay trabajos en los que se ha demostrado que durante el PC isquémico se inhibe la activación de NF- κ B, y que su inhibición es responsable de algunos de los efectos beneficiosos del PC isquémico (Funaki y cols. 2002); mientras que diversos autores defienden que la activación de NF- κ B contribuye a los efectos beneficiosos del PC isquémico (Ricciardi y cols. 2002; Teoh y cols. 2002).

Además de todas estas vías de señalización celular implicadas en el PC isquémico, trabajos recientes indican que el PC isquémico puede inducir la liberación de una pequeña cantidad de RLO (Peralta y cols. 2002; Sindram y cols. 2002) y de TNF- α (Teoh y cols. 2003a), los cuales contribuyen al efecto protector del PC isquémico.

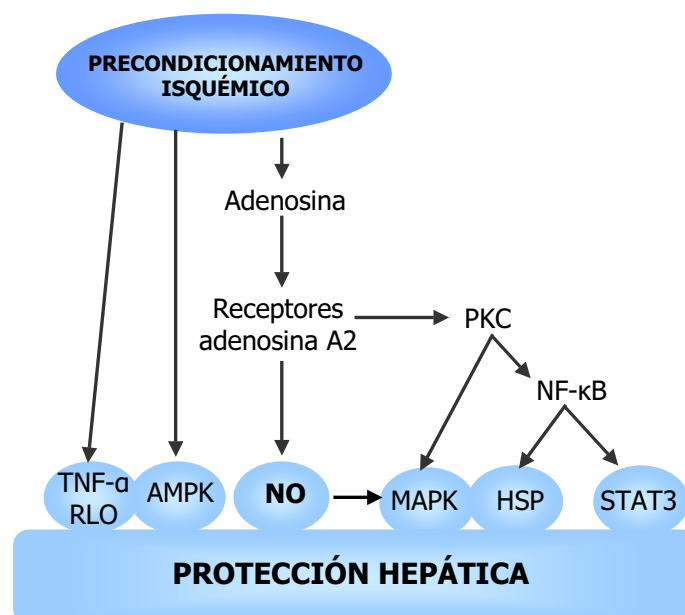


Figura 21. Vías de señalización del PC isquémico.

6.1.2 Efectos del PC isquémico sobre los mecanismos de lesión de la I/R hepática

Los efectos protectores del PC isquémico se han puesto de manifiesto en distintos modelos animales de I/R hepática (*Yin y cols. 1998; Yoshizumi y cols. 1998; Peralta y cols. 1999b; Arai y cols. 2000 y 2001; Carini y cols. 2000; Nilsson y cols. 2000*) y recientemente en humanos sometidos a hepatectomías (*Clavien y cols. 2000*). El efecto protector del PC isquémico en la I/R hepática no se limita tan solo al hígado, sino que también protege a otros órganos frente a la lesión asociada al proceso de I/R, en especial al pulmón (*Peralta y cols. 1999b; 2001c y 2002*).

Entre los mecanismos potencialmente implicados en los efectos protectores del PC isquémico se han descrito los siguientes (*Yin y cols. 1998; Peralta y cols. 1999b; 2001c y 2002; Selzner N. y cols. 2003b*):

- Preservación del endotelio sinusoidal y del parénquima hepático
- Preservación de los niveles de ATP
- Reducción de la activación de neutrófilos y células de Kupffer, y de la producción de citoquinas
- Inhibición del fenómeno de "no-reflujo"
- Reducción de la producción de RLO y de la depleción de antioxidantes
- Reducción de la muerte celular por apoptosis y necrosis

Metabolismo energético

Se ha descrito que el PC isquémico es capaz de preservar los niveles de ATP tras la I/R hepática y que este efecto sobre el metabolismo energético contribuye al efecto protector del PC isquémico (*Nakayama y cols. 1999; Peralta y cols. 2000 y 2001b; Compagnon y cols. 2002 y 2005*). Los mecanismos por los que el PC isquémico es capaz de prevenir la depleción de los niveles de ATP no están totalmente definidos, pero en distintos modelos de I/R hepática así como en humanos, se ha visto que este efecto podría ser debido a una disminución de la utilización de ATP (*Peralta y cols. 2000; Clavien y cols. 2003; Selzner N. y cols. 2003a*).

Se cree que la AMPK podría estar implicada en los efectos del PC isquémico sobre el metabolismo energético (Figura 22). La AMPK es un enzima que se activa en situaciones de déficit energético celular y que activa distintas vías para promover su recuperación. Es activada por el AMP, producto de degradación del ATP. La degradación del ATP durante la fase de isquemia del PC isquémico daría lugar a la acumulación de AMP, activador alostérico de la AMPK que además produce su activación por fosforilación del residuo Thr172 a través de la quinasa AMPKK (*Peralta y cols. 2000; Hardie 2003*). Una vez activada la AMPK produce la fosforilación de numerosos sustratos que mantienen los niveles celulares de ATP, reduciendo la glucólisis y por tanto el acúmulo de lactato en los hepatocitos durante la isquemia prolongada (*Vincent y cols.*

1992). La administración de inhibidores o activadores de la AMPK en animales sometidos a I/R normotérmica con o sin PC isquémico, respectivamente, confirmó este hecho (*Peralta y cols. 2000 y 2001b*).

No se conoce con exactitud la implicación del NO en el efecto del PC isquémico sobre metabolismo energético tras la I/R hepática, en estudios de isquemia normotérmica hepática el óxido nítrico no parece tener ninguna implicación (*Peralta y cols. 2001*). Por otro lado diversos trabajos apuntan a una posible la relación entre AMPK y NO (*Chen ZP. y cols. 1999; Fryer y cols. 2000; Almeida y cols. 2004*).

Neutrófilos y alteraciones en la microcirculación

Se ha descrito que parte del efecto protector del PC isquémico está relacionado con la modulación de la acumulación de neutrófilos y de las alteraciones de la microcirculación sinusoidal tras la I/R hepática (*Howell y cols. 2000; Koti y cols. 2002*) (Figura 22).

El mecanismo por el cual el PC isquémico actúa modulando la acumulación de neutrófilos en el tejido hepático no se conoce actualmente. Algunos autores defienden este efecto protector podría ser debido a que el PC isquémico reduce la expresión de moléculas de adhesión intercelular tras la I/R hepática (*Sawaya y cols. 1999; Shinoda y cols. 2002*). Otra posible hipótesis es que los efectos beneficiosos del PC isquémico en la preservación del endotelio sinusoidal contribuyan a reducir la acumulación de neutrófilos en la luz del sinusoides hepático (*Sawaya y cols. 1999; Zapletal y cols. 1999; Ricciardi y cols. 2001b; Iwasaki y cols. 2002; Jaeschke 2003a*).

En modelos de isquemia normotérmica hepática y trasplante hepático, los hígados sometidos a PC isquémico muestran una mejora en el flujo sanguíneo hepático y una reducción de la resistencia vascular tras la I/R hepática. Diversos estudios sugieren que el NO generado en el PC isquémico, con efectos vasodilatadores, contrarresta los efectos de vasoconstrictores peptídicos, tales como las endotelinas, y contribuye de este modo a mejorar los desórdenes microcirculatorios asociados a la I/R hepática (*Peralta y cols. 1996; Koti y cols. 2002*).

Estrés oxidativo

Se ha demostrado que el PC isquémico es capaz de disminuir el estrés oxidativo asociado a un proceso de I/R hepática. Algunos autores apuntan a que la preservación de la estructura mitocondrial o la modulación de la activación de las células de Kupffer ejercida por el PC isquémico podrían atenuar la producción de RLO aumentando de este modo la tolerancia del hígado frente a la lesión de I/R (*Arai y cols. 1999; Peralta y cols. 2001c; Cavalieri y cols. 2002 y 2003; Glanemann y cols. 2003*). Mientras que otros autores sugieren que el PC isquémico modula tanto los sistemas de defensa frente al estrés oxidativo como los sistemas generadores de RLO que se ven alterados durante un proceso de I/R hepática normotérmica. De este modo, el PC

isquémico preserva los niveles citoplasmáticos de GSH durante el proceso de isquemia y también durante la reperfusión (*Peralta y cols. 2002; Yuan y cols. 2005*); y reduce la acumulación de xantina y la conversión de XDH en XOD que tienen lugar en el periodo de isquemia atenuando de ese modo el estrés oxidativo durante la reperfusión (*Fernández y cols. 2002; Peralta y cols. 2002; Yuan y cols. 2005*). Estos efectos del PC isquémico sobre el sistema XDH/XOD se relacionan con la disminución de la lesión hepática y pulmonar asociada al trasplante hepático. Los resultados obtenidos tras la administración de alopurinol –un inhibidor de la XOD- a animales sometidos a I/R o de xantina/XOD a animales en los que previamente se había inducido PC isquémico confirman estas observaciones (*Peralta y cols. 2002*) (Figura 22).

Apoptosis y necrosis

El PC isquémico reduce la muerte celular por apoptosis tras la I/R hepática disminuyendo los niveles de TNF- α y modulando la vía de las caspasas (*Yadav y cols. 1999; Clavien y cols. 2000; Cavalieri y cols. 2002; Zhang S.J. y cols. 2004*), así como también reduce el número y la extensión de las áreas de necrosis en el tejido hepático consecuencia del proceso de I/R (*Fernández y cols. 2002; Cavalieri y cols. 2002*).

6.1.3 Efectos del PC isquémico sobre la lesión pulmonar asociada a la I/R hepática

Los efectos beneficiosos del PC isquémico tras la I/R hepática también se han puesto de manifiesto en órganos remotos, particularmente en el pulmón, donde se ha observado que reduce la lesión derivada de la I/R hepática (*Peralta y cols. 1999b; 2001c y 2002; Fernández y cols. 2002*).

Se ha demostrado en modelos de isquemia normotérmica que en los hígados precondicionados se reduce de forma significativa la producción de TNF- α por las células de Kupffer y la conversión de XDH a XOD (*Peralta y cols. 1999b; 2001c y 2002; Jaeschke 2003a; Teoh y cols. 2003b*). En órganos remotos tales como el pulmón, esto conlleva la reducción de la expresión de P-selectina y la disminución de la adhesión e infiltración de neutrófilos (*Peralta y cols. 2001c; Pasupathy y cols. 2005*) (Figura 22). La modulación farmacológica del TNF- α y del sistema xantina/XOD en modelos animales de isquemia normotérmica hepática y trasplante hepático, con o sin PC isquémico previo, confirmó estas observaciones (*Peralta y cols. 1999b; 2001c y 2002; Fernández y cols. 2002*).

Contrariamente, se ha observado que la administración de pequeñas dosis de TNF- α simula los efectos del PC isquémico (*Teoh y cols. 2003b y 2004*), sugiriendo que el TNF- α podría mediar algunos de los efectos del PC isquémico a pequeñas concentraciones.

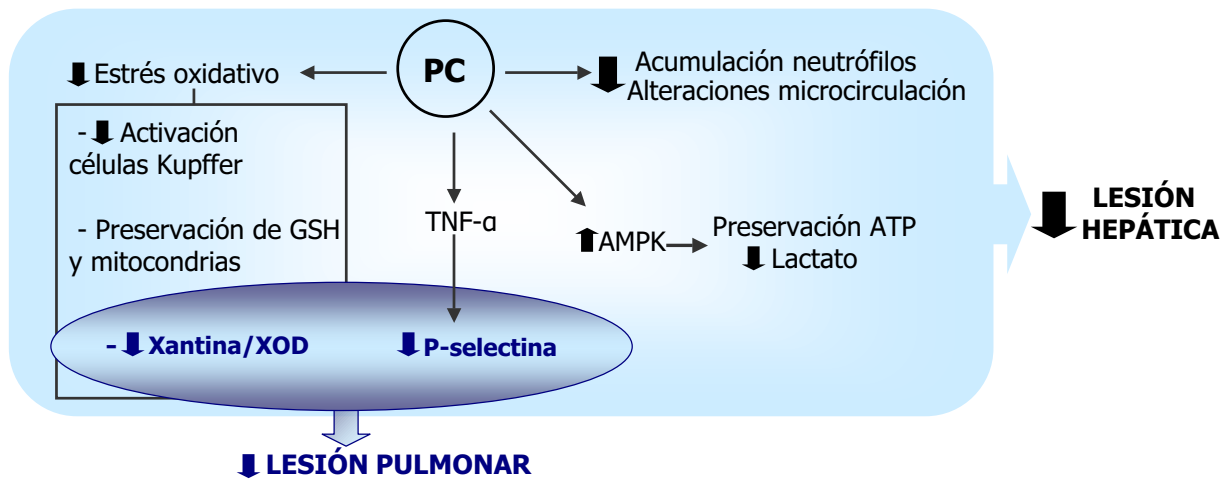


Figura 22. Efectos del PC isquémico sobre los mecanismos responsables de la lesión de I/R.

6.2 PC isquémico e hígados grasos

Los hígados esteatósicos son especialmente susceptibles a la lesión de I/R asociada al trasplante hepático. Recientemente se ha observado en estudios de I/R normotérmica en distintos modelos de hígado graso, así como en pacientes con esteatosis hepática sometidos a hepatectomía que el PC isquémico es capaz de proteger los hígados esteatósicos frente al daño por I/R (Clavien y cols. 2000; Serafín y cols. 2002; Koti y cols. 2005b). El PC isquémico a través de la generación de NO disminuyó la lesión hepática y aumentó la supervivencia frente a un proceso de I/R, reduciendo el estrés oxidativo, la acumulación de neutrófilos, las alteraciones en la microcirculación y modulando la liberación de citoquinas tales como la IL-10 y la IL-1 β (Serafín y cols. 2002 y 2004).

También se ha demostrado en un modelo experimental de isquemia normotérmica en hígados grasos inducidos por la ingesta de una dieta deficiente en colina, que el PC isquémico disminuye la muerte celular por necrosis en el hígado graso tras la I/R hepática mediante la preservación y restablecimiento de los niveles de ATP tras la reperusión (Selzner N. y cols. 2003a).

6.3 Implicaciones clínicas del PC isquémico

A partir del momento en que se describió la efectividad del PC isquémico se han realizado numerosos trabajos con la finalidad de buscar estrategias que puedan mimetizar sus efectos beneficiosos. Entre estas estrategias se encuentra el preconditionamiento térmico, que consiste en inducir un aumento en la temperatura corporal antes de la isquemia hepática (Terajima y cols. 2000; Matsumoto y cols. 2001; Yonezawa y cols. 2001); el preconditionamiento químico con agentes tales como la doxorubicina (Ito y col. 2000; Chen H. y cols. 2004) y el factor natriurético (Gerbes y cols. 1998; Bilzer y cols. 1999; Kierner y cols. 2002), o el preconditionamiento con oxidantes, los cuales reducen la lesión hepática en diferentes modelos experimentales de I/R hepática (Malhi y cols. 2002). Sin embargo, las limitaciones de estas estrategias es su posible aplicación clínica,

bien por la dificultad que ello supondría, por problemas de toxicidad y por los efectos secundarios descritos.

Si bien todas estas estrategias (tratamientos farmacológicos, mejoría de las soluciones de preservación, terapia génica, acondicionamiento térmico y químico) no han podido tener su proyección en la clínica, las investigaciones acerca de la efectividad del PC isquémico en distintos modelos experimentales de I/R han sido la base para que esta estrategia quirúrgica pueda ser aplicada en la clínica.

El uso pionero del PC isquémico en cirugía cardíaca por Yellon y cols. abrió la posibilidad de la utilización de esta técnica en distintos tipos de cirugía (Yellon y cols. 1993). Este grupo demostró que la aplicación del PC isquémico antes de realizar un bypass de la arteria coronaria redujo la lesión del miocardio consecuencia del procedimiento quirúrgico. Posteriormente se han llevado a cabo ensayos clínicos en distintos órganos con resultados esperanzadores (Marber y cols. 1993; Jenkins y cols. 1997; Chen S. y cols. 1999; Kharbanda y cols. 2002; Yang Y. y cols. 2002; Sitzler y cols. 2004; Wegener y cols. 2004).

En el hígado, ensayos clínicos llevados a cabo por Clavien y cols., y Nuzzo y cols., han demostrado el papel protector de la aplicación del PC isquémico en resecciones hepáticas (Clavien y cols. 2000 y 2003; Nuzzo y cols. 2004). En estos estudios, Clavien y cols. observaron que la aplicación del PC isquémico tuvo efectos protectores en una serie de 24 pacientes sometidos a hepatectomía (Clavien y cols. 2000). En los pacientes en los que se aplicó en PC isquémico se produjo una significativa reducción de los niveles plasmáticos de ALT en comparación con el grupo que no fue acondicionado. Además se observó una marcada reducción de la muerte celular por apoptosis de las células endoteliales hepáticas. Recientemente, este mismo grupo ha llevado a cabo un estudio en más de 100 hepatectomías en los que la aplicación del PC isquémico redujo significativamente los niveles de transaminasas con respecto al grupo no acondicionado. Además este estudio demostró que los efectos protectores del PC isquémico sobre los niveles de transaminasas fueron mayores en los pacientes con menos de 60 años de edad, y en hígados con un porcentaje de esteatosis superior al 25% (Clavien y cols. 2003).

Posteriormente otros grupos han realizado estudios sobre la aplicación del PC isquémico en el campo de las resecciones hepáticas. Chouker y cols. observaron que la aplicación del PC isquémico en resecciones hepáticas tuvo como consecuencia una mayor estabilidad hemodinámica tras la reperfusión y una disminución de los niveles de transaminasas con respecto al grupo no acondicionado (Chouker y cols. 2004). Posteriormente Li y cols., demostraron el efecto beneficioso de la aplicación del PC isquémico en pacientes con cirrosis sometidos a hepatectomías (Li y cols. 2004), y por último, Nuzzo y cols. en resecciones hepáticas con tiempos más largos de oclusión del flujo sanguíneo que los empleados en los estudios anteriores (Nuzzo y cols. 2004).

Pese a que todavía no se tienen datos de la aplicación del PC isquémico en el trasplante hepático en humanos, hay estudios que respaldan su posible aplicación clínica en un futuro. Los posibles beneficios del PC isquémico en trasplante en un futuro podrían derivar de su capacidad para disminuir la lesión de I/R en los hígados grasos (*Serafin y cols. 2002*). Los hígados grasos presentan una menor tolerancia a la lesión de I/R asociada al trasplante hepático, y por ello presentan un mayor riesgo de sufrir FPI tras su trasplante. Los resultados beneficiosos de Clavien y cols. (*Clavien y cols. 2003*) al aplicar el PC isquémico sobre los hígados grasos sometidos a hepatectomías, sugieren la posibilidad de que estos mismos efectos beneficiosos se produzcan en el trasplante de hígados esteatósicos, convirtiendo al PC isquémico en una estrategia útil para disminuir la lesión de I/R asociada al trasplante de estos hígados y permitir de ese modo un mayor uso de los hígados esteatósicos en el trasplante aumentando el número de órganos disponibles para ser trasplantados.

II. OBJETIVOS

Actualmente la principal limitación del trasplante hepático es la falta de donantes. Para suplir la carencia de órganos en muchas ocasiones es necesario recurrir al trasplante de órganos que no son óptimos para este fin, los denominados hígados marginales o subóptimos. Dentro de este grupo son de especial interés, debido a la frecuencia con la que aparecen entre los donantes, los hígados grasos o esteatósicos. El trasplante de órganos esteatósicos conlleva un mayor riesgo de disfunción tras el trasplante, debido a la mayor susceptibilidad de este tipo de hígados a la lesión de I/R asociada al trasplante. Las causas de esta mayor susceptibilidad no se conocen con exactitud aunque algunos autores sugieren que podría ser explicada por alguno de los siguientes mecanismos: alteraciones de la microcirculación hepática, mayor lesión por estrés oxidativo, mayor infiltración de neutrófilos o mayor activación de células de Kupffer y liberación de TNF- α tras la I/R hepática.

Diversos estudios muestran que el PC isquémico ha resultado eficaz en la protección de los hígados grasos frente al daño hepático por I/R en un modelo de isquemia normotérmica, y en ellos se sugiere que la preservación de los niveles de ATP llevada a cabo por el PC isquémico podría tener un papel determinante en la protección ejercida por el PC isquémico frente a la lesión de I/R en este tipo de hígados. Sin embargo, se desconoce si el PC isquémico también es capaz de proteger a los hígados grasos frente a la lesión de I/R asociada al trasplante de los mismos.

No se conocen con exactitud los mediadores implicados en los efectos protectores del PC isquémico, pero diversos autores sugieren que el NO y la AMPK están implicados en los efectos beneficiosos del PC isquémico en la lesión de I/R en modelos experimentales de isquemia normotérmica.

Sobre estas bases, los objetivos planteados en esta tesis son los siguientes:

- 1.- Estudiar si el PC isquémico, al modular los mecanismos implicados en la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos a la lesión de I/R, protege frente a la lesión hepática y pulmonar asociada al trasplante de hígados grasos. Evaluación de la implicación del NO en los efectos del PC isquémico sobre cada uno de estos mecanismos.
- 2.- Evaluar el papel de la AMPK y el NO en los posibles cambios inducidos por el PC isquémico en el metabolismo energético de los hígados grasos sometidos a trasplante.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1 Animales de experimentación

Los animales de experimentación utilizados en esta tesis fueron ratas macho de la cepa Zucker (Iffa-Credo, L'Abresle, France), mantenidas en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, como mínimo durante una semana antes llevar a cabo la intervención quirúrgica. Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes, temperatura de 21-22°C, humedad relativa del 70% y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta con un 12% de grasa, un 28% de proteína y un 60% de hidratos de carbono (5001 rodent diet; PMI Inc., Brentwood, MO, USA) y con agua de la red de Barcelona. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con las normas reguladoras de la Unión Europea para modelos de experimentación animal (Directiva 86/609/ECC).

Actualmente la causa más frecuente de esteatosis hepática en donantes de órganos es la obesidad inducida por una mala nutrición. La ratas Zucker constituyen el mejor modelo para estudiar la esteatosis hepática asociada a la obesidad, puesto que a diferencia de otros modelos de hígado graso (inducidos con dietas deficientes en los aminoácidos colina-metionina o dietas ricas en colesterol con o sin ingestión de alcohol), la esteatosis hepática en las ratas Zucker no está asociada a inflamación (*Selzner M. y cols. 2000; Koteish y cols. 2001*).

Las ratas Zucker presentan dos fenotipos diferentes: las ratas Zucker homocigotas fa/fa de fenotipo obeso (Ob), que carecen de receptores cerebrales de leptina y desarrollan obesidad desde las 8 semanas de edad debido al incremento en la ingesta de comida y a la disminución del gasto energético; y las ratas Zucker (Fa/-), que tienen receptores cerebrales de leptina y mantienen un fenotipo delgado durante toda la vida (Ln) (*Bray 1997*).



Para realizar los trasplantes de hígado en los distintos experimentos se han utilizado como animales donantes tanto ratas Zucker Ob como ratas Zucker Ln, mientras que como animales receptores siempre se utilizaron ratas Zucker Ln (Figura 23).

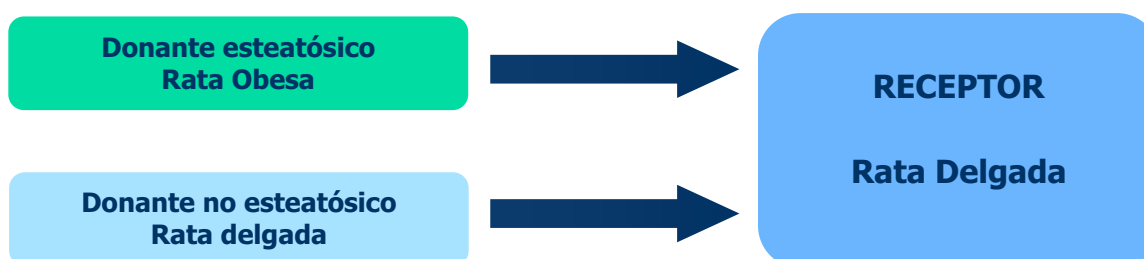


Figura 23. Modelos experimentales de trasplante.

Las ratas Zucker Ob utilizadas tenían entre 10-11 semanas de edad al realizarse la intervención mientras que las ratas Zucker Ln tenían unas 12-13 semanas de edad. La edad de las ratas Zucker Ob fue seleccionada atendiendo a que a la edad de 10-11 semanas presentaban hígados grasos con infiltración grasa moderada, ya que la utilización de los hígados con esteatosis moderada en el trasplante es controvertida, siendo descartados en muchas ocasiones para este fin debido a que presentan un mayor riesgo de desarrollar FPI tras ser trasplantados. Se utilizaron ratas receptoras Ln de mayor edad para resolver el conflicto de espacio en la ubicación del nuevo hígado, ya que a igual edad las ratas Ob presentan hígados de mayor tamaño que las ratas Ln lo que impedía su implantación en el espacio del hígado sustraído de estas últimas.

La diferencia de esteatosis hepática entre los animales Ob y Ln se determinó mediante una tinción específica de lípidos: red oil O. Los animales Ln no mostraron evidencia de esteatosis hepática (Figura 24A); por el contrario, en las ratas Ob se observó infiltración grasa moderada (entre el 30-60%), de tipo macro y microvesicular en el citoplasma de los hepatocitos (Figura 24B).

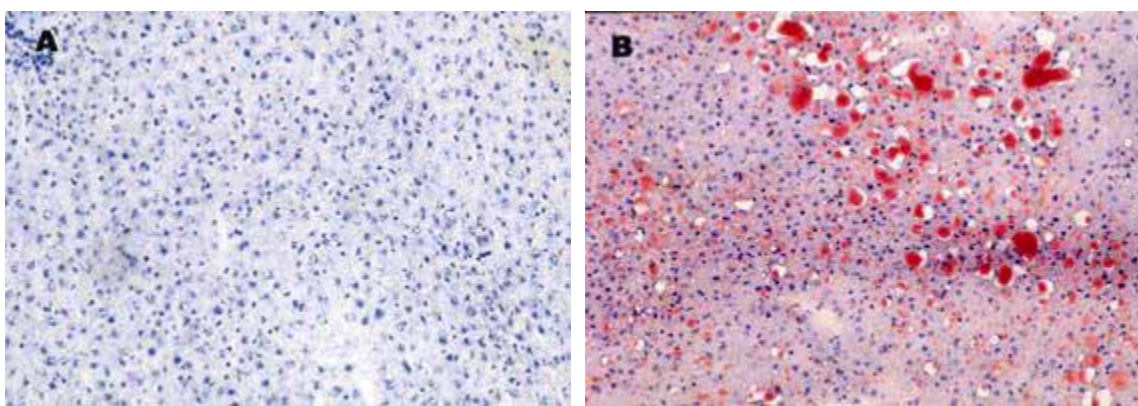


Figura 24. Diferencia de esteatosis entre Zucker Ln (A) y Ob (B) mediante tinción red oil O.

1.2 Disolventes y reactivos

Los moduladores farmacológicos administrados a los grupos experimentales son: alopurinol, adenina 9 β D-arabinofuranosido (araA) y N ω -nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME) de Sigma Chemicals (St. Louis, MO); 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleósido (AICAR) de Toronto Research Chemicals (North York, Ontario) y spermine NONOato de Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI).

Los reactivos utilizados son: NaHCO₃, EDTA, acetona, HCl, monofosfato potásico (KH₂PO₄), ácido tricloroacético (TCA), KCl, Tween 20, albúmina de suero bovino (BSA), ácido perclórico (HClO₄), carbonato potásico (K₂CO₃), carbonato sódico (Na₂CO₃), etanol, tris base, NaOH y NaCl que fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). Azul de nitritetrazolio (NBT), xantina, XOD, SOD (de hígado bovino, 4.5 mg prot/ml Biuret, 3500 U/mg proteína), bromuro de

hexadeciltrimetilamonio (HTBA), tetrametilbenzidina (TMB), ácido tiobarbitúrico (TBA), dimetilsulfóxido (DMSO), Ditioneitol (DTT), 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB), glutation transferasa (GST), GSH ester, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), aprotinina, peróxido de hidrógeno, diaminobenzidina (DAB), manitol, fluoruro de sodio (NaF), β -mercaptoetanol, persulfato amónico, AMP, cloruro de magnesio ($MgCl_2$), EGTA, Tritón X-100, deoxicolato y ortovanadato sódico (Na_3VO_4) que fueron suministrados por Sigma Chemical (St. Louis, MO). Además la arginina radioactiva (L-[$U-^{14}C$] monohidrocloruro de arginina, 50 $\mu Ci/ml$ y el [$\gamma-P^{32}$] ATP fueron suministrados por Amersham Biosciences (Piscataway, NJ); el NAD por Boehringer (Manheim, Alemania); la Acrilamida/bisacrilamida 30%, la membrana de PVDF Immuno-Blot™, dodecil sulfato sódico (SDS), laemli, glicina y el reactivo para la determinación de las proteínas por Bio-Rad Laboratories S.A. (Madrid, España); el tampón fosfato salino (PBS) 10X por GIBCO, Invitrogen Corporation (Gran Island, NY, USA); el cocktail de inhibidores de proteasas, Tris-HCl, leupeptina, antitripsina, Nonidet p40 y el inhibidor de tripsina de soja por Roche (Mannheim, Germany); el glicerol por Calbiochem (San Diego, CA, USA); el xilol por Panreac Quimica S.A. (Barcelona, España); la hematoxilina por Dako (Denmark, Alemania) y el péptido sintético His-Met-Arg-Ser-Ala-Met-Ser-Gly-Leu-His-Leu-Val-Lys-Arg-Arg (SAMS) por Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA).

1.3 Anticuerpos, proteínas recombinantes y kits comerciales

Los anticuerpos contra la forma fosforilada y no fosforilada de la AMPK se obtuvieron de Cell Signaling (Beverly, MA); los anticuerpos frente a las formas endotelial e inducible de la NOS de Transduction laboratories (Lexington;KY); el anticuerpo frente a la β -actina de Sigma (St. Louise, MO, USA) y el anticuerpo frente a la nitrotirosinas de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY).

Se utilizaron como marcadores de pesos moleculares para la realización de los Westerns: Prestained protein marker, broad range de Cell Signaling (Beverly, MA) y Kaleidoscope Prestained Standard de Bio-Rad Laboratories S.A. (Madrid, España). Además como controles positivos de la eNOS y de la iNOS respectivamente: lisados de células endoteliales humanas y macrófagos activados por interferón γ ($IFN\gamma$)/LPS de BD Transduction Laboratories (Lexington;KY).

A continuación se citan los kits empleados: para la determinación de transaminasas y de lactato se utilizaron kits suministrados por Boehringer Manheim (Manheim, Alemania); para la determinación de TNF- α un kit de ELISA de Biosource (CA USA); para la determinación de nitrotirosinas se utilizó "Nitrotirosina ELISA Test Kit" de TCS Biologicals (Bucks, UK); para la determinación de nitrato/nitrito y de la actividad de la NOS se utilizaron kits suministrados por Cayman Chemical (Ann Arbor, MI); para la determinación de la actividad de la caspasa-3 un kit de Calbiochem (San Diego, CA, USA); para la detección de las proteínas por Western un kit de

quimioluminiscencia "Immuno-Star™ HRP Chemiluminescent Kit" de Bio-Rad Laboratories S.A. (Madrid, España); para la inmunohistoquímica de nitrotirosinas "R.T.U. Vectastain Universal Quik Kit" de Vector Laboratories (Burlingame, Calif) y para la detección de apoptosis por la tinción TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin Nick-End Labeling) "Apotag® peroxidase in situ apoptosis detection kit" de Intergen Company (Oxford, UK).

1.4 Instrumental

Para la realización de los grupos experimentales se utilizó: instrumental quirúrgico de B. Braun Aesculap (Barcelona, España) y de J. Herrera, S.A. (Barcelona, España); Sedas 6/0-2/0 de Suturas Aragón (Barcelona, España); el catéter para la unión del conducto biliar (2 cm largo, 0.96 cm diámetro externo y 0.5 cm diámetro interno) y el cuff de la vena porta (2.09 mm diámetro externo, 1.58 mm diámetro interno) de Cole-Palmer Instrument Company (Vernon Hills, Illinois, USA); el catéter para la perfusión del órgano con la solución de preservación por la arteria aorta (20 G) de Medicuth, Venflon (Helsinborg, Suecia); Prolene 7/0 de Johnson and Johnson Jntl (St. Stevens-Woluwe, Bélgica); el cuff de la vena cava (3.3 mm diámetro externo, 2.6 mm diámetro interno) de Penine Healthcare (Ascot Drive, UK); Anestésico inhalatorio Isoflorano de Abbott Laboratories (Madrid, España); Solución de preservación de la UW de ViaSpan®, Bristol-Myers (Madrid, España); Solución de Ringer Lactato y NaHCO₃ de B. Braun Medical S.A. (Barcelona, España); suero fisiológico de Fresenius Kabi S.A. (Barcelona, España) y heparina sódica de Laboratorios Farmacéuticos Rovi S.A. (Barcelona, España).

Para el estudio de la microcirculación hepática se emplearon medidores de flujo sanguíneo por efecto Doppler (modelo LD5000) y por ultrasonidos (T206) ambos de Transonic Systems Inc. (NY, USA).

Para el procesamiento de las muestras se utilizaron los siguientes equipos: Ultracentrífuga L 90K (Beckman Coulter. Palo Alto, CA, USA); Homogenizador Polytron T 25B (Ika Labortechnik. Staufen, Alemania); Homogenizador de tipo Potter (Afora. Barcelona, España); pH-metro 501 (Crison. Alella, España); Evaporador-concentrador Savant (Telstar S.A, Terrasa, España); Liofilizador (FTS Systems. Stone Ridge, New York, USA); Sonicador (Labsonic, Braun-Biotech SA. Barcelona, España) y Contador de centelleo líquido β Wallac 1409 (Pharmacia. Turku, Finlandia).

Para las determinaciones espectrofotométricas se utilizó bien el espectrofotómetro Ultrospec 3000 UV/visible de Pharmacia Biotech (Sunnyvale, CA, USA) o bien con un equipo para lectura de placas Labsystems (Helsinki, Finlandia) con el software Ascent incorporado.

Todo el instrumental necesario para la realización de las técnicas de Western Blot y el software Quantity One para su determinación cuantitativa fue suministrado por Bio-Rad Laboratories S.A. (Madrid, España).

Para el estudio histológico se utilizó un inclusor de parafina Citadel 1000 (Shandon Scientific Ltd, Cheshire, UK) y un Microscopio de luz visible Vanox-S AH-2 (Olympus optical Co, Tokyo, Japón) con una Cámara Nikon (Tokyo, Japón).

2. MÉTODOS

2.1 Modelo experimental: trasplante ortotópico de hígado esteatósico

2.1.1 Anestesia

Los distintos procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo bajo anestesia inhalatoria con isoflurano. La inducción anestésica se realizó con isoflurano al 4% con un flujo de oxígeno de 2-2.5 l/min, y se mantuvo con isoflurano al 1.5-2% con flujo de oxígeno de 2-2.5 l/min. En los animales donantes la anestesia se mantuvo hasta el momento de la perfusión del hígado con la solución de preservación de la UW. Mientras que en el animal receptor la anestesia se interrumpió al inicio de la fase anhepática, y al finalizar ésta se reinició y se mantuvo con un 0.5-1% de isoflurano hasta finalizar la intervención. El flujo de oxígeno fue constante durante toda la operación.

2.1.2 Trasplante hepático: técnica del doble "cuff"

El trasplante ortotópico de hígado se realizó según la técnica del doble "cuff" descrita por Kamada y cols. (*Kamada y cols. 1979*), sin reconstrucción de la arteria hepática. Consta de las siguientes etapas:

Donante

Una vez inducida la anestesia en el animal donante, se rasuró el abdomen, se colocó en posición decúbito supino sobre la mesa de operaciones y se inmovilizó. Previo lavado del abdomen con povidona iodada, se realizó una laparotomía transversal aproximadamente 1 cm por debajo del apéndice xifoides. A continuación se seccionaron los ligamentos hepáticos, y se procedió a la liberación de la vena cava inferior, y la liberación y posterior ligadura con una seda 6/0 de 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 común. Se ligaron las ramas esplénica y pilórica de la vena porta, y el conducto biliar se canuló con un catéter de polietileno, que se fijó con una doble ligadura de seda 6/0 (Figura 25A). Seguidamente se liberó y ligó la vena diafragmática derecha, y se separó la arteria aorta de la vena cava inferior.

Unos min antes de la perfusión del hígado con la solución de preservación de la UW, se administraron 300 unidades de heparina por vía intravenosa. Una vez iniciada la perfusión a través de la arteria aorta mediante un catéter, se ocluyó la aorta torácica, previa apertura del diafragma, y se seccionó la vena cava inferior suprahepática por encima del diafragma. Seguidamente se continuó la perfusión del hígado con 50 ml de solución de preservación de la UW (Figura 25B). Una vez perfundido el hígado, se realizó su extracción y se colocó en un baño con solución de preservación de la UW a 4°C.

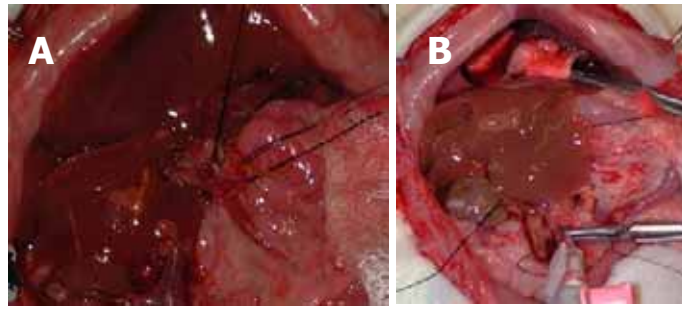


Figura 25. (A) Preparación del hígado antes de su extracción del animal donante.
(B) Perfusión del hígado donante con solución de la UW.

Preservación

Se conoce como preservación a todas aquellas medidas que se adoptan desde que el hígado es extirpado del donante hasta su posterior implante en el receptor. La preservación del órgano se realiza a temperaturas entre 2-4°C con el órgano inmerso en la solución de preservación. Una vez colocado el hígado en la solución de preservación a 4°C, se procedió a la preparación del órgano para su posterior implante en el animal receptor.

Con la finalidad de facilitar la posterior anastomosis de la vena cava inferior suprahepática, se recortó parte del diafragma que la rodeaba y se colocaron dos puntos de referencia en ambos extremos de la vena cava mediante Prolene 7/0.



Para la anastomosis de la vena porta y de la vena cava inferior infrahepática se utilizó la técnica del doble cuff. Consiste en la colocación de una estructura tubular de polietileno, denominada cuff (Figura 26A), rodeando la vena, de modo que se evierte la vena sobre el mismo (Figura 26B) y se fija con una doble ligadura con seda 6/0 (Figura 26C). La colocación de estas estructuras en la vena porta y la vena cava inferior infrahepática facilita su posterior anastomosis, al evitar realizar la misma mediante sutura continua, y disminuye la duración de la intervención, lo que es muy importante para la supervivencia del receptor. La colocación de los cuffs en la vena cava y en la vena porta se realizó tras la preparación de la vena cava inferior suprahepática.



Figura 26. (A) Cuff de polietileno. (B) Colocación del cuff en la vena cava infrahepática.
(C) Doble ligadura del cuff de la vena porta.

Receptor

Una vez inducida la anestesia en el animal receptor, y de forma similar a como se realizó en el animal donante, se llevó a cabo la laparotomía y disección del hígado. Para facilitar la introducción de los cuffs y orientar de forma adecuada las venas porta y cava inferior infrahepática se colocaron en ambos extremos de cada una de ellas puntos de sutura de Prolene 7/0.

Una vez colocados los puntos de sutura, se ocluyeron mediante clamps microvasculares, la vena porta en su confluencia con la vena esplénica, la vena cava inferior infrahepática justo por encima de la vena renal derecha; y con una pinza Satinsky, se ocluyó la vena cava inferior suprahepática. En este momento comienza la fase anhepática. Después se seccionaron las venas porta y cava inferior supra e infrahepáticas, todas en su parte más proximal al hígado y se realizó la extracción del hígado nativo del animal receptor (Figura 27A).

A continuación se procedió a implantar el hígado del donante, previa perfusión con solución de Ringer Lactato para eliminar el exceso de ión potasio que contiene la solución de preservación de la UW. Mediante sutura continua con Prolene 7/0, se realizó la anastomosis entre la vena cava inferior infrahepática del donante y la del receptor (Figura 27B).

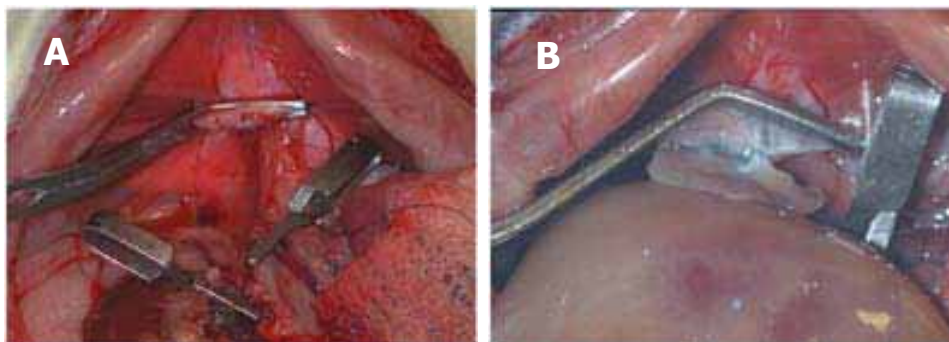


Figura 27. (A) Extracción del hígado nativo del receptor. (B) Anastomosis de la vena cava suprahepática del receptor y del donante mediante sutura continua.

Seguidamente, se realizó la anastomosis de la vena porta, mediante la introducción del cuff colocado en la vena porta del hígado del donante dentro de la vena porta del receptor y posterior ligadura con sutura de seda 6/0. Una vez realizadas estas dos primeras anastomosis se procedió a la reperfusión del injerto, mediante la eliminación de los clamps vasculares que ocluían las venas, primero la vena porta e inmediatamente después la vena cava inferior suprahepática (Figura 28A).

Finalmente, la anastomosis de la vena cava inferior infrahepática se realizó de forma similar a la de la vena porta (Figura 28A y B), y del mismo modo, se eliminó el clamp vascular que la ocluíó reconstituyendo el flujo sanguíneo a este nivel (Figura 28C).

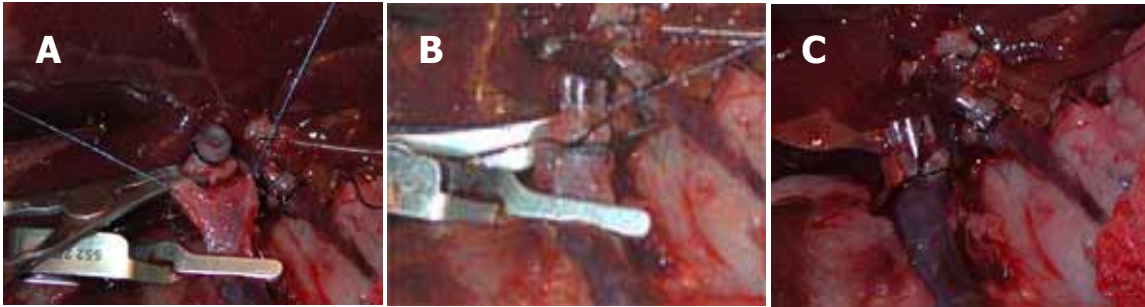


Figura 28. (A) Anastomosis de la vena cava infrahepática mediante la técnica del cuff. (B) Doble ligadura del cuff una vez finalizada la anastomosis. (C) Reperusión del hígado a través de la vena cava infrahepática.

Una vez realizadas todas las uniones vasculares se administró un bolus intravenoso a través de la vena dorsal del pene de solución isotónica de Ringer Lactato y NaHCO_3 (2.5 ml de solución isotónica de Ringer Lactato + 0.5 ml de NaHCO_3 1 M) con el fin de restaurar el volumen perdido y contrarrestar la acidosis producida durante la intervención, respectivamente.

Después se realizó la anastomosis del conducto biliar mediante la unión del conducto del donante y del receptor con un tubo de polietileno que previamente se había colocado en el hígado donante y se fijó con una ligadura de seda 6/0. Y para finalizar la intervención se cerró el animal con sutura continua de la capa muscular y de la piel con seda 2/0.

2.1.3 Precondicionamiento isquémico

El PC isquémico se realiza en el hígado donante antes de la perfusión del mismo con la solución de preservación de la UW. Consiste en la oclusión de la arteria hepática y la vena porta con un clamp microvascular durante 5 min (Figura 29A) y la posterior reperusión del hígado durante los 10 min siguientes (Figura 29B). Estos tiempos de isquemia y reperusión del PC isquémico fueron elegidos en base a un estudio realizado en un modelo de isquemia normotérmica en hígados grasos en el que el PC isquémico realizado de esta forma tuvo un efecto protector frente a la lesión de I/R hepática (Serafin y cols. 2002).

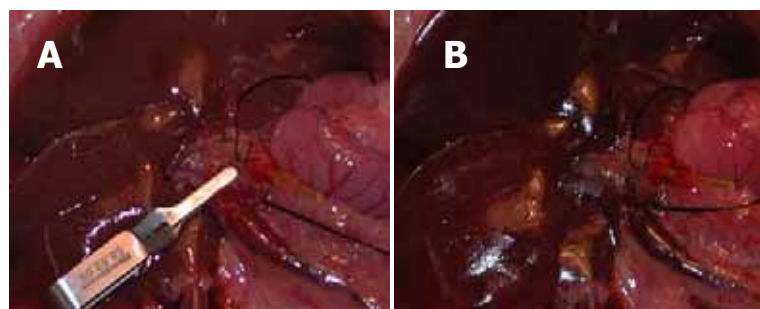


Figura 29. (A) Fase de isquemia del PC isquémico por oclusión de la vena porta y la arteria hepática con un clamp vascular. (B) Fase de reperusión del PC isquémico.

2.2 Recogida y procesamiento de las muestras

En todos los grupos experimentales, con el animal anestesiado, se recogieron muestras de sangre y tejidos hepático y pulmonar.

Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena cava inferior infrahepática, y se mantuvieron con unas gotas de heparina y a 4°C hasta su posterior centrifugación (10 min a 3000 rpm a 4°C) para obtener el plasma. El plasma se mantuvo congelado a -80°C hasta la realización de las correspondientes determinaciones analíticas.

Parte del tejido hepático y pulmonar se congeló inmediatamente después de su obtención con nieve carbónica y se mantuvo a -80°C hasta su posterior procesamiento. Además, otra parte del tejido hepático y pulmonar se fijó en formol tamponado al 10% para realizar posteriormente su inclusión en parafina y obtener cortes histológicos para la realización de la histología, la tinción específica de lípidos y las técnicas de inmunohistoquímica.

2.3 Grupos experimentales

2.3.1 Objetivo 1: Estudiar si el PC isquémico, al modular los mecanismos implicados en la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos a la lesión de I/R, protege frente a la lesión hepática y pulmonar asociada al trasplante de hígados grasos. Evaluación de la implicación del NO en los efectos del PC isquémico sobre cada uno de estos mecanismos. Para ello se establecieron los siguientes protocolos experimentales:

Protocolo 1. Estudiar si el PC isquémico, al modular los mecanismos implicados en la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos a la lesión de I/R, protege frente a la lesión hepática y pulmonar asociada al trasplante de hígados grasos (Figura 30).

Para el desarrollo de este protocolo se realizaron los siguientes grupos experimentales:

1. Sham (n=12, 6 Ob y 6 Ln): Animales Ln y Ob fueron sometidos a anestesia, laparotomía transversal y se ligaron las venas suprarrenal derecha, la arteria hepática y la vena diafragmática. Después se procedió a la recogida de las muestras y se sacrificaron los animales.
2. Trasplante (TX) (n=24; 12 trasplantes, en 6 de los cuales se utilizaron Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron Ln como donantes): El animal donante fue sometido al protocolo quirúrgico correspondiente y tras la perfusión del hígado con la solución de preservación de la UW a 4°C, el hígado se mantuvo durante 6 h a 4°C en la misma solución de preservación. Transcurridas éstas, se realizó el trasplante de hígado utilizando siempre como receptor ratas Zucker Ln de acuerdo con la técnica de Kamada

descrita anteriormente. Transcurridas 4 h desde el inicio de la reperfusión del órgano se procedió a la recogida de las muestras.

3. Precondicionamiento isquémico + Trasplante (PC+TX) (n=24; 12 trasplantes, en 6 de los cuales se utilizaron Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron Ln como donantes): Se realizó del mismo modo que el grupo 2, pero previamente a la perfusión del hígado con la solución de preservación se realizó el PC isquémico que consistió en 5 min de isquemia y 10 min de reperfusión (*Serafin y cols. 2002*).

La duración de los períodos de isquemia fría y de reperfusión aplicados para la realización de esta tesis están basados en estudios anteriores en los que observó que la preservación fría durante 6 h induce lesión hepática en hígados posteriormente trasplantados, y que tras 4 h de reperfusión los parámetros de lesión hepática alcanzan los máximos niveles (*Camargo y cols. 1997; Serafin y cols. 2002; Sun Z. y cols. 2003*).

Tras 4 h de reperfusión se recogieron muestras de sangre, hígado y pulmón. Para evaluar la lesión hepática asociada al trasplante de hígados grasos se realizaron las siguientes determinaciones: actividad plasmática de transaminasas, lesión por necrosis mediante estudio histológico del tejido hepático y lesión por apoptosis mediante determinación de los niveles hepáticos de caspasa-3 y tinción TUNEL en cortes histológicos de hígado. La lesión pulmonar se evaluó mediante la determinación de los niveles de malonildialdehído (MDA) y de la actividad de la MPO en pulmón; y se realizó el estudio histológico del tejido pulmonar. Para evaluar el efecto del PC isquémico sobre las alteraciones microcirculatorias se estimó el flujo sanguíneo hepático y el flujo portal durante la reperfusión. Se determinó la actividad de la MPO en el tejido hepático para evaluar el efecto del PC isquémico sobre la infiltración de neutrófilos; y los niveles plasmáticos de TNF- α para evaluar su efecto sobre la activación de células de Kupffer. Para el estudio del efecto del PC isquémico sobre el estrés oxidativo asociado al trasplante de hígados grasos se midieron los niveles de MDA, y se evaluaron los sistemas antioxidantes GSH y SOD en el tejido hepático. Además se evaluó el papel del sistema generador de RLO xantina/XOD en los hígados esteatósicos durante la preservación fría y el efecto del PC isquémico sobre el mismo, para lo que fue necesario añadir los siguientes grupos experimentales:

4. Control (n=12, 6 Ob y 6 Ln): Los hígados de animales Zucker Ln y Ob fueron perfundidos con solución de preservación de la UW a 4°C. Después se procedió a la recogida de las muestras hepáticas y se sacrificaron los animales.
5. Isquemia (I) (n=12, 6 Ob y 6 Ln): Los hígados de animales Zucker Ln y Ob fueron perfundidos con solución de preservación de la UW a 4°C, y preservados a 4°C en la misma solución de preservación durante 6 h. Transcurridas éstas se procedió a la recogida de las muestras hepáticas.

6. Precondicionamiento isquémico + Isquemia (PC+I) (n=12, 6 Ob y 6 Ln): Se realizó del mismo modo que el grupo 5, pero antes de la perfusión del hígado se realizó el PC isquémico (*Serafin y cols. 2002*).

Al final del periodo de isquemia se recogieron muestras de tejido hepático para la determinación de los niveles de xantina y de la actividad de XDH/XOD.

Para el estudio del papel del sistema xantina/XOD en el daño hepático y pulmonar tras el trasplante de hígados esteatósicos, además se añadió el siguiente grupo experimental:

7. Trasplante + Alopurinol (TX+allop) (n=24; 12 trasplantes, en 6 de los cuales se utilizaron Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron Ln como donantes): Se realizó del mismo modo que el grupo 2, pero justo antes de iniciarse la reperfusión del hígado en el receptor se administró un inhibidor de la XDH/XOD, el alopurinol (100 mg/kg, bolus iv.). El alopurinol es un análogo de la hipoxantina que es convertido a oxipurinol por la XDH/XOD inhibiendo de ese modo la formación de RLO a partir de la hipoxantina/xantina. Se administró al iniciarse la reperfusión para excluir los posibles efectos beneficiosos del alopurinol durante la isquemia (*Fernández y cols. 2002; Jaeschke 2002a*)

Tras 4 h de reperfusión se recogieron muestras de sangre, hígado y pulmón. Se evaluó la lesión hepática por determinación de la actividad plasmática de las transaminasas y mediante estudio histológico del tejido hepático. Para evaluar la lesión pulmonar se determinaron los niveles de MDA y la actividad de la MPO en el pulmón y se llevó a cabo el estudio histológico del tejido pulmonar. Además las muestras de hígado fueron procesadas para la determinación de los niveles de MDA.

Protocolo 2. Evaluación de la implicación del NO en los efectos del PC isquémico sobre los mecanismos responsables de la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos a lesión de I/R (Figura 30).

Para desarrollar este protocolo se añadieron los siguientes grupos experimentales:

8. Precondicionamiento isquémico + isquemia + L-NAME (PC+I+NAME) (n=12): Se realizó del mismo modo que el grupo 6, pero 5 min antes de realizar el PC isquémico se administró L-NAME (10 mg/kg, i.v.), que es un análogo de la L-arginina que inhibe de forma inespecífica la síntesis de NO (*Serafin y cols. 2002*).
9. Precondicionamiento isquémico + Trasplante + L-NAME (PC+TX+NAME) (n=24; 12 trasplantes, en 6 de los cuales se utilizaron Ob como donantes y en los otros 6 se

utilizaron Ln como donantes): Se realizó del mismo modo que el grupo 3, pero 5 min antes de realizar el PC isquémico se administró L-NAME (10 mg/kg, i.v.).

En el caso del grupo 8, tras la preservación fría de 6 h, se recogieron muestras hepáticas para la determinación de la acumulación de xantina y de la actividad XDH/XOD. En el caso del grupo 9, tras 4 h de reperfusión se recogieron muestras de sangre, hígado y pulmón y se realizaron las mismas determinaciones que en los grupos 1, 2 y 3.

GRUPOS EXPERIMENTALES		DETERMINACIONES
Sham	Donante (Ln y Ob) Receptor (Ln) Anestesia y laparotomía	Plasma: Transaminasas, TNF- α Hígado: MDA, MPO Antioxidantes (SOD, GSH) TUNEL, Caspasa-3 Flujo sanguíneo hepático/porta Histología Pulmón: MDA, MPO, Histología
TX	6h I fría → TX 4h R	
PC+TX	PC +6h I fría → TX 4h R	
PC+TX+NAME	NAME+ PC +6h I fría → TX 4h R	
TX+Allop	6h I fría → TX allop +4h R	Plasma: Transaminasas Hígado: MDA, Histología Pulmón: MDA, MPO, Histología
Control	Anestesia y laparotomía	Hígado: Actividad XDH/XOD Niveles de Xantina
I	6h I fría	
PC+I	PC + 6h I fría	
PC+I+NAME	NAME+ PC + 6h I fría	

Figura 30. Esquema de los grupos experimentales y determinaciones llevadas a cabo para la evaluación del objetivo 1.

2.3.2 Objetivo 2: Evaluar el papel de la AMPK y el NO en los posibles cambios inducidos por el PC isquémico en el metabolismo energético de los hígados grasos sometidos a trasplante. Para ello se establecieron los siguientes protocolos experimentales:

Protocolo 1. Evaluar el papel de la AMPK en los efectos del PC isquémico en el metabolismo energético de los hígados grasos sometidos a trasplante (Figura 31).

Para el desarrollo de este protocolo a los grupos 1, 2 y 3 planteados en el protocolo 1 del objetivo 1 (páginas 68-69) se añadieron los siguientes grupos experimentales:

10. Precondicionamiento isquémico + Trasplante + araA (PC+TX+araA) (n=24; 12 trasplantes, en 6 de los cuales se utilizaron Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron Ln como donantes): Se realizó igual que el grupo 3, pero 10 min antes de realizar el PC isquémico se administró araA (100 μ g/kg/min, i.v.). El araA es un análogo

de la adenosina que inhibe a la AMPK. Se acumula dentro de la célula donde es fosforilado a su forma trifosfato y mimetiza los efectos inhibidores del ATP sobre la AMPK (*Walus y cols. 1981; Peralta y cols. 2001b*).

11. Trasplante + AICAR (TX+AICAR) (n=24; 12 trasplantes, en 6 de los cuales se utilizaron Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron Ln como donantes): Se realizó del mismo modo que el grupo 2, pero 5 min antes de perfundir el hígado con la solución de preservación en el donante se administró AICAR (100 mg/kg, i.v.). El AICAR es un análogo de la adenosina y activa de forma inespecífica la AMPK. Se acumula dentro de la célula donde es fosforilado a su forma monofosfato (ZMP), que mimetiza los efectos del AMP sobre la AMPK, activándola (*Galiñanes y cols. 1992; Velasco y cols. 1997; Leclerc y cols. 1998; Peralta y cols. 2001b*).

Tras 4 h de reperusión se recogieron muestras de sangre e hígado. La lesión hepática se evaluó por determinación de la actividad plasmática de las transaminasas y se realizó el estudio histológico del tejido hepático. Para evaluar los efectos del PC isquémico sobre el metabolismo energético en el trasplante de hígados grasos se determinaron los niveles hepáticos de ATP y nucleótidos de adenina. Además, se obtuvieron muestras de hígado tras 6 h de preservación fría y fueron procesadas para la determinación de ATP y nucleótidos de adenina.

También se valoró el efecto del PC isquémico sobre el estrés oxidativo asociado al trasplante de hígados grasos mediante la determinación de los niveles hepáticos de MDA, y se evaluó la formación de nitrotirosinas.

Protocolo 2. Evaluar la relación entre AMPK y NO en el PC isquémico en el trasplante de hígados grasos.

Para ello se establecieron 2 protocolos con los siguientes grupos experimentales:

Protocolo 2.1. Implicación del NO en los efectos del PC isquémico en el trasplante de hígados esteatósicos (Figura 31). Al grupo 9 planteado en el protocolo 2 del objetivo 1 (página 70), se añadieron los siguientes grupos experimentales:

12. Trasplante + AICAR + L-NAME (TX+AICAR+NAME) (n=24; 12 trasplantes, en 6 de los cuales se utilizaron Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron Ln como donantes). Se realizó del mismo modo que el grupo 2, pero 5 min antes de la perfusión del hígado del donante con la solución de preservación se administró AICAR (100 mg/kg, i.v.) y L-NAME (10 mg/kg, i.v.) (*Peralta y cols. 1997*).
13. Trasplante + NO (TX+NO) (n=24; 12 trasplantes, en 6 de los cuales se utilizaron Ob como donantes y en los otros 6 se utilizaron Ln como donantes): Se realizó del mismo

modo que el grupo 2, pero 5 min antes de la perfusión del hígado del donante con la solución de preservación se administró spermine NONOato (10 mg/kg, i.v.). El spermine NONOato es un donador de NO. En el organismo se disocia dando lugar a una amina libre y a NO de forma pH-dependiente. Libera dos moles de NO por mol de spermine NONOato administrado (*Peralta y cols. 1997*).

Tras 4 h de reperfusión se recogieron muestras de sangre e hígado. La lesión hepática se evaluó por determinación de la actividad plasmática de las transaminasas y se realizó el estudio histológico del tejido hepático. Para evaluar los efectos del PC isquémico sobre el metabolismo energético en el trasplante de hígados grasos se determinaron los niveles hepáticos de ATP y nucleótidos de adenina. Además, se obtuvieron muestras de hígado tras 6 h de preservación fría y fueron procesadas para la determinación de ATP y nucleótidos de adenina.

También se valoró el efecto del PC isquémico sobre el estrés oxidativo asociado al trasplante de hígados grasos mediante la determinación de los niveles hepáticos de MDA, y se evaluó la formación de nitrotirosinas.

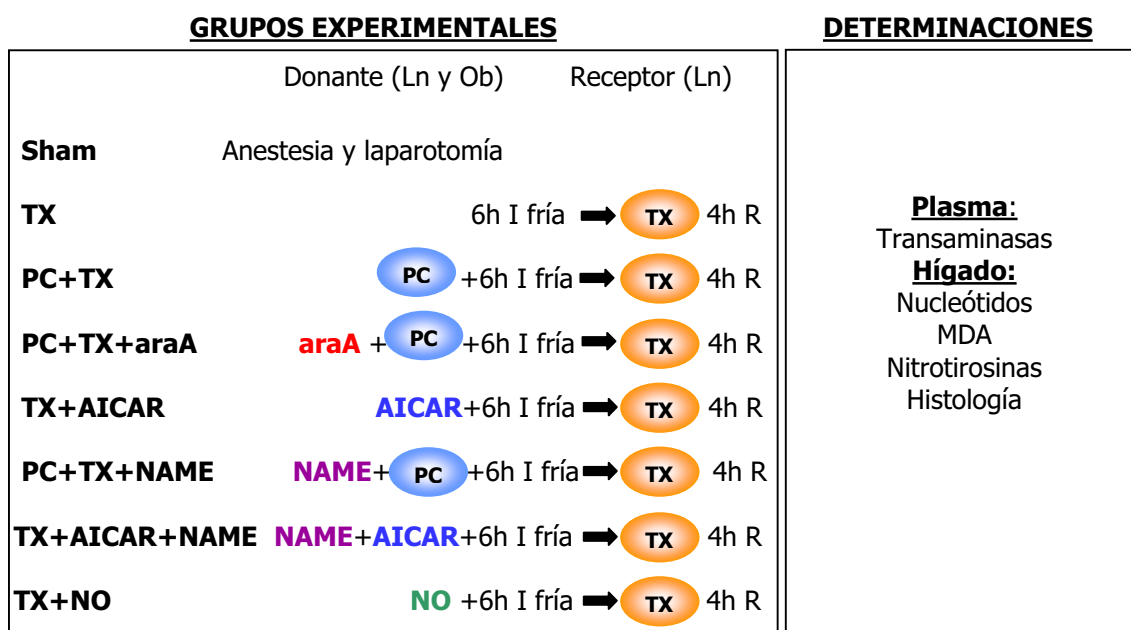


Figura 31. Esquema de los grupos experimentales y determinaciones llevadas a cabo para la evaluación de los protocolos 1 y 2.1 del objetivo 2.

Protocolo 2.2. Efecto de la AMPK en la generación de NO tras la inducción del PC isquémico (Figura 32).

14. Precondicionamiento isquémico (PC) (n=12, 6 Ob y 6 Ln): Se realizó del mismo modo que el grupo 1, pero con previo PC isquémico (*Serafín y cols. 2002*).
15. AICAR (n=12, 6 Ob y 6 Ln): Se realizó del mismo modo que el grupo 1, pero se trató con AICAR (100 mg/kg, i.v.) durante 5 min (*Peralta y cols. 1997 y 2001b*).

16. Precondicionamiento isquémico + araA (PC+araA) (n=12, 6 Ob y 6 Ln): Se realizó del mismo modo que el grupo 14, pero se administró araA (100 µg/kg/min, i.v.) 10 min antes de realizar el PC isquémico (Walus y cols. 1981; Peralta y cols. 2001b).

Al final del protocolo se obtuvieron muestras de hígado y se procesaron para la determinación de la forma fosforilada de la AMPK (P-AMPK) y de la forma endotelial e inducible de la NOS. Se midió la actividad de la AMPK y de la NOS, y los niveles de nitrato/nitrito en el tejido hepático.

<u>GRUPOS EXPERIMENTALES</u>		<u>DETERMINACIONES</u>
PC	Sham + PC	Hígado: AMPK, NOS Nitrato/nitrito
AICAR	Sham + AICAR	
PC+araA	Sham + araA + PC	

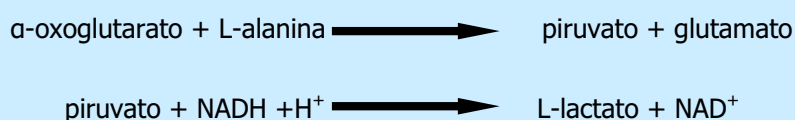
Figura 32. Esquema de los grupos experimentales y determinaciones llevadas a cabo para la evaluación del protocolo 2.2 del objetivo 2.

2.4 Determinaciones bioquímicas

2.4.1 Actividad de transaminasas

Las transaminasas, ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato amino transferasa), son unos enzimas muy abundantes en el hígado. En condiciones fisiológicas se encuentran en el citoplasma de los hepatocitos, y al producirse una lesión hepática son liberadas a la circulación sanguínea. La determinación de la actividad de estos enzimas en el plasma se utiliza como parámetro de la lesión hepática. Como enzima específico del hígado, la ALT se eleva significativamente sólo en enfermedades hepatobiliares. Sin embargo, la AST puede tener aumentos en patologías cardíacas o de músculo esquelético así como de parénquima hepático. Las medidas simultáneas de ALT y AST sirven para diferenciar patologías hepáticas de patologías de corazón y de músculo esquelético.

Las transaminasas participan en el metabolismo de los aminoácidos; catalizan la conversión de un aminoácido en un ácido carboxílico por transferencia de un grupo amino. La actividad de estos enzimas se determinó mediante un kit comercial, que es un ensayo enzimático basado en la medida de la desaparición de NADH mediante espectrofotometría a una longitud de onda $\lambda=365$ nm, según las siguientes reacciones:





Los resultados obtenidos se expresaron en U/l (*Bergmeyer 1988*).

2.4.2 Análisis de nucleótidos

La determinación de ATP y nucleótidos de adenina en tejido hepático tras el trasplante se utilizó como parámetro de funcionalidad hepática (*Lanir y cols. 1988; Baykal y cols. 1998*); mientras que su determinación tras la preservación fría se utilizó para evaluar los efectos del PC isquémico sobre el metabolismo energético.

La determinación del contenido en nucleótidos de adenina (ATP+ADP+AMP), nucleósidos de adenina (adenosina+inosina) y bases (xantina+hipoxantina) se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (*Sugino y cols. 1986*). Brevemente, las muestras de hígado fueron homogenizadas en 10 volúmenes de HClO₄ al 3.6%. Tras la homogenización, se llevó a cabo su extracción a 0.5°C durante 30 min, tras la cual de nuevo las muestras fueron centrifugadas a 850 *g* durante 15 min. Los sobrenadantes se ajustaron a pH 6 y fueron centrifugados a 14000 rpm. Se inyectaron alícuotas de 50 μ l de sobrenadante en un cromatógrafo líquido Waters 717 conectado a un detector ultravioleta. Las separaciones de los diferentes nucleótidos y productos de degradación del ATP se realizaron a 254 nm. Los resultados obtenidos se expresaron en pmol/g de tejido húmedo.

2.4.3 Actividad de la AMPK

La AMPK es una proteína quinasa que tiene un papel central en la regulación del metabolismo energético celular, y se ha visto que modula entre otros el metabolismo de los ácidos grasos y el colesterol. Entre sus acciones a este nivel, se ha descrito que fosforila e inactiva la acetil-CoA carboxilasa, enzima que cataliza el primer paso de la biosíntesis de los ácidos grasos, inactivando de este modo la síntesis de ácidos grasos y favoreciendo su β -oxidación para la obtención de energía en situaciones de déficit energético.

Esta técnica está basada en la capacidad de la AMPK para incorporar radioactividad desde el [γ -³²P]ATP a la acetil-CoA carboxilasa. La secuencia peptídica de la acetil-CoA carboxilasa fosforilada específicamente por la AMPK ha sido identificada y sintetizada, y se conoce como péptido SAMS (*Davies y cols. 1989*).

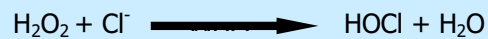
Para la determinación de la actividad de la AMPK en tejido hepático las muestras se homogenizaron en el siguiente tampón: 200 mM manitol, 50 mM NaF, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, and 10 mM β -mercaptoetanol (tampón A), suplementado con 10 mg/l aprotinina, 10 mg/l leupeptina, and 10 mg/l antitripsina. Posteriormente se precipitó la AMPK con sulfato

de amonio, y la actividad de la AMPK se determinó en el tampón A suplementado con 0.2 mM AMP, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM péptido SAMS y 0.2 mM [γ -³²P]ATP (2 μ Ci por ensayo) por la incorporación de [γ -³²P]ATP al péptido SAMS. La radioactividad fue cuantificada mediante un contador de centelleo. La actividad de la AMPK se expresó como pmol ³²P incorporados/min/mg proteína (Carlson y cols. 1999; Carling 2004).

2.4.4 Actividad de la MPO

La MPO es un enzima que se encuentra en el interior de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos y se utiliza como marcador de la presencia de estas células en el tejido inflamado (Colleti y cols. 1990b; Schmekel y cols. 1990). En esta tesis se utilizó como parámetro de infiltración y actividad de neutrófilos en el tejido hepático y pulmonar.

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



El ácido hipocloroso es un potente oxidante con gran capacidad citotóxica, que destruye los microorganismos fagocitados por los neutrófilos y que liberado al medio extracelular contribuye a la lesión del tejido inflamado.

El método se basa en la reacción de la tetrametilbenzidina catalizada por la MPO (Trush y cols. 1994). Es importante conseguir una buena extracción de la enzima, para ello las muestras se homogenizaron en tampón fosfato (KH₂PO₄ 0.05 M (pH=6), con HTBA 0.5%) y posteriormente se sonicaron durante 30 seg al 20% de potencia. Tras un proceso de congelación y descongelación tres veces seguidas, las muestras se incubaron durante 2 h a 60°C para eliminar la actividad de las peroxidasas inespecíficas. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras durante 12 min a 3000-4000 *g* a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas en el mismo.

A 10 μ l del sobrenadante se le añadieron 10 μ l de reactivo de TMB (5 mg/ml disuelto en DMSO). A tiempo t=0 se añadieron 70 μ l de tampón fosfato (KH₂PO₄ 8 mM -pH=5.4-) con H₂O₂ al 0.05% y se determinó la cinética enzimática leyendo absorbancias cada 15 seg durante 3 min a una longitud de onda λ =630 nm. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce un incremento de una unidad de absorbancia por min.

2.4.5 Niveles de TNF- α

El TNF- α es una de las citoquinas implicadas en la isquemia-reperfusión hepática. Es una molécula proinflamatoria que una vez liberada al torrente sanguíneo induce la síntesis de otras citoquinas y quemoquinas, y regula la expresión de moléculas de adhesión favoreciendo la

acumulación de neutrófilos en el espacio vascular y su posterior interacción con las células del endotelio vascular.

Para la determinación de los niveles plasmáticos de TNF- α se utilizó un kit de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados obtenidos se expresaron en pg/ml.

2.4.6 Niveles de MDA

El MDA es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica y se utilizó como parámetro indirecto de estrés oxidativo (*Baykal y cols. 1998*).

Los niveles de MDA se determinaron en muestras de tejido hepático y pulmonar mediante el método del ácido tiobarbitúrico (*Okhawa y cols. 1978*). En condiciones ácidas y a altas temperaturas el MDA reacciona con el TBA para dar lugar a un compuesto de color rosa, cuantificable por espectrofotometría. Este ensayo cuantifica principalmente MDA, pero otros productos de la peroxidación lipídica también reaccionan con el TBA. Por lo que estos productos son denominados reactivos del TBA (TBARS). Los valores se expresan como equivalentes de MDA. Las muestras de tejido congelado se homogenizaron en 2 ml de tampón Tris Base (pH=7) y se determinó la concentración de proteínas en el mismo. A 250 μ l de este homogenado se le añadieron 250 μ l de TCA al 40% para precipitar las proteínas. Se vorteo y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min a 4°C. Al sobrenadante se le añadió 250 μ l de TBA 0.67% y se llevó a 100°C durante 15 min. Tras dejar enfriar, se midió la absorbancia a una longitud de onda $\lambda=530$ nm.

Para la preparación de la recta patrón se utilizó un estándar de MDA, obtenido disolviendo 120 μ l de 1,1,3,3-tetrahidroxipropano en 50 ml de HCl 0.1 M y calentándolo durante 60 min a 50°C. 50 μ l del estándar de MDA se disolvieron en 5 ml de agua; a 500 μ l de esta solución se le añadieron 4.5 ml de agua, siendo éste el punto más concentrado de la recta patrón (10 nM), a partir de ésta se hicieron 3 diluciones seriadas a la mitad. Como blanco se utilizó agua destilada. Los resultados se expresaron en nmol MDA/mg proteína.

2.4.7 Niveles de nitrotirosinas

Muchos de los efectos perjudiciales del NO no son directamente producidos por él, sino que son mediados por el peroxinitrito, un producto de la reacción entre el NO y el superóxido, altamente oxidante y citotóxico. Los efectos nocivos del peroxinitrito se producen sobre diferentes dianas: produciendo la nitración de los residuos de tirosina de las proteínas, la peroxidación de lípidos y la rotura del DNA. El peroxinitrito es una molécula muy inestable y altamente reactiva por lo que su producción es únicamente demostrable de forma indirecta. Por ello la formación de nitrotirosinas se utiliza como marcador indirecto de la formación de peroxinitrito (*Virág y cols. 2002*).

Para la determinación de los niveles de nitrotirosinas en el tejido hepático, las muestras se homogenizaron en frío en 10 volúmenes de tampón fosfato sódico 50 mM (pH 7.4), se centrifugaron a 20000 *g* durante 30 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas en el mismo (*Greenacre y cols. 1999; Minato y cols. 2003*).

La cuantificación de los niveles de nitrotirosinas en el sobrenadante se llevó a cabo mediante un kit de ELISA, en el que las muestras y los estándares fueron incubados en pocillos cubiertos con anticuerpos antinitrotirosinas. Durante la incubación las nitrotirosinas presentes en la muestra fueron capturadas por el anticuerpo y el material presente en la muestra que no se unió al anticuerpo se eliminó por lavado. El anticuerpo secundario biotinado se añadió a continuación a los pocillos, y éste se unió a las nitrotirosinas capturadas. El exceso de anticuerpo se eliminó por lavado. Seguidamente se añadió un conjugado peroxidasa-estreptavidina, que reacciona de forma específica con el anticuerpo secundario unido a las nitrotirosinas capturadas. El exceso de conjugado se eliminó por lavado y se añadió el sustrato TMB dando lugar a un compuesto coloreado. El color obtenido es proporcional a la cantidad de nitrotirosinas presentes en la muestra. La reacción se detuvo mediante ácido cítrico, y mediante espectrofotometría se midió la absorbancia a una longitud de onda $\lambda=450$ nm. La curva estándar se obtuvo mediante la determinación de las absorbancias frente a las concentraciones conocidas del estándar. La concentración de nitrotirosinas de las muestras se determinó a partir de la curva patrón. Los resultados se expresaron en pmol/mg proteína.

2.4.8 Niveles de nitrato/nitrito

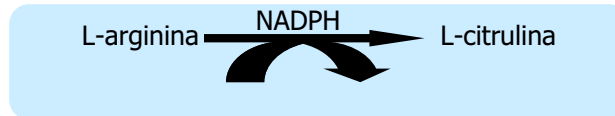
El NO puede reaccionar con numerosas moléculas presentes en el organismo, los productos finales del NO *en vivo* son el nitrito (NO_2^-) y el nitrato (NO_3^-). La proporción relativa de nitrito y nitrato es variable y no puede ser determinada con certeza, así pues el mejor índice de la producción total de NO en la suma de ambos (*Hortelano y cols. 1992*).

La producción de NO en el tejido hepático se determinó midiendo la acumulación de nitrato/nitrito mediante un kit comercial. Las muestras de tejido hepático se homogenizaron en frío en 2 ml de Tris-HCl 100 mM (pH 7.4) y se determinó la concentración de proteínas en el mismo. A 500 μl de homogenado se le añadieron 100 μl de HCl 1 N para precipitar las proteínas. Tras centrifugar, el sobrenadante se ajustó a pH 7.6 con 100 μl de NaOH 1 N y 300 μl de Tris-HCl 100 mM. Los niveles de nitrato/nitrito se determinaron en el sobrenadante mediante un kit comercial en un proceso de dos etapas. El nitrato se redujo a nitrito por incubación durante 3 h con una nitrato reductasa en presencia de NADPH y flavin-adenin-dinucleótido (FAD). En el segundo paso el nitrito se determinó mediante el reactivo de Griess que convierte el nitrito en un compuesto coloreado. Mediante espectrofotometría se midió la absorbancia a una $\lambda=540$ nm. Los resultados se expresaron en nmol/mg proteína.

2.4.9 Actividad de la NOS

Las NOS constituyen una familia de enzimas que catalizan la conversión de arginina en citrulina produciendo NO. Se han descrito tres isoformas de la NOS: dos formas constitutivas dependientes de calcio, y una forma inducible independiente de calcio.

La actividad de la NOS se determinó mediante un kit comercial, basado en la conversión de L-arginina en L-citrulina por la NOS mediante la siguiente reacción:



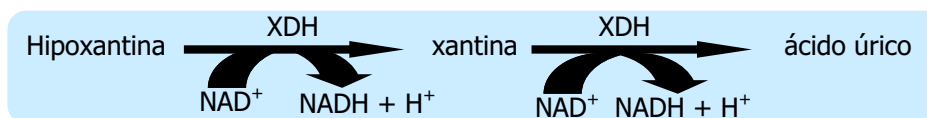
Las muestras de tejido hepático se homogenizaron en frío en 10 volúmenes del siguiente tampón: 250 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, y se centrifugaron a 10000 *g* durante 15 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas del mismo.

La actividad de la NOS en el sobrenadante se determinó de la siguiente manera: las muestras se incubaron durante 60 min con arginina radioactiva (50 μ Ci/ml), transcurridos éstos la reacción se detuvo por la adición de un tampón que inactivó los distintos tipos de NOS (el bajo pH y el quelante de calcio EDTA del tampón inactivaron respectivamente la forma inducible y las constitutivas de la NOS). A continuación se añadió una resina, que capturó la arginina que no había sido transformada y las reacciones se pipetearon a tubos ependorff y se centrifugaron. Se eliminó la resina con la arginina unida y se recogió el eluato que contenía la citrulina formada durante la reacción que no se unió a la resina. La actividad de la NOS se cuantificó midiendo la radioactividad de la citrulina formada presente en el eluato mediante un contador de centelleo líquido β (Wallac 1409). Los resultados se expresaron en μ mol Arg/min/mg proteína (Balligand y cols. 1994).

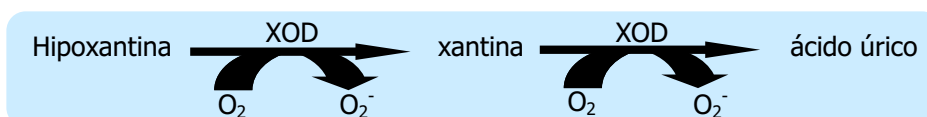
2.4.10 Actividad xantina deshidrogenasa, xantina oxidasa

El enzima XDH/ XOD se encuentra ampliamente distribuido en el organismo e interviene en el metabolismo final de degradación de los ácidos nucleicos. Se encuentra en el citoplasma de la célula en forma de xantina deshidrogenasa; la forma deshidrogenasa puede pasar a la forma oxidasa de forma reversible por la reducción de puentes disulfuro o la acción de proteasas citoplasmáticas dependientes de calcio. De modo que al homogenizar es muy importante hacerlo a 4°C y en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF) y de agentes que estabilicen los puentes disulfuro (DTT) para evitar su conversión durante el procesamiento de las muestras.

Se diferencian en la molécula que utilizan como aceptor de electrones, mientras que la forma deshidrogenasa utiliza NAD^+ como aceptor de electrones, la forma oxidasa utiliza la molécula de oxígeno generando radicales superóxido. Las reacciones que catalizan son para su forma deshidrogenasa:



y en su forma oxidasa:

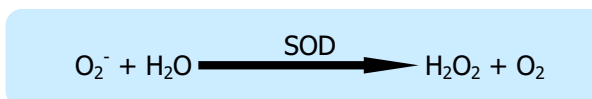


Las muestras de tejido hepático fueron homogenizadas en 100 mM de tampón Tris, que contenía EDTA 10 mM, 1 mM PMSF y 1 mM DTT. El homogenado se centrifugó a 15000 g a 4°C, se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas en el mismo.

El sobrenadante se pasó por cromatografía de columna Sephadex G-25 80 en el mismo tampón a 4°C. Los eluatos resultantes se utilizaron para medir la actividad XDH y XOD. Las actividades fueron medidas por espectrofotometría mediante la detección del ácido úrico que se forma por la acción de estos enzimas. Se determinó la aparición de ácido úrico a una longitud de onda $\lambda=292$ nm con presencia (para medir actividad total XDH+XOD) o ausencia de NAD^+ (para medir la actividad específica XOD). Se utilizó xantina (60 mM) como sustrato. Se determinó la cinética del enzima durante 5 min a 20°C. Los resultados se expresaron en mU/g tejido seco (Stirpe y cols. 1969; Corte y cols. 1972).

2.4.11 Actividad de la SOD

El enzima superóxido dismutasa cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido (O_2^-) por reacción con una molécula de agua, dando lugar a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2):



La técnica de determinación de SOD se basa en la capacidad del radical superóxido de reducir la molécula de NBT a formazán, que tiene un color azulado que absorbe a una longitud de onda $\lambda=540$ nm. Si en el medio hay SOD, eliminará los radicales superóxido y se inhibirá la formación de formazán. Como fuente de radicales superóxido se utilizó el sistema xantina/xantina oxidasa (Sun Y. y cols. 1988).

Las muestras de tejido hepático se homogenizaron en 100 mM de tampón Tris, que contenía EDTA 10 mM, PMSF 1 mM y DTT 1 mM (pH 8.1) y se determinó la concentración de proteínas en el homogenado.

Para la preparación de la curva estándar se utilizó una disolución de SOD de concentración 32 U/ml como punto más concentrado y se hicieron 6 diluciones mitad. Se dispensaron 20 μ l de muestra y se añadieron 20 μ l de XOD (200 U/l) excepto en el blanco; se adicionaron 200 μ l de tampón de reacción (Na_2CO_3 0.05 M -pH=10.2-); xantina 10^{-4} M; EDTA 10^{-4} M y NBT 2.5×10^{-5} M) y se realizó una cinética con lecturas durante 15 min cada 30 segundos a una longitud de onda $\lambda=540$ nm. Los resultados se expresaron en U/mg proteína.

2.4.12 Niveles de GSH

El GSH es un tripéptido que actúa como antioxidante debido a su capacidad de reaccionar con compuestos oxidantes, convirtiéndose en GSSG. Cuando un tejido está sometido a estrés oxidativo se produce una disminución de GSH.

El método se basa en la reacción entre el 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno y GSH catalizada por la glutathion transferasa. Esta reacción genera como producto S-2,4-dinitrofenil-glutathion que presenta un máximo de absorción a una longitud de onda $\lambda=330-360$ nm (*Brigellius y cols. 1983*).

Se homogenizaron las muestras en tampón KCl 1.15% y se determinó la concentración de proteínas en el mismo. A continuación se precipitaron las proteínas con HClO_4 1 N, se centrifugaron las muestras a 15000 *g* y el sobrenadante se neutralizó con K_2CO_3 al 10% (todo ello en frío). La curva patrón se obtuvo a partir de GSH 1 mM por sucesivas diluciones mitad y se procesó de la misma forma que las muestras. Para la determinación se añadió el reactivo de CDNB (solución extemporánea, en tampón fosfato potásico 0.2 M, pH=7 y EDTA 10 mM) a 50 μ l de blanco, de la curva y de las muestras, se realizó una lectura a dos longitudes de onda $\lambda_1=340$ nm y $\lambda_2=405$ nm y entonces se añadió 5 μ l de GST (disuelto en el mismo tampón fosfato a una concentración de 12 U/L); transcurridos 5 min se volvió a leer la absorbancia a ambas longitudes de onda. La concentración de GSH se obtuvo restando las absorbancias obtenidas en cada tiempo a las dos longitudes de onda y después restando estos dos valores resultantes. Los resultados obtenidos se expresaron en μ mol glutathion/mg proteína.

2.4.13 Actividad caspasa-3

La caspasa-3 es una proteína perteneciente a una familia de cisteína-proteasas que está implicada en las fases finales de la muerte celular por apoptosis.

Para la determinación de la actividad de la caspasa-3 en tejido hepático las muestras fueron homogenizadas en frío en el siguiente tampón: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1%

tritón X100, 0.1% SDS, 1% deoxicolato; centrifugadas a 14000 rpm durante 10 min a 4°C, y se recogió el sobrenadante en el que se determinó la concentración de proteínas (*Brown y cols. 2003; Selzner N. y cols. 2003a*).

La actividad caspasa-3 se determinó en el sobrenadante mediante un kit comercial que emplea un sustrato colorimétrico Ac-DEVD-*p*NA (N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina) que tras su escisión por la caspasa-3 presenta un incremento de absorción a 405 nm (*Schlegel y cols. 1996*). Para ello las muestras se disolvieron en un volumen total de 90 µl de tampón de ensayo y tras la adición de 10 µl de sustrato colorimétrico, la absorbancia se leyó a una longitud de onda de $\lambda=405$ nm cada min durante 1 h. El factor de conversión se determinó mediante la lectura de las absorbancias de 100 µl de 50 µM de *p*-nitroanilina. La cantidad de color amarillo producido es proporcional a la actividad de la caspasa-3 presente en la muestra. La actividad se calculó como la pendiente de la recta de las absorbancias obtenidas tras 1 h multiplicada por el factor de conversión, y los datos se expresaron en pmol/l/min.

2.4.14 Western Blot de AMPK, iNOS, eNOS

Las muestras de hígado fueron homogenizadas siguiendo distintos protocolos de acuerdo con la proteína a determinar:

- AMPK. Las muestras fueron homogenizadas en frío en el siguiente tampón: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 0.1 mM Na₃VO₄, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 0.05% Tritón X100 y un cocktail de inhibidores de proteasas a un pH 7.5. El homogenado se incubó en hielo durante 15 min y se centrifugó a 15000 *g* durante 20 min. Se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de proteínas en los mismos.
- eNOS/iNOS. Las muestras fueron homogenizadas en frío en el siguiente tampón: 10 mM EDTA, 140 mM NaCl, 20 mM Tris base (pH 8.00), 10% glicerol, 1% Nonidet p40, 2.5 µg/ml aprotinina, 2 mM PMSF, 60 µg/ml inhibidor de tripsina de soja; y centrifugadas a 13000 rpm a 4°C durante 10 min. Se separaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de proteínas en los mismos.

La misma concentración de proteínas se utilizó para todas las muestras en cada ensayo. Las proteínas se mezclaron con el mismo volumen de tampón de carga de electroforesis (95% Laemli/5% β-mercaptoetanol) y se desnaturalizaron calentando la mezcla a 95°C durante 10 min. Las proteínas se separaron de acuerdo a su peso molecular por electroforesis en un gel de poliacrilamida/SDS al 10% a un voltaje constante de (120 mV), y posteriormente fueron transferidas a una membrana de PVDF (0.2 µm) con una intensidad de 350 mA durante 120 min en un tampón 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 20% etanol. Las membranas se sumergieron en una solución de bloqueo con un 5% de BSA (200 mM Tris base, 3 M NaCl, 2%

Tween 20 -pH 7.5-) durante 60 min y después fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios disueltos en la solución de bloqueo (anti-P-AMPK [Thr172] dilución 1:1000; anti-AMPK dilución 1:1000; anti-eNOS dilución 1:500; anti-iNOS dilución 1:1000). A la mañana siguiente las membranas se lavaron con un tampón 200 mM Tris base, 3 M NaCl, 2% Tween 20 (pH 7.5), 3 veces por 10 min, y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón (para la eNOS y la iNOS) o anti IgG de conejo (para la AMPK) dilución 1:5000 en solución de bloqueo. Después de sucesivos lavados, la detección de las proteínas se llevó a cabo mediante un kit de quimioluminiscencia de acuerdo con las instrucciones del mismo. Un estándar pre-teñido se utilizó como marcador de peso molecular, y para los ensayos de la eNOS y de la iNOS se utilizaron controles positivos que se corrieron en paralelo a las muestras. Las membranas fueron de nuevo incubadas con anticuerpos frente a la β -actina para confirmar que se cargaron las mismas cantidades de proteína en cada pocillo.

La estimación cuantitativa de las proteínas en las membranas se realizó por análisis densitométrico de la bandas de proteína mediante el Programa Quantity One, y se corrigió mediante la cantidad de β -actina, que se utilizó como control. Los valores se expresan en unidades arbitrarias (*Mayoral y cols. 1999; Atkinson y cols. 2002; Vazquez-Gil y cols. 2004*).

2.4.15 Proteínas

Las proteínas se determinaron por el método colorimétrico de Bradford, mediante un reactivo comercial, que se basa en el cambio de absorbancia que en solución ácida presenta el colorante azul de Coomassie en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. La concentración de proteínas en la muestra es directamente proporcional a la absorbancia observada a una longitud de onda $\lambda=595$ nm. Para la curva patrón se utilizó una solución de albúmina de 4.75 mg/ml, a partir de la cual se realizaron 6 diluciones mitad. Los resultados obtenidos se expresaron en mg/ml.

2.5 Microcirculación hepática

La microcirculación hepática se evaluó mediante el estudio de la perfusión sanguínea utilizando un medidor de flujo sanguíneo basado en el efecto Doppler. Esta técnica se considera adecuada para el estudio de los cambios relativos en el flujo sanguíneo (*Arvidsson y cols. 1988; Almond y cols. 1992; Vollmar y cols. 1994; Seino y cols. 1993*). Para monitorizar la perfusión sanguínea hepática se utilizó una sonda de fibra óptica (Tipo R de cabezal epoxy, diámetro 15 mm, altura 7 mm), que en cada animal se colocó sobre los mismos puntos de la superficie hepática. El resultado se consideró como la media de la medida de los cinco puntos de la superficie hepática. El valor del flujo sanguíneo se expresó como porcentaje del valor preisquémico (*Vollmar y cols. 1994; Aiba y cols. 2001*).

Además se determinó el flujo sanguíneo de entrada al hígado mediante un medidor del tránsito sanguíneo por unidad de tiempo mediante ultrasonidos (T206). Se utilizó una sonda de 1 mm que se colocó en la rama izquierda de la vena porta. El valor del flujo sanguíneo portal se expresó como porcentaje del valor preisquémico (*Langle y cols. 1997; Kazuo y cols. 1998*)

2.6 Estudio histológico

Las muestras se procesaron según procedimientos estándar para su estudio mediante microscopía óptica. Inmediatamente después de la extracción las muestras se fijaron al menos durante 24 h en formol tamponado al 10%. Tras la inclusión en parafina, las muestras se cortaron con un microtomo en secciones de 3-5 μm . Se realizó una tinción con hematoxilina eosina siguiendo los procedimientos convencionales.

Para evaluar la severidad de la lesión hepática, los cortes se clasificaron por un método de recuento utilizando la siguiente escala: grado 0, lesión mínima o sin evidencia de lesión; grado 1, lesión consistente en vacuolización citoplasmática y pignosis nuclear focal; grado 2, lesión de moderada a severa con pignosis nuclear extensa, hipereosinofilia citoplasmática y pérdida del contorno celular; grado 3, necrosis severa con desaparición de los cordones de hepatocitos, hemorragias e infiltrados de neutrófilos. Para evaluar el porcentaje de necrosis se valoraron 40 campos de aumento alto elegidos de manera aleatoria por sección (*Cottart y cols. 1999*).

Para evaluar el grado de esteatosis hepática se congeló el tejido hepático y se utilizó la tinción de Red Oil O en secciones de 3 μm de acuerdo con los procedimientos estándar.

2.7 Técnicas de Inmunohistoquímica

2.7.1 Nitrotirosinas

Las muestras de tejido hepático se fijaron en formol tamponado al 10%, se incluyeron en parafina y se obtuvieron distintos cortes histológicos de cada muestra (3 μm). Los cortes se desparafinaron y rehidrataron de la siguiente manera: 2 veces por 5 min en xilol; 2 veces por 3 min en alcohol absoluto; 2 veces por 3 min en alcohol 96°; 3 min en alcohol 50°; 3 veces por 5 min en agua destilada y 5 min en PBS 1X. A continuación, se les añadió una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en PBS durante 5 min para bloquear la actividad de las peroxidasas endógenas. Tras lavado con PBS, los cortes se incubaron con la solución de bloqueo al 2.5% suministrada por el kit durante 60 min. Transcurridos éstos se eliminó el exceso de solución de bloqueo y los cortes se incubaron durante 2 h con el anticuerpo primario anti-nitrotirosinas (Dilución 1:200 en PBS con solución de bloqueo al 5%), y posteriormente 60 min con el anticuerpo secundario biotinado y 60 min con el complejo estreptavidina/peroxidasa suministrados por el kit. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente, y entre los distintos pasos se realizaron lavados con PBS. Como cromógeno se utilizó una solución de DAB

y peróxido de hidrógeno. Se contrastó con hematoxilina. La presencia de nitrotirosinas se puso de manifiesto por su tinción de color marrón. En uno de los cortes se omitió la adición del anticuerpo primario frente a nitrotirosinas como control negativo (*Viera y cols. 1999*).

En cada grupo experimental se evaluaron 5-6 campos de aumento alto elegidos de manera aleatoria por sección. Para cuantificar el grado de tinción de nitrotirosinas se estableció una escala del 0-4, de modo que: 0, ausencia de tinción; 1-3, graduación creciente de tinción moderada; 4 tinción intensa (*Zingarelli y cols. 1999*).

2.7.2 TUNEL

Para detectar las células apoptóticas se evaluó la fragmentación nuclear del DNA de las células apoptóticas *in situ* mediante el método TUNEL utilizando un kit comercial. Este método está basado en la incorporación al DNA de los nucleótidos presentes en el medio de reacción por la enzima TdT, que cataliza la adición de nucleótidos trifosfato unidos a digoxigenina a los extremos 3'-OH libres de las cadenas de DNA, dobles o simples, fragmentadas. A continuación el DNA se une a un anticuerpo anti-digoxigenina que se conjuga a una molécula de peroxidasa. El conjugado anticuerpo-peroxidasa genera enzimáticamente mediante sustratos cromógenos una tinción intensa, localizada, que puede ser detectada por inmunohistoquímica. Esta reacción es sensible al tipo de fragmentación del DNA que tiene lugar tras la apoptosis (*Gavrieli y cols. 1992*).

Las muestras de tejido hepático se fijaron en formol tamponado al 10%, se incluyeron en parafina y se obtuvieron distintos cortes histológicos de cada muestra (3 µm). Los cortes se desparafinaron y rehidrataron de la siguiente manera: 2 veces por 5 min en xilol; 2 veces por 3 min en alcohol absoluto; 2 veces por 3 min en alcohol 96°; 3 min en alcohol 50°; 3 veces por 5 min en agua destilada y 5 min en PBS 1X. A continuación, se les añadió una solución de peróxido de hidrógeno al 2% en PBS durante 5 min para bloquear la actividad de las peroxidasas endógenas. Tras lavado con agua destilada y PBS, los cortes se incubaron con el tampón de equilibrio provisto por el kit durante 15 min, y transcurridos éstos con el enzima y los nucleótidos unidos a digoxigenina presentes en el tampón de reacción provisto por el kit, en una cámara húmeda a 37°C durante 1 h. Por último, los cortes se incubaron con un conjugado anti-digoxigenina-peroxidasa. El color se obtuvo con una solución de peróxido de hidrógeno y DAB. Se contrastó con hematoxilina. Los hepatocitos TUNEL-positivos se tiñeron de color marrón. En uno de los cortes se omitió la adición de la TdT como control negativo.

Para evaluar la presencia de células apoptóticas se valoraron 40 campos de aumento alto elegidos de manera aleatoria por sección.

2.8 Estudio estadístico

Los datos están expresados como valor de la media \pm error estándar de la media. Los datos obtenidos fueron sometidos al estudio estadístico mediante un test de análisis de la varianza, ANOVA y seguidamente se determinó el nivel de significación estadística mediante el test t de Student. En todos los casos, los resultados se consideraron significativamente diferentes cuando $p < 0.05$.

Los símbolos utilizados son:

* = $p < 0.05$ versus control

+ = $p < 0.05$ versus trasplante

◦ = $p < 0.05$ versus PC isquémico

IV. RESULTADOS

1. EFECTO DEL PC ISQUÉMICO SOBRE LA LESIÓN HEPÁTICA DE I/R ASOCIADA AL TRASPLANTE DE HÍGADOS ESTEATÓSICOS

Para valorar la lesión hepática asociada al trasplante se determinó la actividad plasmática de las transaminasas (ALT, AST), se evaluó la lesión por necrosis mediante estudio histológico de tejido hepático, y la lesión por apoptosis por determinación de la actividad hepática de la caspasa-3 y tinción TUNEL de cortes histológicos de tejido hepático.

Tanto en hígados grasos como en hígados no grasos, se observó tras el trasplante (TX) un aumento de los niveles de transaminasas con respecto a los observados en el grupo sham, siendo este aumento mucho más elevado tras el trasplante con injertos esteatósicos (Figura 33). Por otro lado, el estudio histológico del tejido hepático, mostró tras el trasplante (TX) de hígados no grasos (Figura 34A) áreas multifocales de necrosis coagulativa (grado 1 y 2) e infiltración de neutrófilos, distribuidas aleatoriamente por el parénquima hepático; mientras que tras el trasplante de hígados grasos (Figura 34B) se observaron áreas de necrosis coagulativa con infiltración de neutrófilos en mayor número y mucho más extensas (grado 3) distribuidas por todo el parénquima hepático. Estos resultados muestran que los hígados grasos son más vulnerables a la lesión hepática de I/R asociada al trasplante hepático que los hígados no grasos. La aplicación del PC isquémico (PC+TX) protegió frente a la lesión hepática de I/R asociada al trasplante en ambos tipos de hígados. Este efecto se puso de manifiesto por un menor aumento de la actividad de las transaminasas tras el trasplante (Figura 33) y una marcada reducción de las áreas de necrosis, en extensión y en número, en ambos tipos de hígados (Figuras 34C-34D).

La inhibición de la síntesis de NO durante el PC isquémico mediante la administración de NAME (PC+TX+NAME) eliminó los efectos beneficiosos del PC isquémico sobre los parámetros histológicos y bioquímicos de lesión hepática determinados en ambos tipos de hígados (Figura 33), observándose en este grupo niveles de transaminasas y lesiones histológicas similares a las obtenidas en el grupo trasplantado (TX). Estos resultados muestran la implicación del NO en los efectos beneficiosos del PC isquémico sobre la lesión hepática asociada al trasplante de hígados esteatósicos.

En los hígados no grasos la inhibición de la XOD mediante la administración de alopurinol (TX+allop), previno el aumento de los niveles de la ALT tras el trasplante, pero no se encontraron diferencias en los niveles de la AST. Por contra, la administración de alopurinol en los hígados esteatósicos previno el aumento de ambos tipos de transaminasas (ALT y AST) tras el trasplante (Figura 33). El estudio histológico del tejido hepático indicó que el alopurinol redujo en número y tamaño las áreas de necrosis observadas tras el trasplante en ambos tipos de hígados. La administración de alopurinol resultó menos efectiva sobre los parámetros

histológicos que la aplicación del PC isquémico, que dio lugar a menos y más pequeñas áreas de necrosis.

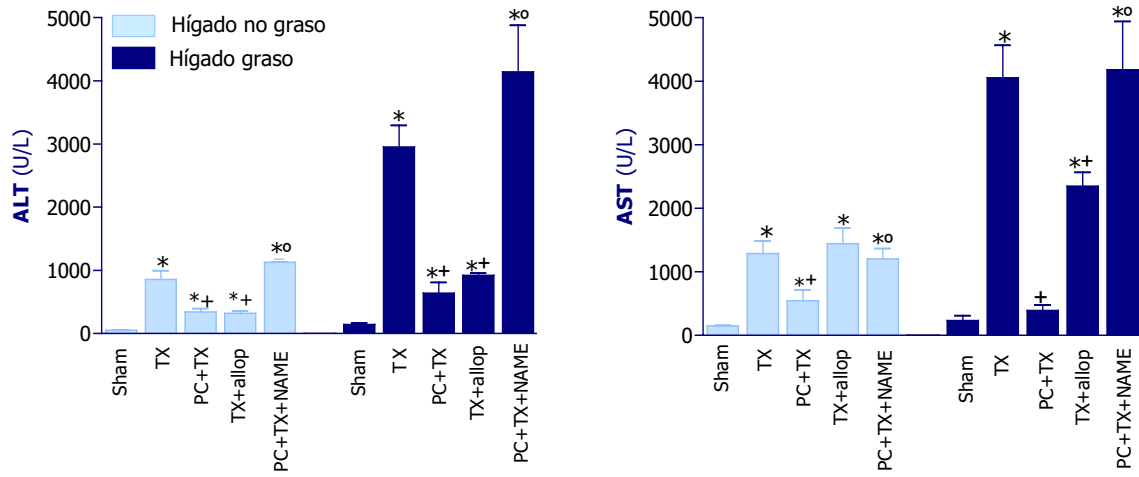


Figura 33. Actividad plasmática de las transaminasas ALT y AST tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

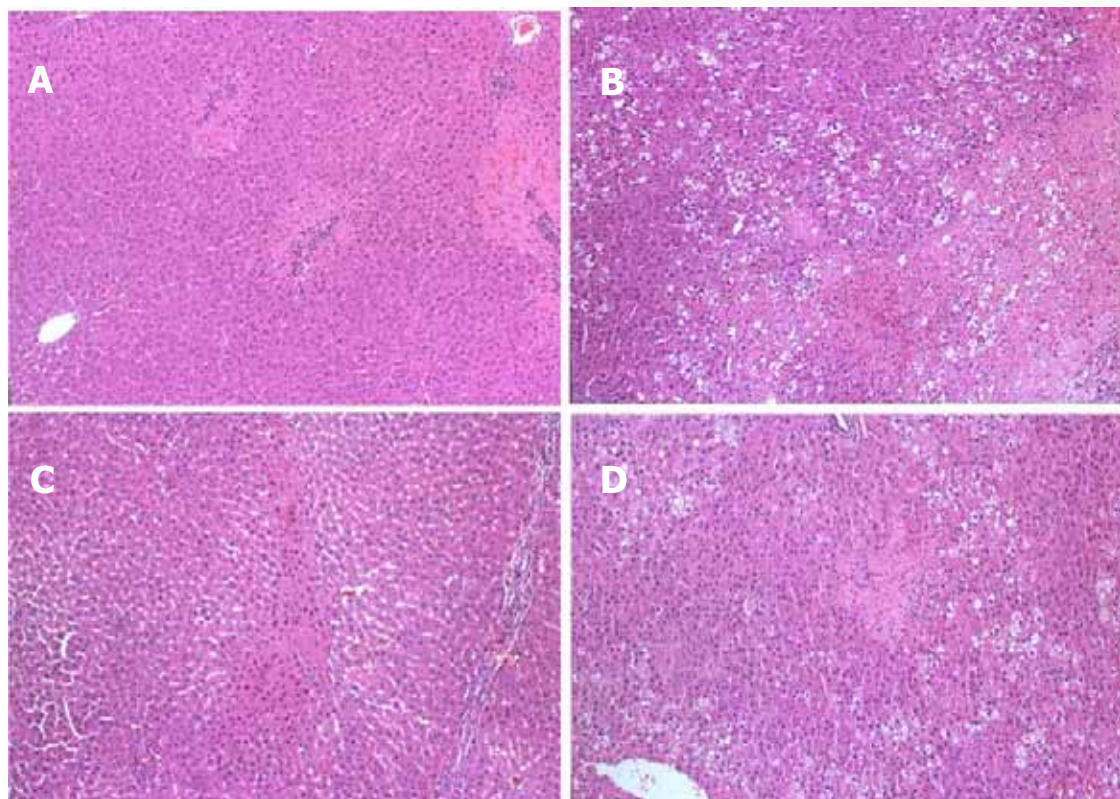


Figura 34. Lesiones histológicas en el hígado tras el trasplante con o sin previo PC isquémico. (A) TX hígado no graso. (B) TX hígado graso. (C) PC+TX hígado no graso. (D) PC+TX hígado graso. (Hematoxilina-Eosina, aumento original x214).

La evaluación de la presencia de células apoptóticas en el tejido hepático de ambos tipos de injertos tras el trasplante (TX) mediante la técnica TUNEL reveló la ausencia de hepatocitos TUNEL-positivos (tinción marrón) en ambos casos (Figura 35). Los mismos resultados se obtuvieron cuando se aplicó el PC isquémico (PC+TX) o se administró NAME (PC+TX+NAME). La determinación de la actividad hepática de caspasa-3 tras el trasplante de ambos tipos de hígados con (PC+TX) o sin previo PC isquémico (TX), mostró niveles basales de actividad en todos los grupos. La inhibición del NO durante el PC isquémico (PC+TX+NAME) no modificó estos resultados (Figura 36).

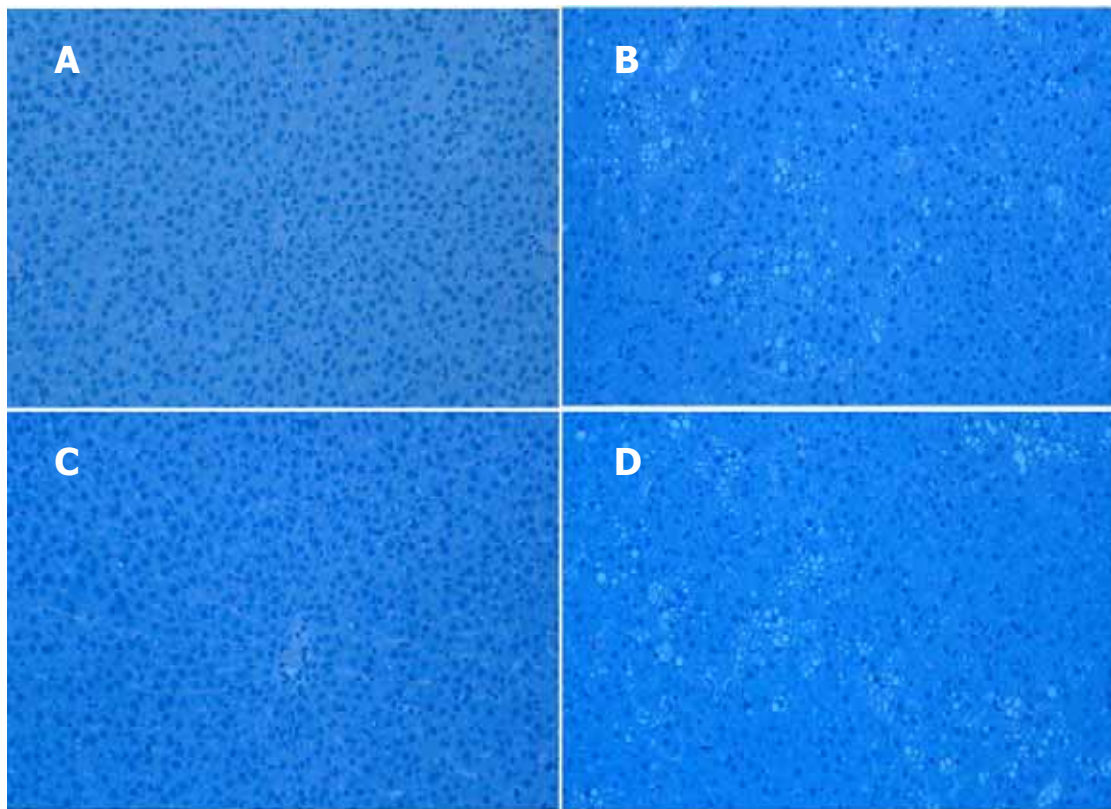


Figura 35. Identificación de células apoptóticas por TUNEL. (A) TX hígado no graso. (B) TX hígado graso. (C) PC isquémico hígado no graso. (D) PC isquémico hígado graso.

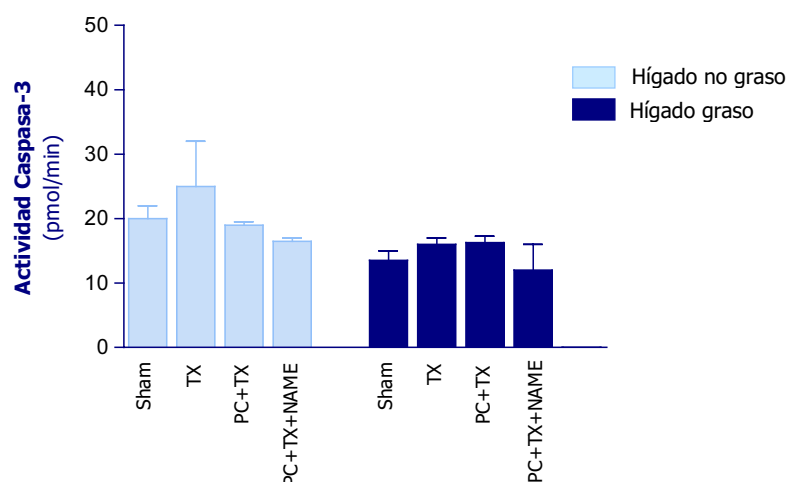


Figura 36. Actividad hepática de la Caspasa-3 tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

2. EFECTO DEL PC ISQUÉMICO SOBRE LA LESIÓN PULMONAR ASOCIADA AL TRASPLANTE DE HÍGADOS ESTEATÓSICOS

Para valorar la lesión pulmonar asociada al trasplante hepático se determinaron los niveles de MDA y la actividad de la MPO en el pulmón, y se realizó el estudio histológico del tejido pulmonar.

El trasplante (TX) de hígados esteatósicos tuvo como consecuencia un marcado aumento de la actividad de la MPO y de los niveles de MDA en el tejido pulmonar, siendo estos aumentos superiores a los observados cuando el trasplante se realizó con injertos no esteatósicos (Figura 37). Los efectos beneficiosos del PC isquémico (PC+TX) sobre la lesión hepática se observaron también sobre la lesión pulmonar. El PC isquémico redujo la acumulación de neutrófilos y la peroxidación lipídica en el tejido pulmonar tras el trasplante de ambos tipos de hígados. La inhibición de la XOD con alopurinol (TX+allop) en el trasplante de hígados no grasos no previno los aumentos en la actividad de la MPO y de los niveles de MDA en el tejido pulmonar. Sin embargo, la administración de alopurinol en el trasplante de hígados esteatósicos sí que redujo la peroxidación lipídica y la acumulación de neutrófilos en el tejido pulmonar. La inhibición de la síntesis de NO durante el PC isquémico (PC+TX+NAME) eliminó los efectos beneficiosos del PC isquémico a nivel de peroxidación lipídica y acumulación de neutrófilos en el pulmón, lo que sugiere la implicación del NO en los efectos beneficiosos del PC isquémico frente a la lesión pulmonar (Figura 37).

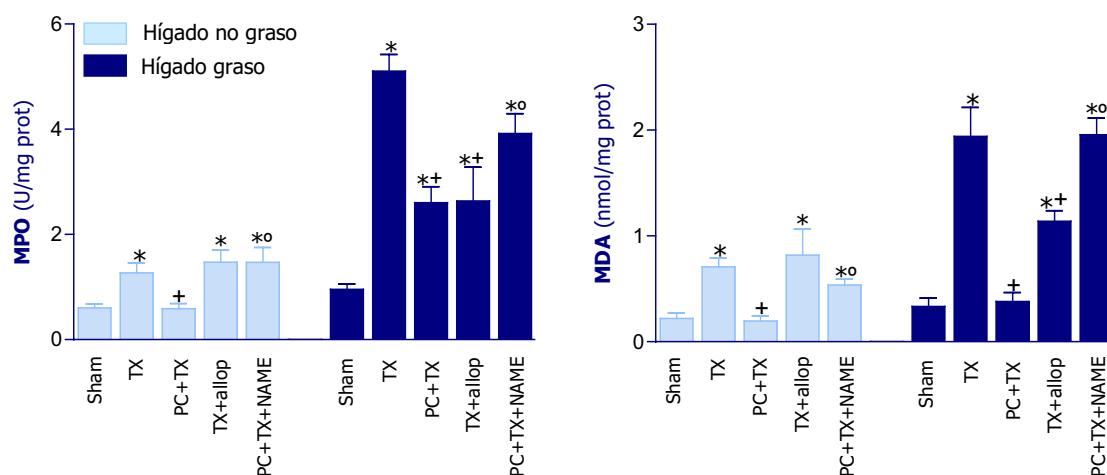


Figura 37 . Actividad de la MPO y niveles de MDA en el tejido pulmonar tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

Tras el trasplante (TX) de hígados no grasos, el estudio histológico del pulmón mostró la acumulación de neutrófilos en los vasos y un ligero engrosamiento de los septos alveolares con infiltración de neutrófilos en los mismos (Figura 38A); sin embargo, tras el trasplante de hígados esteatósicos se observó en el pulmón una mayor acumulación y adhesión de neutrófilos al

endotelio vascular, un aumento de la presencia de células y un engrosamiento de moderado a intenso de las paredes de los alveolos (Figura 38B). La aplicación del PC isquémico (PC+TX) redujo las alteraciones pulmonares tras el trasplante hepático de ambos tipos de hígados. El grupo de trasplante de hígados no grasos preconditionado no presentó lesión aparente a nivel del pulmón, mientras que el pulmón del grupo de trasplante de hígado esteatósico preconditionado mostró acumulación de neutrófilos en los vasos y un ligero engrosamiento de las paredes alveolares con infiltración de neutrófilos (Figuras 38C-38D). Los cambios histológicos en el pulmón inducidos por la administración de NAME o alopurinol corroboraron los obtenidos en el análisis bioquímico. De modo, que las alteraciones pulmonares histológicas observadas al inhibir las síntesis de NO durante el PC isquémico (PC+TX+NAME) fueron similares a las observadas en el pulmón tras el trasplante (TX) de ambos tipos de hígados; mientras que las observados en el pulmón al inhibir la XOD (TX+allop) fueron similares a los observados en el grupo preconditionado.

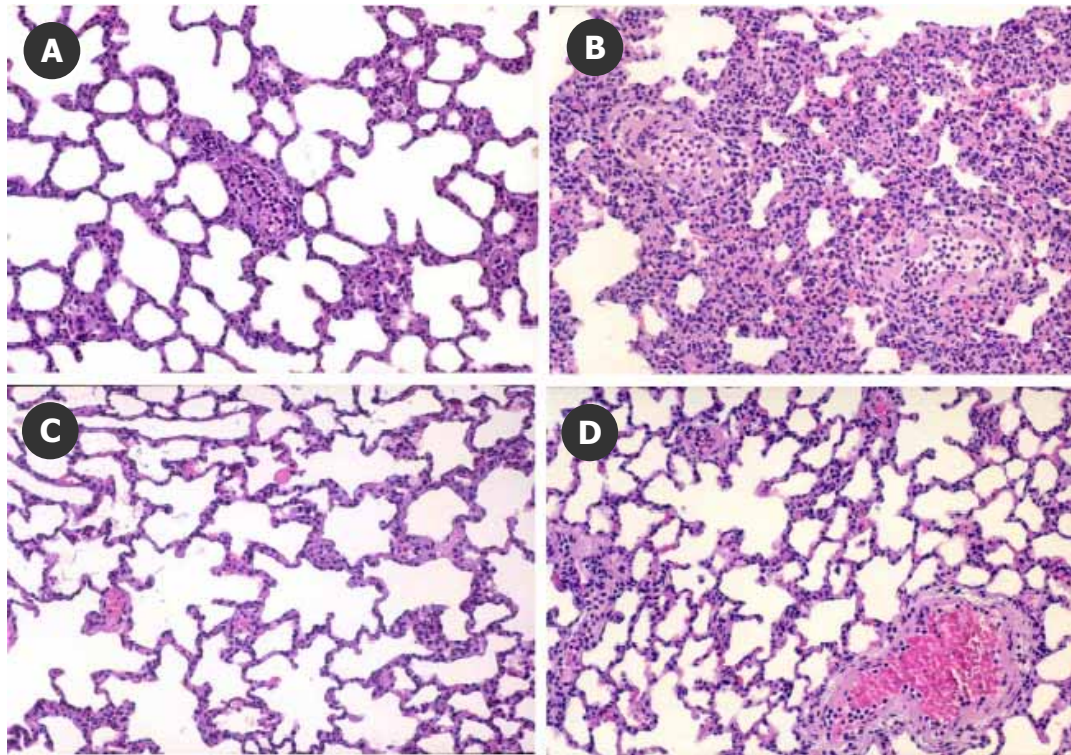


Figura 38. Lesiones histológicas en el pulmón tras el trasplante con o sin previo PC isquémico. (A) TX (hígado no graso). (B) TX (hígado graso). (C) PC+TX (hígado no graso). (D) PC+TX (hígado graso). (Hematoxilina-Eosina, aumento original x214).

3. EFECTO DEL PC ISQUÉMICO SOBRE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA MENOR TOLERANCIA DE LOS HÍGADOS ESTEATÓSICOS A LA LESIÓN DE I/R.

3.1 Alteraciones de la microcirculación hepática

Tras el trasplante (TX) de ambos tipos de injertos se observó una marcada reducción del flujo sanguíneo hepático (medido por efecto Doppler) con respecto a los valores del grupo sham, siendo esta reducción muy semejante en ambos tipos de injertos. Ni la aplicación del PC isquémico (PC+TX) ni la inhibición de la síntesis de NO durante el PC isquémico (PC+TX+NAME) modificó el flujo sanguíneo hepático en ambos tipos de hígados, presentando ambos grupos valores semejantes a los observados en el grupo trasplante (Figura 39). Estos resultados se confirmaron con los valores del flujo sanguíneo portal obtenidos (Figura 39).

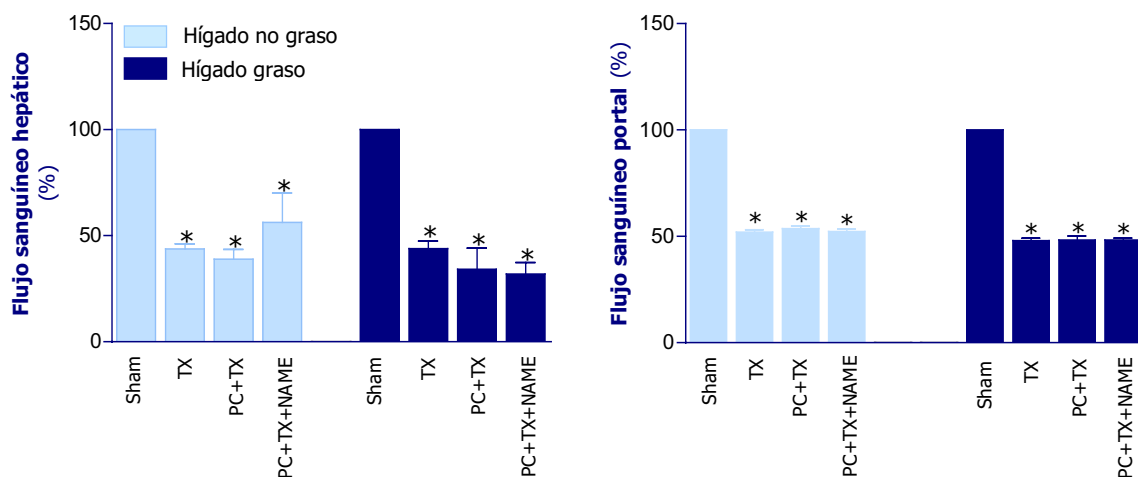


Figura 39. Flujo sanguíneo hepático y portal tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

3.2 Infiltración de neutrófilos en el tejido hepático

Ambos tipos de injertos presentaron tras el trasplante un aumento similar de la actividad de la MPO, con respecto a la observada en el grupo sham. La aplicación del PC isquémico (PC+TX) redujo el aumento de la actividad de la MPO tanto en los hígados grasos como en los hígados no grasos. Por contra, la inhibición de la síntesis de NO durante el PC isquémico (PC+TX+NAME) eliminó los efectos beneficiosos del PC isquémico sobre la actividad de la MPO (Figura 40). Estos resultados sugieren la posible implicación del NO en los efectos beneficiosos del PC isquémico sobre la acumulación de neutrófilos tras la I/R asociada al trasplante hepático.

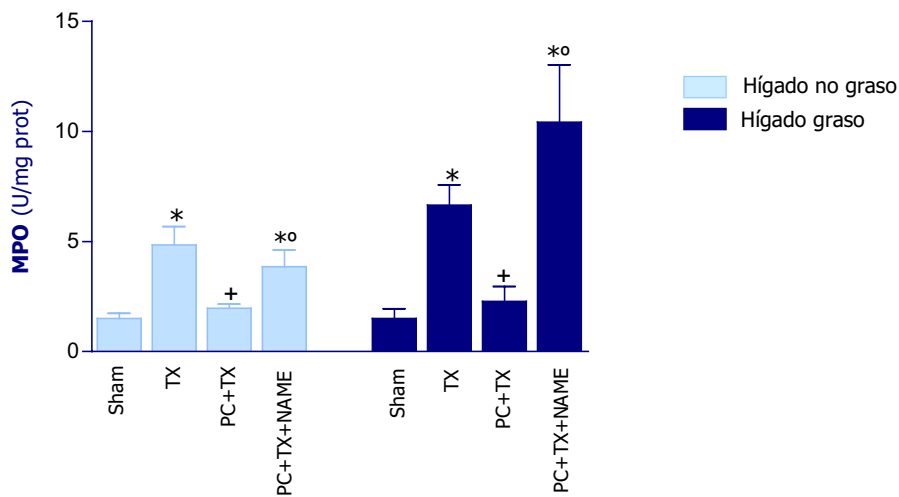


Figura 40. Actividad hepática de la MPO tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

3.3 Niveles de TNF- α

Tras el trasplante (TX) de ambos tipos de hígados se observó un aumento en los niveles plasmáticos de TNF- α con respecto al grupo sham, siendo este aumento similar en ambos tipos de hígados. La aplicación del PC isquémico (PC+TX) en el trasplante de hígados no grasos previno el aumento de los niveles de TNF- α ; y la inhibición de la síntesis de NO durante el PC isquémico (PC+TX+NAME) en este mismo tipo de hígados eliminó los efectos beneficiosos del PC isquémico sobre los niveles de TNF- α . Sin embargo, ni la aplicación del PC isquémico ni la administración de NAME modificó la liberación de TNF- α en el trasplante de los hígados esteatósicos (Figura 41).

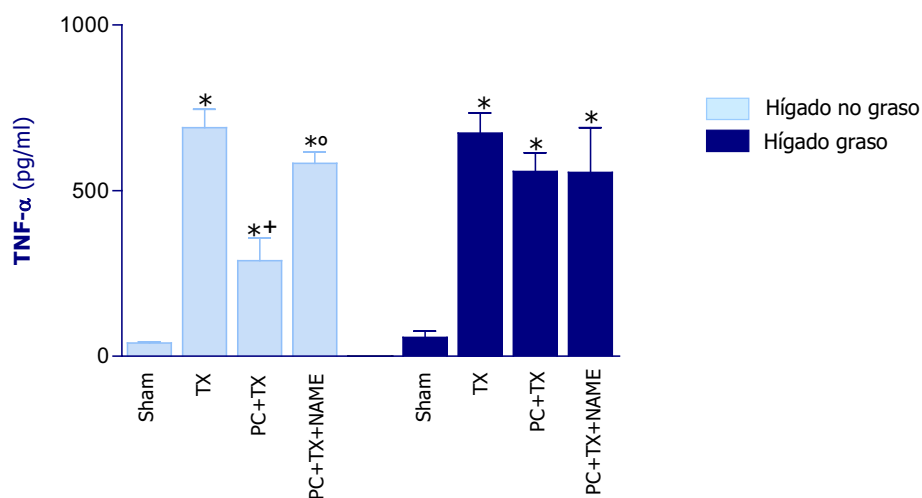


Figura 41. Niveles plasmáticos de TNF- α tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

3.4 Lesión por estrés oxidativo

3.4.1 Antioxidantes: glutation, SOD

- Niveles de Glutation: Tras el trasplante (TX) de ambos tipos de injertos se produjo una disminución de los niveles hepáticos de GSH con respecto al grupo sham, siendo esta disminución similar en ambos tipos de hígados. La aplicación del PC isquémico (TX+PC) previno la disminución de los niveles de glutacion; mientras que la inhibición de la síntesis de NO durante el PC isquémico (PC+TX+NAME) eliminó los efectos beneficiosos del PC isquémico sobre los niveles de GSH (Figura 42). Estos resultados sugieren la posible implicación del NO en la preservación de los niveles de GSH producida por el PC isquémico en el trasplante hepático.

- Actividad de la SOD: Tras el trasplante (TX) de ambos tipos de hígados se observó una disminución de la actividad de la SOD con respecto a la observada en el grupo sham. Ni aplicación del PC isquémico (PC+TX) ni la administración de NAME (PC+TX+NAME) tuvieron ningún efecto sobre la actividad de la SOD observada tras el trasplante de ambos tipos de injertos, presentando ambos grupos valores semejantes a los observados en el grupo trasplante (Figura 42).

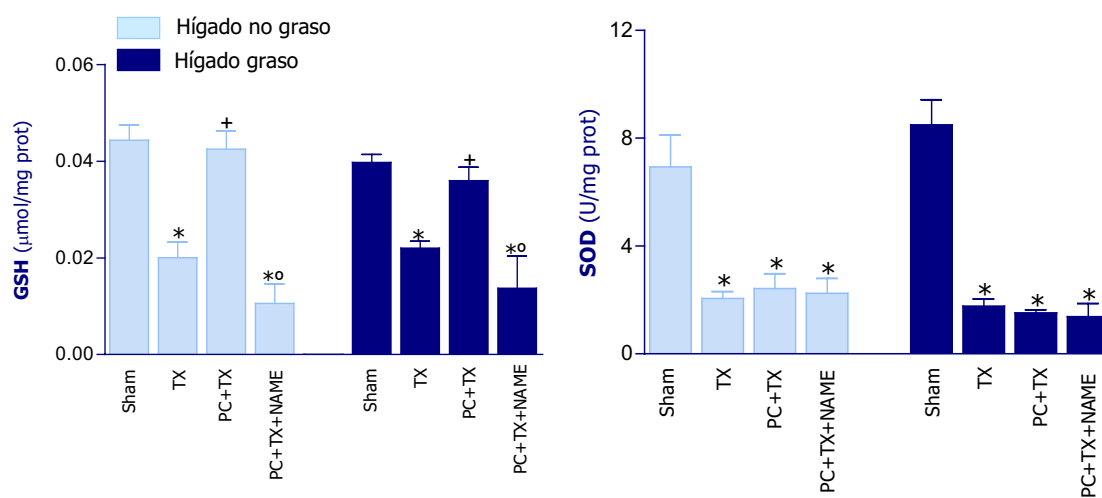


Figura 42. Niveles hepáticos de GSH y actividad hepática de la SOD tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

3.4.2 Sistema xantina/ XOD

- Actividad total XDH+XOD: Tras la preservación fría (I) de 6 h se observó que la actividad total XDH+XOD presentaba unos valores semejantes a los del grupo sham en ambos tipos de injertos. Sin embargo, la actividad de la forma productora de RLO, la XOD, tras la isquemia fría era mayor en ambos tipos de injertos que la observada en el grupo control. Estos resultados indican que durante la preservación fría se produce la conversión de la XDH a su forma XOD. La actividad de la XOD fue aproximadamente un 87% de la actividad total en los hígados

esteatósicos, mientras que fue de un 46% en los hígados no grasos, lo que indica un mayor grado de conversión de la XDH a XOD en la preservación de los hígados esteatósicos. La aplicación del PC isquémico (PC+I) previno la conversión de XDH a XOD hasta los niveles observados en el grupo control; mientras que la inhibición de la síntesis de NO durante el PC isquémico (PC+TX+NAME) eliminó los efectos beneficiosos del PC isquémico a este nivel en ambos tipos de hígados (Figura 43). Estos resultados sugieren la posible implicación del NO en los efectos beneficiosos del PC isquémico sobre el sistema generador de RLO XDH/XOD.

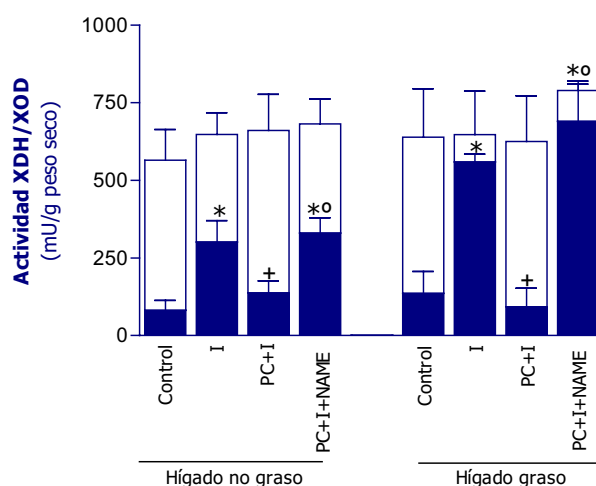


Figura 43. Actividad hepática de la XDH/XOD en los hígados grasos y no grasos tras la isquemia fría.

- **Acumulación de xantina:** Tras la preservación fría (I) de 6 h se produjo la acumulación de la xantina en ambos tipos de injertos, siendo ésta superior en los hígados esteatósicos. La aplicación del PC isquémico (PC+I) redujo la acumulación de xantina durante la isquemia; mientras que la inhibición de la síntesis de NO (PC+I+NAME) no modificó los efectos del PC isquémico sobre la acumulación de xantina en ambos tipos de injertos, sugiriendo que los efectos del PC isquémico a este nivel no están mediados por el NO (Figura 44).

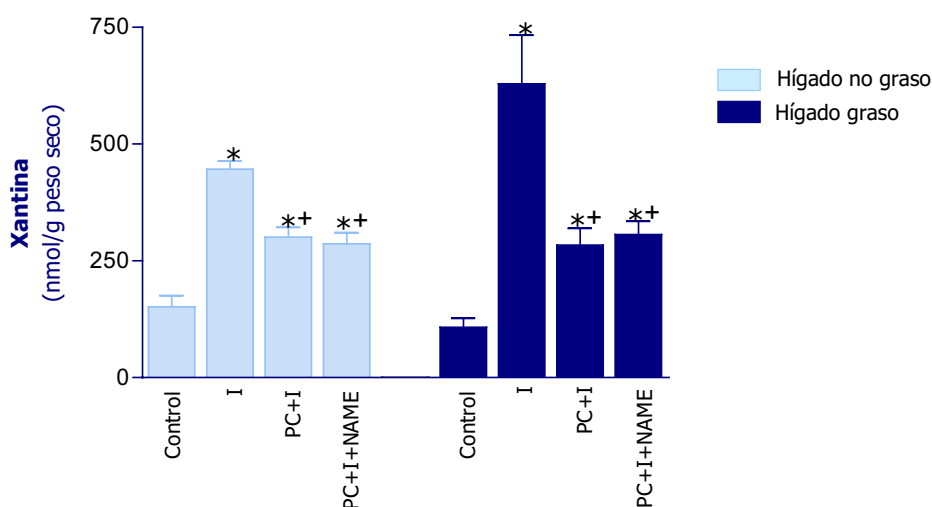


Figura 44. Actividad hepática de la XOD en los hígados grasos y no grasos tras la isquemia fría.

3.4.3 Peroxidación lipídica: MDA

El trasplante (TX) de hígados grasos tuvo como consecuencia un marcado aumento de los niveles de MDA con respecto al grupo sham. Este aumento fue muy superior al observado tras el trasplante de hígados no grasos. La aplicación del PC isquémico (PC+TX) o la administración de alopurinol (TX+allop) previno el aumento de los niveles de MDA tras el trasplante en ambos tipos de injertos; mientras que la inhibición de la síntesis de NO (PC+TX+NAME) eliminó los efectos beneficiosos del PC isquémico en ambos tipos de hígados (Figura 45). Estos resultados sugieren la posible implicación del NO en los efectos beneficiosos del PC isquémico sobre la peroxidación lipídica.

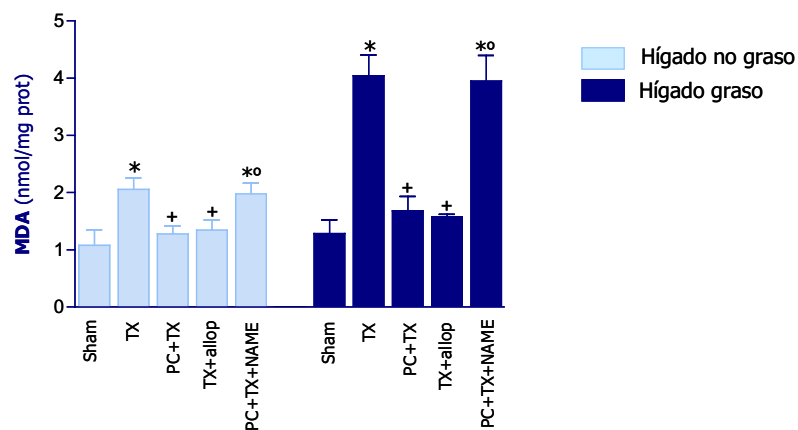


Figura 45 . Niveles hepáticos de MDA tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

4. IMPLICACIÓN DE LA AMPK EN LA LESIÓN HEPÁTICA DE I/R ASOCIADA AL TRASPLANTE DE HÍGADOS ESTEATÓSICOS

Se evaluó el papel de la AMPK sobre la lesión hepática mediante la determinación de los niveles plasmáticos de transaminasas y el estudio histológico del tejido hepático.

La activación de la AMPK en el trasplante de ambos tipos de injertos (TX+AICAR) mimetizó los efectos beneficiosos del PC isquémico sobre los niveles de transaminasas evitando su aumento tras el trasplante, mientras que su inhibición (PC+TX+araA) eliminó los efectos beneficiosos del PC isquémico sobre la lesión hepática (Figura 50). Los cambios histológicos observados por la activación e inhibición de la AMPK en el trasplante de ambos tipos de injertos confirmaron los resultados bioquímicos. La activación de la AMPK (TX+AICAR) dio lugar a lesiones histológicas comparables a las observadas tras la aplicación del PC isquémico (TX+PC), reduciendo en número y extensión las áreas de necrosis observadas tras el trasplante de ambos tipos de hígados (Figuras 46E-46F); mientras que la inhibición de la AMPK (PC+TX+araA) dio lugar a lesiones histológicas comparables a las obtenidas tras el trasplante de ambos tipos de hígados (Figuras 46G-46H). Estos resultados sugieren la implicación de la AMPK en los efectos protectores del PC isquémico (PC+TX) sobre la lesión hepática asociada al trasplante de hígados grasos.

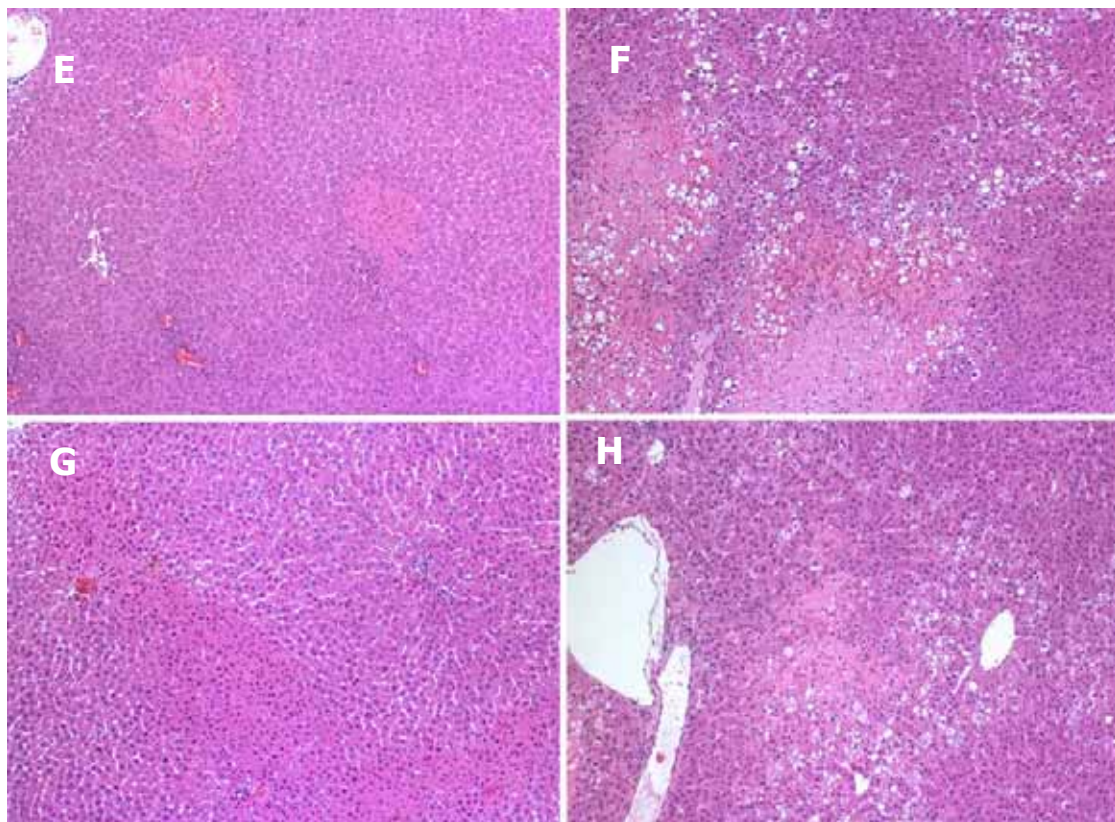


Figura 46. Lesiones histológicas en el hígado tras el trasplante con o sin activación de la AMPK. (E) TX+AICAR hígado no graso. (F) TX+AICAR hígado graso. (G) PC+TX+araA hígado no graso. (H) PC+TX+araA hígado graso.

5. RELACIÓN ENTRE AMPK Y NO

Tanto la inducción del PC isquémico (PC) como el tratamiento con AICAR (AICAR) en un grupo sham aumentó la producción de NO, tal como muestran los valores de nitrato/nitrito (Figura 47), y aumentó la actividad de la AMPK en ambos tipos de hígados (Figura 48); mientras que la inhibición de la AMPK durante el PC isquémico (PC+araA) en ambos tipos de hígados redujo la producción de NO. Estos resultados sugieren que la activación de la AMPK durante el PC isquémico tiene como consecuencia la producción de NO.

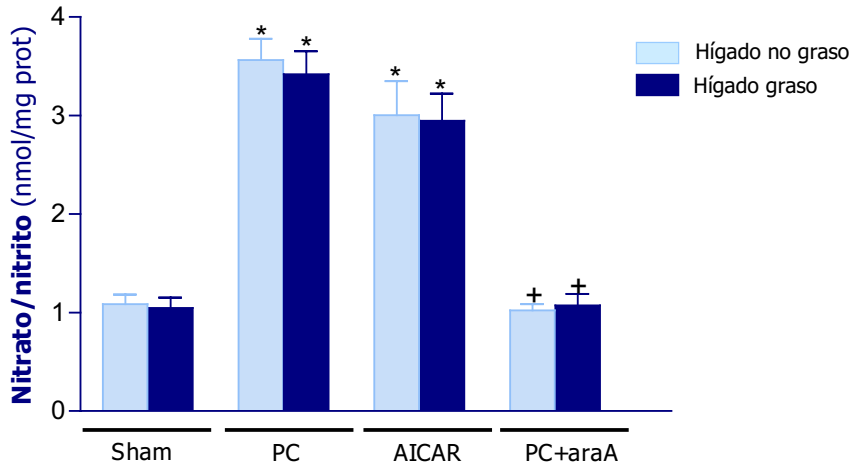


Figura 47. Producción de NO, medida a través de los niveles de nitrato/nitrito inmediatamente después del PC isquémico, el tratamiento con AICAR o con araA.

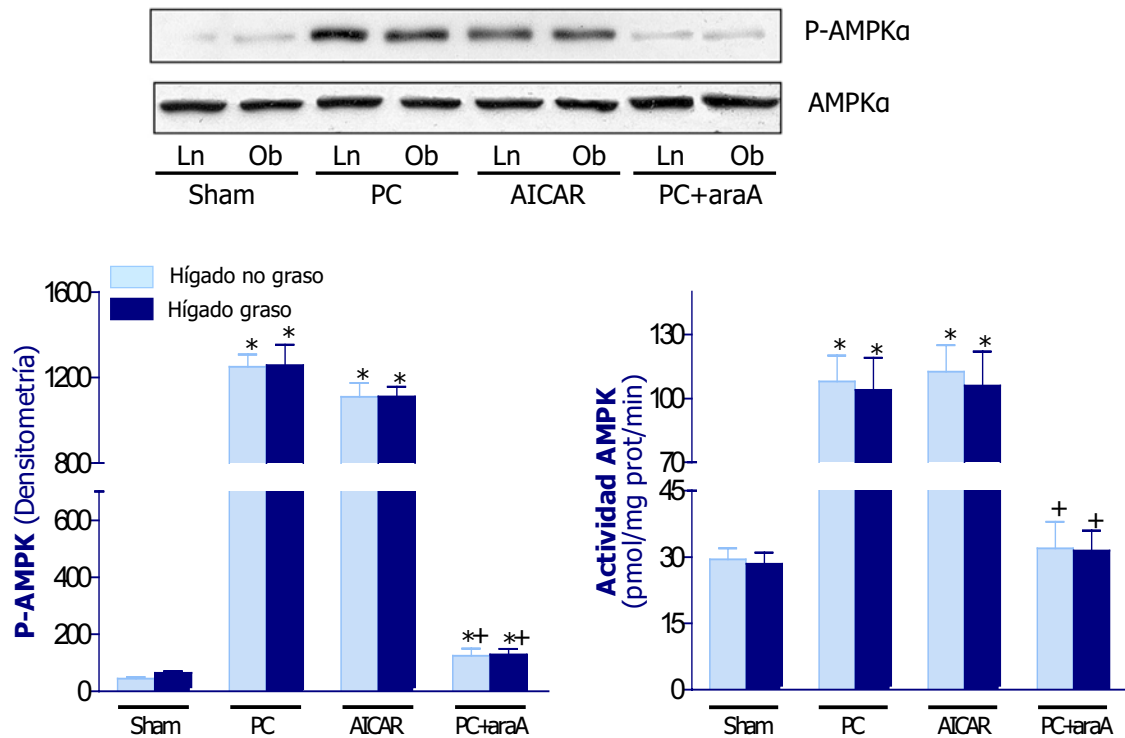


Figura 48. Western Blots representativos de la forma fosforilada y total de la AMPK en la parte superior. Análisis densitométrico de la P-AMPK y actividad hepática de la AMPK en la parte inferior.

En anteriores trabajos se observó que el NO formado durante el PC isquémico se originaba a partir de la forma constitutiva de la NOS (*Peralta y cols. 1996; Serafin y cols. 2004*). Los resultados obtenidos tras la determinación de la actividad de la cNOS y la cuantificación de ambas proteínas, cNOS e iNOS, en estos grupos confirmaron esta observación. Tanto la inducción del PC isquémico (PC) como el tratamiento con AICAR (AICAR) produjo un aumento de la expresión y la actividad de la cNOS, mientras no produjo cambios en la expresión de iNOS (Figura 49). Estos resultados además sugieren que el NO formado tras la activación de la AMPK se origina a partir de la forma constitutiva de la NOS.

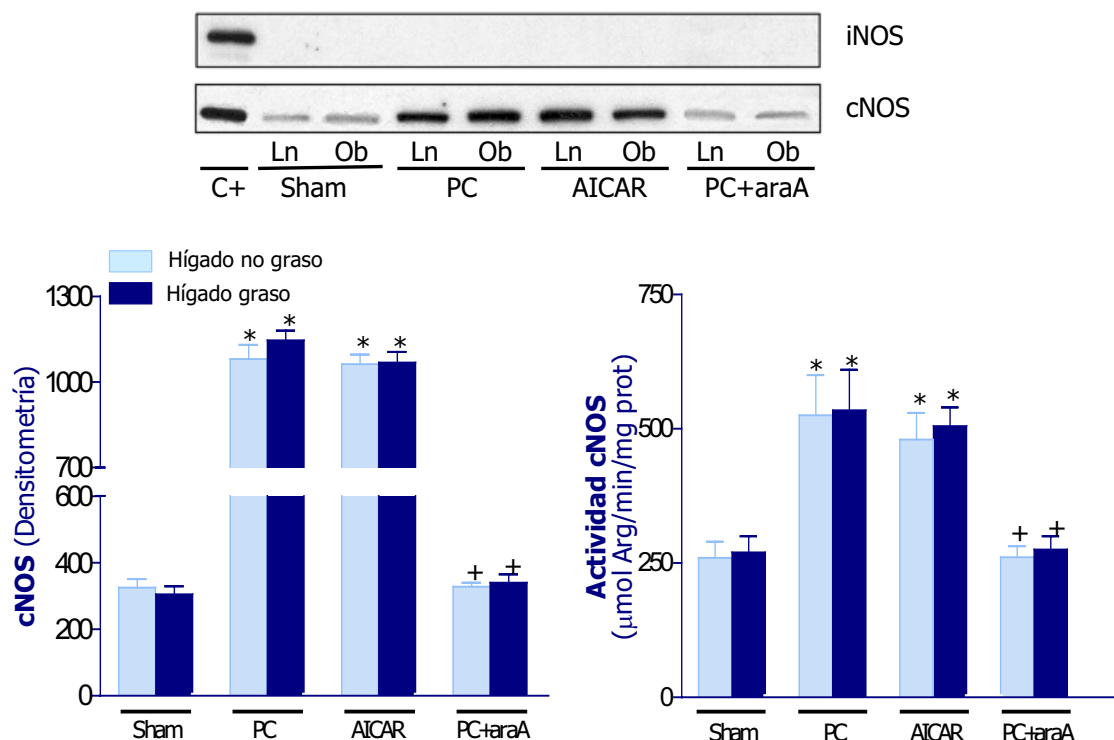


Figura 49. Western Blots representivos de la forma fosforilada y total de la AMPK en la parte superior. Análisis densitométrico de la P-AMPK y actividad hepática de la AMPK en la parte inferior.

Los resultados obtenidos indican que la activación de la AMPK induce la síntesis NO (Figuras 47 y 49), y que tanto la AMPK (Figuras 46 y 50) como el NO (Figura 33) parecen estar implicados en los efectos protectores del PC isquémico sobre la lesión hepática asociada al trasplante de hígados grasos. Para comprobar si los efectos beneficiosos de la activación de la AMPK sobre la lesión hepática eran mediados por el NO, se inhibió la síntesis de NO en el grupo de trasplante tratado con AICAR, el activador de la AMPK (PC+AICAR+NAME). Tras el trasplante de ambos tipos de hígados tratados de esta forma (PC+AICAR+NAME), se observó que la inhibición de la síntesis de NO eliminó los efectos beneficiosos del tratamiento con AICAR sobre la lesión hepática, sugiriendo que la activación de la AMPK, induciendo la síntesis de NO, protege frente a la lesión de I/R asociada al trasplante de ambos tipos de hígados.

En base a estos hechos, estudiamos los posibles beneficios que podía tener la administración de donadores de NO sobre la lesión de I/R asociada al trasplante hepático de hígados esteatósicos y no grasos. En el grupo de trasplante de hígados no grasos a los que se administró el donador de NO spermineNONOato (TX+NO) se observó una disminución de la lesión hepática tras el trasplante. Sin embargo, en el grupo de trasplante de los hígados esteatósicos, la administración de NO a las mismas dosis que en el grupo anterior (TX+NO), resultó ser perjudicial, dando lugar a niveles de transaminasas marcadamente superiores a los observados en el grupo de trasplante de este tipo de hígados (TX) (Figura 50).

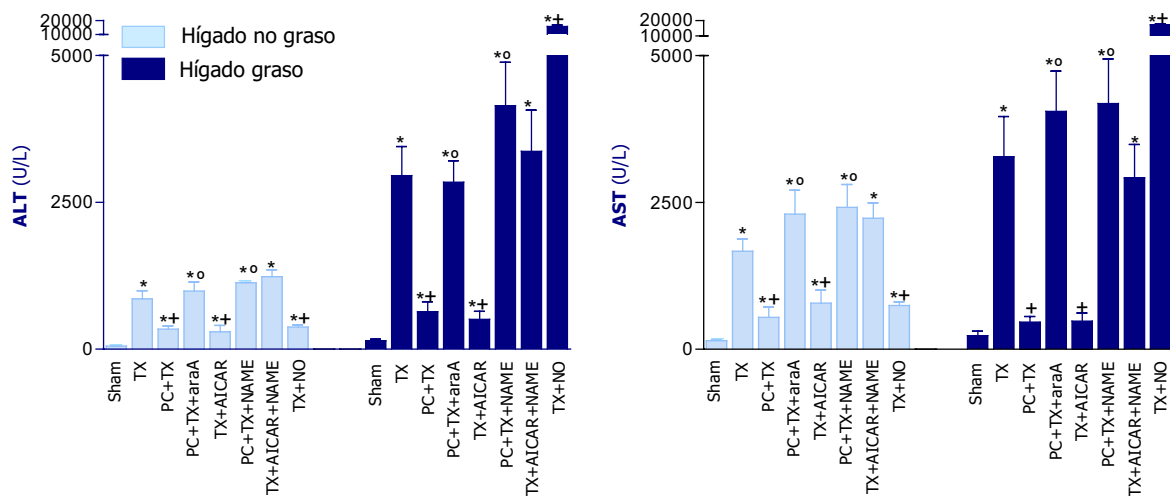


Figura 50. Actividad plasmática de las transaminasas ALT y AST tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

Los cambios histológicos observados en los grupos tratados con spermine NONOato corroboran los datos bioquímicos. La evaluación de la severidad de la lesión hepática en los cortes histológicos por determinación del porcentaje de necrosis de grado 3 en los mismos, mostró lesiones severas en el tejido hepático tras la administración de spermine NONOato en el trasplante de hígados grasos (Figura 51)

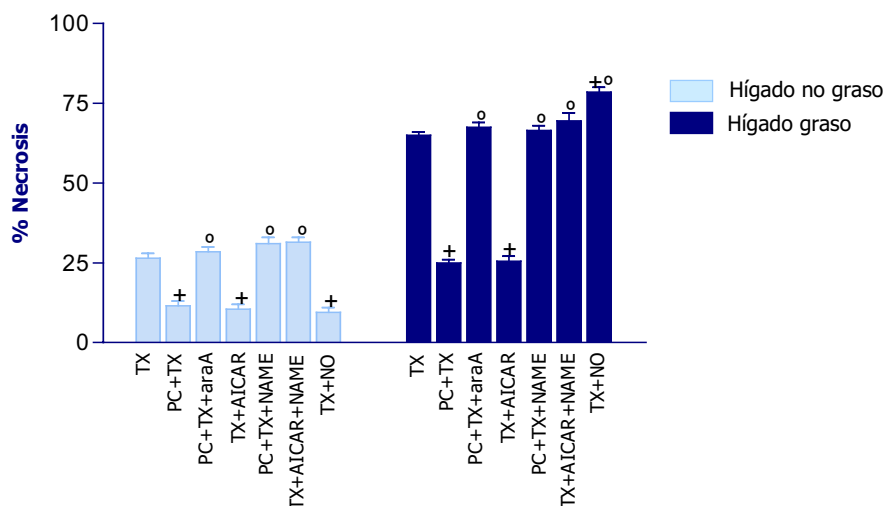


Figura 51. Porcentaje de necrosis de grado 3 tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

6. EFECTOS DE LA AMPK SOBRE LOS NIVELES DE ATP Y DE NUCLEÓTIDOS DE ADENINA EN EL TRASPLANTE DE HÍGADOS ESTEATÓSICOS

Tras el trasplante (TX) de ambos tipos de injertos se observó una marcada disminución de los niveles de ATP y de nucleótidos de adenina (ATP+ADP+AMP) con respecto a los niveles del grupo sham, encontrándose niveles semejantes de ambos parámetros en hígados grasos y no grasos tras el trasplante. Ni la aplicación del PC isquémico (PC+TX), ni la modulación de la síntesis de NO o de la actividad del enzima AMPK modificó estos resultados (Figura 52).

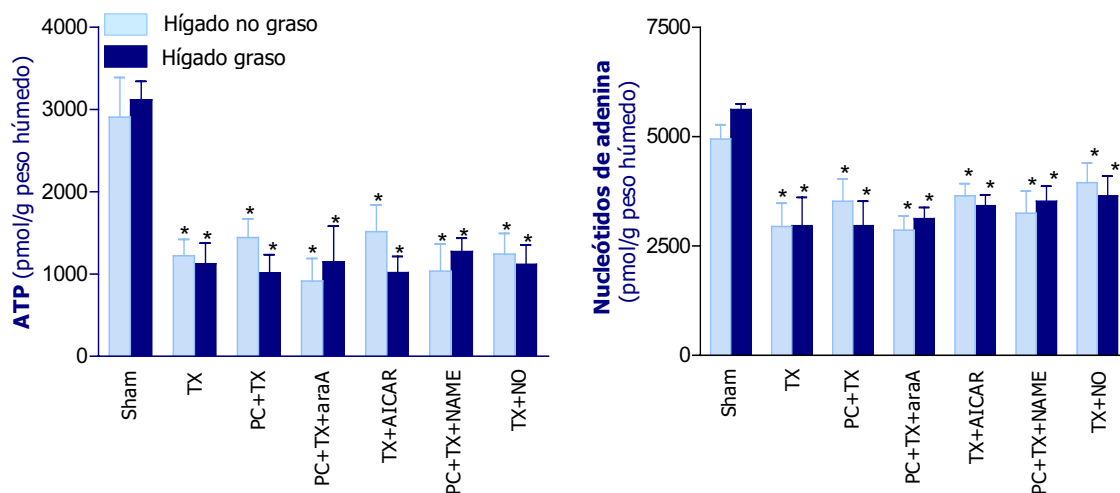


Figura 52 . Niveles de ATP y de nucleótidos de adenina tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

Los niveles de ATP y nucleótidos de adenina también fueron determinados en todos los grupos tras 6 h de isquemia fría obteniéndose un patrón semejante al encontrado tras el trasplante.

Estos resultados indican que los efectos protectores del PC isquémico sobre la lesión hepática no son debidos a un efecto beneficioso sobre el metabolismo energético.

7. EFECTOS DE LA AMPK Y EL NO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL TRASPLANTE DE HÍGADOS ESTEATÓSICOS

7.1 Peroxidación lipídica (MDA)

Tras el trasplante (TX) de ambos tipos de hígados se produjo un aumento de los niveles de MDA con respecto al grupo sham, siendo este aumento muy superior en los hígados esteatósicos. La aplicación del PC isquémico (PC+TX) y el tratamiento con AICAR (TX+AICAR) redujo la peroxidación lipídica tras el trasplante, mientras que la inhibición de la síntesis de NO (PC+TX+NAME) o la inhibición de la AMPK durante el PC isquémico (PC+TX+araA) eliminó los efectos beneficiosos del PC isquémico a este nivel en ambos tipos de hígados (Figura 53).

La administración de NO (TX+NO) en el grupo de trasplante de hígados no grasos simuló los efectos beneficiosos del PC isquémico sobre los niveles de MDA, reduciendo su aumento, mientras que la administración de NO (TX+NO) en el grupo de trasplante de hígados esteatósicos dio lugar a niveles de MDA muy superiores a los obtenidos tras el trasplante de este tipo de hígados (Figura 53).

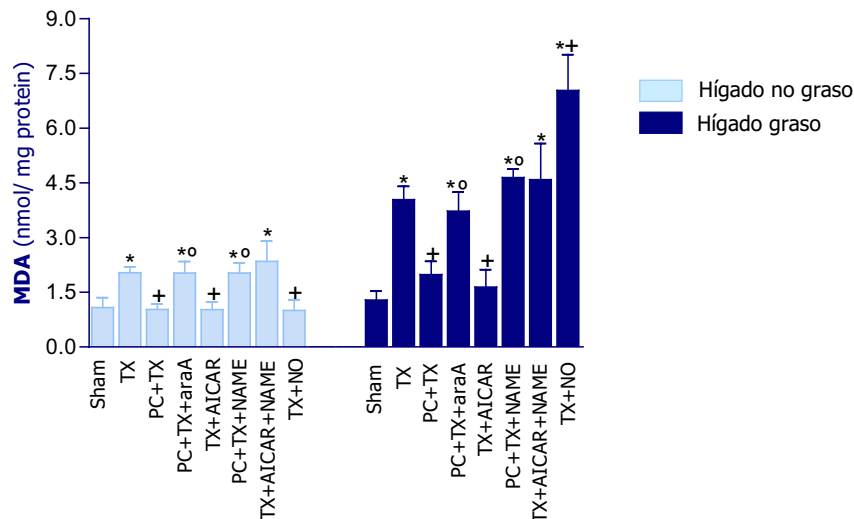


Figura 53. Niveles hepáticos de MDA tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

7.2 Niveles de nitrotirosinas

Los niveles de nitrotirosinas observados tras el trasplante (TX) de hígados no grasos fueron similares a los observados en el grupo sham. Ni la aplicación del PC isquémico (PC+TX), ni la modulación de la síntesis de NO o la actividad de la AMPK produjo ninguna variación en los niveles de nitrotirosinas (Figura 54). Sin embargo, el trasplante (TX) de hígados esteatósicos dio lugar a un marcado aumento de los niveles de nitrotirosinas con respecto a los observados en el grupo sham, lo que indicó la formación de peroxinitrito durante el trasplante de este tipo de hígados. Tanto la aplicación del PC isquémico (PC+TX) así como la activación de la AMPK (TX+AICAR) redujo el aumento de los niveles de nitrotirosinas en los hígados grasos, mientras que la inhibición de la síntesis de NO (PC+TX+NAME) o la inhibición de la AMPK durante el PC isquémico (PC+TX+araA), eliminó los efectos beneficiosos del PC isquémico sobre la formación de nitrotirosinas. Como era de esperar, la administración de NO (TX+NO) dio lugar a niveles de nitrotirosinas muy superiores a los encontrados tras el trasplante (Figura 54).

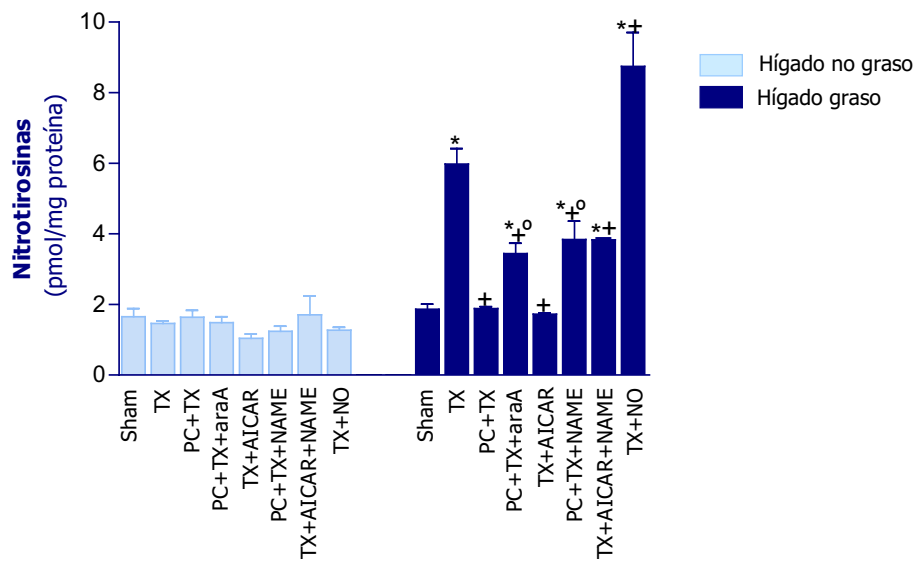


Figura 54. Niveles hepáticos de nitrotirosinas tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

El análisis inmunohistoquímico de nitrotirosinas confirmó estos resultados. En los hígados no grasos no se observó tinción de nitrotirosinas en ninguno de los grupos TX, PC+TX y TX+NO. Por el contrario, tras el trasplante de hígados grasos (TX) se observó tinción de nitrotirosinas. Ésta se redujo con la aplicación del PC isquémico (PC+TX). La administración de NO (TX+NO) aumentó los niveles de nitrotirosinas con respecto al grupo trasplante (Figuras 55 y 56).

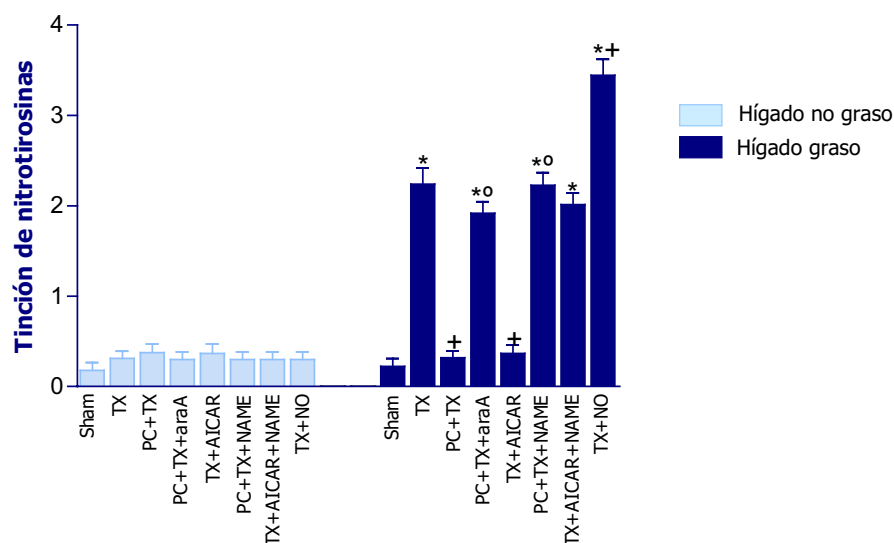


Figura 55. Grado de tinción de nitrotirosinas tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

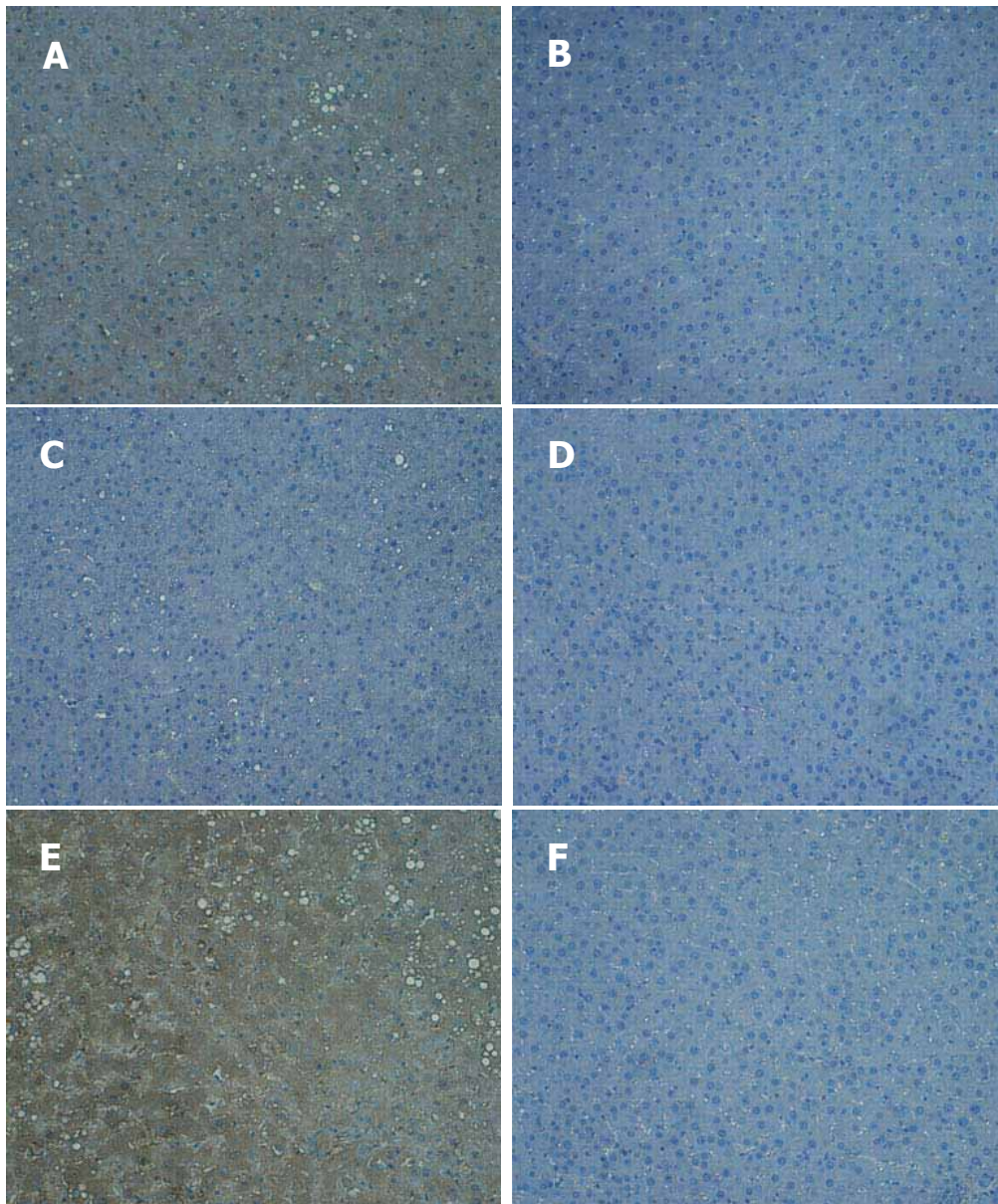


Figura 56. Detección inmunohistoquímica de nitrotirosinas. (A) TX hígado graso. (B) TX hígado no graso. (C) PC+TX hígado graso. (D) PC+TX hígado no graso. (E) TX+NO hígado graso. (F) TX+NO hígado no graso (aumento original x214).

V. DISCUSIÓN

1. EFECTO DEL PC ISQUÉMICO SOBRE LA LESIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR LA I/R ASOCIADA AL TRASPLANTE DE HÍGADOS ESTEATÓSICOS.

De acuerdo con los resultados obtenidos en otros estudios de I/R hepática, en este trabajo se observó que los hígados grasos son más vulnerables a la lesión de I/R. Tras el trasplante de los hígados esteatósicos se observaron mayores niveles plasmáticos de transaminasas, y un mayor número y extensión de áreas de necrosis coagulativa en comparación con los observados tras el trasplante de hígados no grasos. La aplicación del PC isquémico redujo significativamente el daño hepático tras el trasplante en ambos tipos de hígados (Figuras 33 y 34), reduciendo tanto el aumento de los niveles de transaminasas como la extensión y número de las áreas de necrosis coagulativa. Al igual que en otro trabajo de trasplante hepático en hígados no grasos (Yin y cols. 1998) los beneficios del PC isquémico sobre la lesión hepática podrían estar mediados por el NO, ya que la administración de un inhibidor de su síntesis durante el PC isquémico anuló los efectos protectores del mismo sobre los parámetros bioquímicos e histológicos de lesión hepática (Figura 33).

Yagnik y cols. (Yagnik y cols. 2002), observaron que la inhibición de la síntesis del NO empeoró la lesión por preservación en el trasplante de hígados no grasos incrementando la muerte celular por necrosis y apoptosis. No obstante, en nuestro estudio la apoptosis no aparece como la forma predominante de muerte celular de hepatocitos tras la reperfusión ya que la determinación de la actividad hepática de caspasa-3 y el TUNEL no muestran evidencias de la presencia de células apoptóticas tras el trasplante de ambos tipos de injertos (Figuras 35 y 36). Los diferentes mecanismos de muerte celular observados tras el trasplante hepático pueden ser explicados por las diferencias en los modelos experimentales, y muy particularmente por los diferentes tiempos de isquemia fría aplicados ya que mientras en el modelo experimental de trasplante hepático utilizado por Yagnik y cols. los hígados fueron sometidos a 18 h de preservación fría antes de ser trasplantados, nosotros aplicamos tan solo 6 h de isquemia fría.

2. EFECTO DEL PC ISQUÉMICO SOBRE LA LESIÓN PULMONAR ASOCIADA AL TRASPLANTE DE HÍGADO ESTEATÓSICO

De acuerdo con los resultados obtenidos en otro estudio de PC isquémico en trasplante de hígado no graso (Fernández y cols. 2003), los efectos beneficiosos del PC isquémico no se limitaron al hígado. La aplicación del PC isquémico redujo el daño pulmonar en los receptores tras el trasplante de ambos tipos de injertos, reduciendo la acumulación de neutrófilos y la peroxidación lipídica en el tejido pulmonar (Figuras 37 y 38).

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que a los receptores a los que se implantaron los hígados esteatósicos sufrieron una mayor lesión pulmonar consecuencia del trasplante

hepático, presentando un mayor grado de lipoperoxidación y acumulación de neutrófilos en el tejido pulmonar.

3. EFECTO DEL PC ISQUÉMICO SOBRE LOS MECANISMOS RESPONSABLES DE LA MENOR TOLERANCIA DE LOS HÍGADOS ESTEATÓSICOS A LA LESIÓN DE I/R.

3.1 Alteraciones de la microcirculación hepática

Algunos autores postulan que la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos a la lesión de I/R en otros modelos experimentales de hígado graso es debida a las alteraciones que se producen a nivel de la microcirculación hepática (*Teramoto y cols. 1993a y 1993b; Seifalian y cols. 1997*). Un estudio reciente en trasplante hepático en ratas Zucker indica que la microcirculación hepática a 10 min y 1 h de reperusión se encuentra disminuida en los hígados esteatósicos de las ratas Ob con respecto a la observada en los hígados no grasos de las ratas Ln (*Sun Z. y cols. 2003*). Sin embargo, los resultados de esta tesis muestran que a tiempos mayores de reperusión el fallo microcirculatorio observado en ambos tipos de injertos es similar, indicando que el fallo en la microcirculación no es un factor clave responsable de la menor tolerancia que presentan los injertos esteatósicos a la lesión de I/R asociada al trasplante hepático, al menos en las condiciones evaluadas en el presente estudio (Figura 39). Además los efectos beneficiosos del PC isquémico no se reflejaron a nivel de microcirculación hepática, puesto que la aplicación del PC isquémico no tuvo ningún efecto sobre el fallo microcirculatorio observado tras el trasplante de ambos tipos de hígados.

3.2 Infiltración de neutrófilos en el tejido hepático

La mayor acumulación de neutrófilos, en hígados esteatósicos inducidos por una dieta deficiente en colina, parece ser responsable de la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos a la lesión de I/R asociada al trasplante hepático (*Nakano y cols. 1997*). Sin embargo, este mecanismo no parece explicar la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos en otros modelos experimentales de esteatosis hepática, tal como demuestran estudios llevados a cabo en modelos de isquemia normotérmica en ratas de la cepa Zucker y en modelos de hígado graso inducido por la ingesta de dietas ricas en colesterol en los que se observan niveles similares de acumulación de neutrófilos en el parénquima de hígados grasos y no grasos tras la I/R hepática (*Koneru y cols. 1995; Sun CK. y cols. 2001; Serafin y cols. 2002*). Es lo que sucede en el modelo de esteatosis hepática utilizado en esta tesis, ya que la determinación de la actividad hepática de MPO mostró grados similares de acumulación de neutrófilos tras el trasplante de ambos tipos de injertos, grasos y no grasos. El PC isquémico, a través de la generación de NO, moduló la acumulación de neutrófilos, reduciéndola, lo que contribuiría a reducir la lesión hepática. Estos resultados coinciden con los observados por otros autores (*Koeppel y cols. 1997*) (Figura 40). Pese a que el efecto beneficioso del PC isquémico sobre la acumulación de neutrófilos contribuye a

disminuir la lesión de I/R asociada al trasplante de hígados esteatósicos, este mecanismo no parece ser clave en la protección del PC isquémico frente a la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos a la I/R.

3.3 Liberación de TNF- α

Trabajos anteriores llevados a cabo en modelos de I/R normotérmica muestran que tras 1 h de reperfusión no existe inducción de citoquinas en hígados grasos no alcohólicos. Por el contrario hígados esteatósicos inducidos mediante la ingesta de alcohol muestran una mayor producción de citoquinas proinflamatorias, tales como el TNF- α , que los hígados sin infiltración grasa al someterlos a una I/R normotérmica (*Yamada y cols. 2000*). De acuerdo con estos resultados, un estudio realizado en humanos ha demostrado que el tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α resultó eficaz en hígados esteatósicos sometidos a I/R normotérmica (*Selzner M. y cols. 2001*). No obstante, en el modelo experimental utilizado en esta tesis sí existe inducción de citoquinas tras el trasplante de ambos tipos de injertos, no observándose diferencias en la producción de TNF- α entre hígados grasos y no grasos (Figura 41).

Estudios llevados a cabo en modelos de isquemia normotérmica hepática indican que el PC isquémico, reduciendo la liberación hepática de TNF- α , es capaz de reducir la lesión hepática y pulmonar asociada a este proceso (*Peralta y cols. 1999b*). Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que este hecho no puede ser descartado en hígados no grasos sometidos a trasplante hepático, ya que la aplicación del PC isquémico disminuye significativamente los niveles de TNF- α tras el trasplante en este tipo de hígados. Sin embargo, la aplicación del PC isquémico en el trasplante de hígados grasos no tiene ningún efecto sobre los niveles de TNF- α detectados tras el trasplante de los mismos.

Del mismo modo que ocurría con las alteraciones en la microcirculación y la acumulación de neutrófilos, no se observan diferencias en la producción de TNF- α tras el trasplante de hígados grasos y no grasos, por lo que ninguno de estos mecanismos puede explicar la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos a la lesión de I/R, al menos en las condiciones evaluadas en esta tesis. De esta forma, las estrategias encaminadas a proteger de un modo efectivo a los injertos esteatósicos sometidos a un trasplante hepático no deben centrarse únicamente en modular estos mecanismos de lesión, puesto que ninguno de ellos es clave en la mayor susceptibilidad de los hígados grasos a la lesión de I/R. De estos datos se deduce que si bien el PC isquémico al modular alguno de estos mecanismos puede disminuir la lesión de I/R asociada al trasplante de hígados esteatósicos, ninguno de ellos parece ser clave ni en la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos ni en la protección del PC isquémico frente a la lesión de I/R.

3.4 Lesión por estrés oxidativo

Diferentes autores defienden que los hígados grasos son más susceptibles a la peroxidación lipídica debido a que presentan una menor capacidad antioxidante, o una mayor producción de RLO con respecto a los hígados no grasos, o a la combinación de ambos mecanismos (*Koneru y cols. 1995; Zhong y cols. 1997; Vendemiale y cols. 2001*). De acuerdo con estos trabajos, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que los hígados esteatósicos presentan una mayor peroxidación lipídica que los hígados sin infiltración grasa tras el trasplante hepático (Figura 45). Sin embargo, nuestro estudio muestra que este aumento de la peroxidación lipídica observado en los hígados grasos no puede explicarse por diferencias en la actividad de SOD ni en el contenido de GSH respecto a un hígado no esteatósico, puesto que tras el trasplante de ambos tipos de hígados se observan niveles similares de GSH y de actividad de la SOD (Figura 42). La aplicación del PC isquémico preserva los niveles de GSH tras el trasplante de hígados grasos y no grasos, encontrándose en los grupos precondicionados niveles de GSH similares a los de grupo sham. Los resultados obtenidos en un estudio de I/R hepática normotérmica sugieren que el NO generado en el PC isquémico podría preservar los niveles de GSH durante el proceso de I/R actuando a nivel de las vías de reciclaje del GSH (*Koken y cols. 1999*). La preservación de los niveles de GSH inducida por el PC isquémico podría estar mediada por el NO, y contribuiría a disminuir los efectos negativos de los RLO en el trasplante hepático, explicando en parte el efecto beneficioso de esta estrategia quirúrgica sobre la lesión hepática producida por los RLO en los hígados grasos.

Respecto a los sistemas generadores de RLO, los resultados obtenidos en esta tesis muestran diferencias en el papel del sistema xantina/XOD sobre la lesión de I/R hepática en función de si el hígado trasplantado es o no esteatósico. El papel de la XOD no parece ser crucial en la lesión hepática y pulmonar asociada al trasplante de hígado en injertos no grasos, ya que la inhibición de la XOD mediante la administración de alopurinol redujo parcialmente el daño hepático en este tipo de injertos (disminuyó los niveles de ALT pero no los de AST) (Figura 33), pero no protegió frente a la lesión pulmonar. En el tejido pulmonar de los grupos tratados con alopurinol se observaron grados similares de peroxidación lipídica y de infiltración de neutrófilos a los observados en los grupos trasplantados con injertos no esteatósicos (Figura 37). Por el contrario, la administración de alopurinol protegió de forma efectiva frente a la lesión hepática y pulmonar en el trasplante de hígados grasos, reduciendo los niveles plasmáticos de transaminasas, y la actividad de la MPO y los niveles de MDA en el tejido pulmonar (Figuras 33 y 37). Estas diferencias en el papel del sistema xantina/XOD pueden ser explicadas al menos parcialmente, por las diferencias en los porcentajes de actividad de la XOD observados en los dos tipos de hígados durante la isquemia fría (87% en los hígados grasos frente al 46% en los hígados no grasos) (Figura 43). Estudios anteriores muestran que la XOD juega un papel clave a tiempos más prolongados de isquemia fría, donde tiene lugar una conversión considerable de

XDH en XOD (80-90% XOD) (Fernández y cols. 2002; Jaeschke 2002a). Por lo tanto, si se tiene en cuenta: 1) el grado de conversión de XDH a XOD observado en los injertos esteatósicos tras la preservación fría; 2) la posible relación entre el porcentaje de XOD y el grado de lesión hepática y pulmonar asociada al trasplante hepático; 3) así como la acentuada vulnerabilidad del hígado y el pulmón frente a la lesión de I/R asociada al trasplante al utilizar injertos esteatósicos; se podría pensar que cualquier estrategia que sea capaz de modular el sistema xantina/XOD durante la isquemia podría proteger a los injertos esteatósicos sometidos a un trasplante. Por otra parte, en injertos no esteatósicos sometidos al mismo periodo de isquemia fría la inhibición de la XOD no es suficiente para proteger frente a la lesión de I/R. Los resultados de esta tesis indican que tanto el PC isquémico como el tratamiento con alopurinol protegen frente a la lesión hepática y pulmonar asociada al trasplante al utilizar injertos esteatósicos, ya que ambas estrategias disminuyen los parámetros de lesión evaluados. En los injertos no grasos, por el contrario, la administración de alopurinol no fue capaz de disminuir la lesión de I/R hepática mientras que el PC isquémico fue una estrategia más eficaz que el alopurinol en la protección frente a la lesión hepática y pulmonar asociada al trasplante (Figuras 33 y 37).

El PC isquémico redujo la acumulación de xantina tras la preservación de ambos tipos de injertos (Figura 44). Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar la reducción de la acumulación de xantina inducida por el PC isquémico en procesos de I/R. Por una lado, estudios llevados a cabo en isquemia normotérmica hepática sugieren que el PC isquémico reduce la acumulación de xantina al prevenir la degradación de ATP (Selzner N. y cols. 2003a). Sin embargo, otros trabajos de PC isquémico en intestino proponen que durante el periodo de PC isquémico la XOD podría generar RLO utilizando como sustrato xantina, de este modo, la acumulación de xantina se vería reducida en la isquemia posterior (Sola y cols. 2000). En lo que concierne a XDH/XOD, se ha demostrado que el NO inhibe la actividad de la XOD en estudios *in vitro* y de isquemia renal normotérmica (Ichimori y cols. 1999; Shimamura y cols. 1999; Unal y cols. 2002). Los autores sugieren que el NO se combina con el molibdeno, un cofactor de la XOD, y esta combinación conlleva la inhibición de XOD. Considerando estas observaciones, y puesto que la inhibición de la síntesis de NO durante el PC isquémico elimina los efectos beneficiosos del PC isquémico sobre la XOD, la inhibición de XOD inducida por el PC isquémico podría estar mediada por NO.

La complejidad de los mecanismos implicados en la lesión de I/R, las posibles diferencias en los mecanismos de lesión existentes entre los hígados esteatósicos y no esteatósicos, así como entre los diferentes tipos de esteatosis ponen de manifiesto la dificultad de utilizar estrategias farmacológicas sencillas para prevenir eficazmente la lesión de I/R asociada a un trasplante hepático. Por el contrario, el PC isquémico podría ser una estrategia de gran interés en la práctica clínica, puesto que es una estrategia eficaz para reducir la lesión hepática y pulmonar tras el trasplante de hígados esteatósicos. El uso del PC isquémico en la práctica clínica podría

mejorar las condiciones iniciales de los hígados donantes con esteatosis moderada, disponibles para ser trasplantados, pero con uso limitado debido a que su utilización está asociada a un mayor riesgo de FPI tras el trasplante. Incluso se podría aumentar el uso de hígados donantes con esteatosis severa, que actualmente son descartados para el trasplante. No obstante, todavía son necesarios muchos estudios para confirmar la fiabilidad y seguridad de este procedimiento quirúrgico.

4. IMPLICACIÓN DE LA AMPK EN LA LESIÓN HEPÁTICA. EFECTO DE LA AMPK SOBRE LOS NIVELES DE ATP Y DE NUCLEÓTIDOS DE ADENINA

La activación de la AMPK en el trasplante de ambos tipos de injertos mimetizó los efectos protectores del PC isquémico sobre la lesión hepática de I/R asociada al trasplante hepático; mientras que la inhibición de la AMPK durante el PC isquémico eliminó sus efectos beneficiosos (Figuras 46 y 50). Estos resultados sugieren la implicación de la AMPK en la protección del PC isquémico (Figura 48) y el posible uso del AICAR como estrategia farmacológica para reducir la lesión de I/R hepática en ambos tipos de hígados, grasos y no grasos. Sin embargo, el enzima AMPK no parece tener ningún papel importante en la preservación de los niveles de ATP ni de los nucleótidos de adenina en el trasplante de hígados esteatósicos en las condiciones evaluadas en el presente estudio, puesto que ni la aplicación del PC isquémico ni la administración de AICAR modificó los niveles de ambos parámetros tras el trasplante o la preservación fría (Figura 52). Estos resultados difieren de los obtenidos en otros estudios llevados a cabo en hepatocitos aislados o en isquemia normotérmica hepática en los que se observó que el PC isquémico a través de la activación de la AMPK preservó el metabolismo energético tras la I/R hepática (*Corton y cols. 1995; Javaux y cols. 1995; Peralta y cols. 2001b*).

5. RELACIÓN ENTRE AMPK Y NO. EFECTOS DE LA AMPK Y EL NO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que tanto la aplicación del PC isquémico como la activación de la AMPK aumentan la producción de NO derivada de la forma constitutiva de la NOS (Figuras 47 y 49), y en ambos casos el NO parece estar implicado en los efectos beneficiosos que tienen ambos tratamientos sobre la lesión hepática. La implicación de la AMPK y el NO en los efectos protectores del PC isquémico sobre la lesión de I/R hepática ha sido sugerida en numerosos estudios (*Galiñanes y cols. 1992; Corton y cols. 1995; Javaux y cols. 1995; Yin y cols. 1998; Peralta y cols. 1999a y 2001b; Serafin y cols. 2002*); se sabe también que la AMPK a través de la fosforilación de la NOS podría inducir la síntesis de NO siendo éste el responsable de algunos de sus efectos (*Chen ZP. y cols. 1999; Almeida y cols. 2004*). En base a estos hechos, podemos sugerir que el PC isquémico, por activación de la AMPK, puede inducir la síntesis de NO, el cual podría ser responsable de los efectos protectores de esta estrategia quirúrgica frente a la lesión de I/R asociada al trasplante hepático en ambos tipos de injertos. Los

resultados obtenidos en esta tesis muestran que en ambos tipos de hígados, grasos y no grasos, la modulación farmacológica de la AMPK induce cambios en la producción de NO, y que los beneficios de la activación de la AMPK sobre la lesión hepática son suprimidos cuando se inhibe la síntesis de NO de forma simultánea. Según estos resultados, las estrategias basadas en donadores de NO podrían proteger frente a la lesión de I/R asociada al trasplante hepático. Estudios previos en isquemia normotérmica hepática indicaron que la administración de donadores de NO a la misma dosis protegía frente a la lesión de I/R en los hígados esteatósicos y no grasos (Serafín y cols. 2002). Sin embargo, los datos obtenidos en esta tesis indican que no sucede lo mismo en el trasplante hepático en las condiciones evaluadas en este estudio, puesto que la dosis de NO administrada protege frente a la lesión de I/R en el trasplante de hígados no grasos pero resulta perjudicial cuando el injerto es esteatósico (Figura 50, 51 y 53). Estos resultados sugieren las dificultades para prevenir la lesión de I/R asociada al trasplante hepático de ambos tipos de injertos.

El NO es una molécula que puede ejercer efectos beneficiosos en la I/R hepática debido a sus propiedades vasodilatadora, antioxidante e inhibidor de la actividad de neutrófilos y plaquetas. Sin embargo, cuando se combina con el anión superóxido da lugar a la formación de peroxinitrito (ONOO^-) (Moncada y cols. 2002; Ferdinandy y cols. 2003). La formación de peroxinitrito ocurre en situaciones en las que existe una sobreproducción de NO y anión superóxido *en vivo* (Figura 57), y es una molécula cuya capacidad oxidativa y citotóxica ha sido documentada en diversos estudios (Stamler 1994; Beckman y cols. 1996; Grisham y cols. 1999; Van der Vliet y cols. 2000).

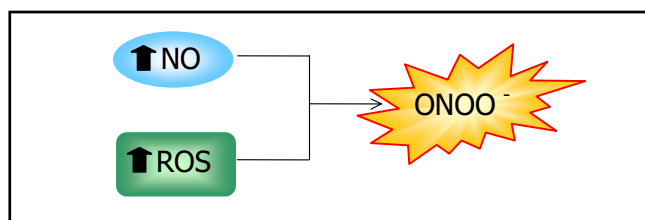


Figura 57. Condiciones para la formación de peroxinitrito.

El peroxinitrito produce la depleción de las defensas celulares antioxidantes, la inactivación de diversos enzimas y la nitración de residuos de tirosina de numerosas proteínas lo que puede afectar a su funcionalidad así como a procesos de transducción de señales (MacMillan-Crow y cols. 1998). Los resultados obtenidos en esta tesis sobre la formación de nitrotirosinas indican que, en nuestras condiciones experimentales, el peroxinitrito es la forma predominante de RLO presente en los hígados esteatósicos tras el trasplante de los mismos (Figuras 54, 55 y 56). Además, los efectos negativos sobre la lesión hepática y la lesión por estrés oxidativo que produce la administración de NO de forma exógena en el trasplante de hígados grasos se asocian con un importante aumento de la formación de nitrotirosinas. Este hecho podría explicar, al menos en parte, la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos a la lesión de I/R

asociada al trasplante de este tipo de hígados y los efectos negativos que produce la administración de NO de forma exógena en el trasplante de hígado esteatósico. Sin embargo, el NO generado por el PC isquémico protege a los hígados esteatósicos frente a la lesión de I/R asociada al trasplante de los mismos. El NO generado durante el PC isquémico es sintetizado por la forma constitutiva de la NOS (Figura 49), y parece ser insuficiente para dar lugar a la formación de peroxinitrito. Además, los efectos beneficiosos del NO generado durante el PC isquémico en la preservación de los niveles del antioxidante GSH observados en el anterior estudio de esta tesis (Figura 42), podría reducir los efectos perjudiciales de los RLO en la lesión hepática. En el trasplante de hígados no grasos, tanto la administración de NO de forma exógena como en NO generado de forma endógena durante el PC isquémico protegen frente a la lesión de I/R hepática (Figura 50). Esto puede ser debido a que en el trasplante de hígados no grasos se produce una cantidad mucho más pequeña de RLO que la que se produce tras el trasplante de los hígados esteatósicos. Estas hipótesis con respecto a la relación entre NO y RLO en los dos tipos de hígados (Figura 58), derivan de la idea de que el la formación de peroxinitrito sólo ocurre en circunstancias en las que existe una alta producción de NO y de RLO (Stamler 1994; Beckman y cols. 1996; Grisham y cols. 1999; Van der Vliet y cols. 2000).

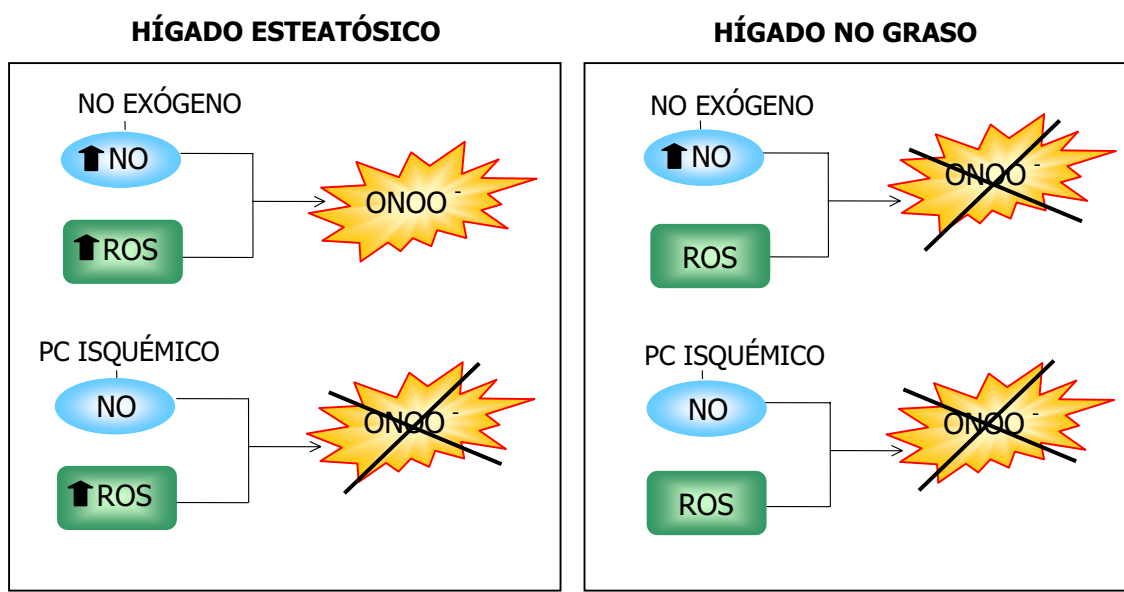


Figura 58. Hipótesis sobre la formación de peroxinitrito tras el trasplante de hígados grasos y no grasos.

Los donadores de NO podrían constituir una estrategia para disminuir la lesión de I/R asociada al trasplante de hígados no grasos, sin embargo, la misma dosis no sería eficaz en presencia de esteatosis. La aplicación del PC isquémico o el tratamiento con AICAR, a través de la activación de la AMPK que induce la síntesis de NO, protegerían frente a la lesión hepática en ambos tipos de hígados. Esto sugiere que la aplicación del PC isquémico o el tratamiento con AICAR constituyen una nueva estrategia quirúrgica y farmacológica para reducir la lesión hepática asociada al trasplante de hígado esteatósico.

VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta tesis son las siguientes:

1. Los hígados esteatósicos presentan una mayor vulnerabilidad frente a la lesión de I/R asociada al trasplante hepático que los hígados no grasos. En las condiciones evaluadas en la presente tesis las alteraciones en la microcirculación, la acumulación de neutrófilos en el tejido hepático o la producción de TNF- α no parecen ser los mecanismos responsables de la mayor susceptibilidad de éste tipo de hígados a la lesión de I/R; por contra, el estrés oxidativo parece tener un papel fundamental en la mayor susceptibilidad que presentan los hígados grasos a la lesión de I/R asociada al trasplante de hígado.
2. El PC isquémico protegió frente a la mayor susceptibilidad de los hígados esteatósicos a la lesión de I/R asociada al trasplante hepático. El PC isquémico, mediante la modulación del sistema xantina/XOD, redujo el riesgo de fallo hepático y daño pulmonar asociado al trasplante de injertos esteatósicos.
3. El NO está implicado en los efectos protectores del PC isquémico sobre la lesión hepática y pulmonar asociada al trasplante de hígados esteatósicos. Este mediador vasoactivo es capaz de modular el sistema xantina/XOD y los efectos nocivos de los RLO, protegiendo así frente a los desórdenes locales y sistémicos asociados al trasplante hepático. La síntesis de NO durante el PC isquémico es inducida por la activación de la AMPK. Estrategias farmacológicas basadas en la administración de activadores de la AMPK o donadores de NO son capaces de simular los efectos beneficiosos del PC isquémico sobre la lesión de I/R asociada al trasplante con injertos no esteatósicos. Si bien los activadores de la AMPK son también beneficiosos en el caso de los injertos esteatósicos, los donadores de NO resultaron ineficaces en este tipo de injertos. En estas condiciones, el NO se combinó con el exceso de RLO presentes en este tipo de injertos generando peroxinitrito, agravando aún más la vulnerabilidad de este tipo de hígados a la lesión de I/R.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abt P, Crawford M, Desai N, Markmann J, Olthoff K, Shaked A. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors: an increased incidence of biliary complications. *Transplantation* 75(10):1659. (2003)
- Adam R, Reynes M, Johann M, Morino M, Astarcioglu I, Kafetzis I, Castaing D, Bismuth H. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc* 23(1 Pt 2):1538. (1991)
- Adam R, McMaster P, O'Grady JG, Castaing D, Klempnauer JL, Jamieson N, Neuhaus P, Lerut J, Salizzoni M, Pollard S, Muhlbacher F, Rogiers X, Garcia Valdecasas JC, Berenguer J, Jaeck D, Moreno Gonzalez E; European Liver Transplant Association. Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl* 9(12):1231. (2003)
- Afonso RC, Saad WA, Parra OM, Leitao R and Ferraz-Neto. Impact of steatotic grafts on initial function and prognosis after liver transplantation. *Transplant Proc* 36:909. (2004)
- Aiba M, Takeyoshi I, Ohwada S, Kawashima Y, Iwanami K, Sunose Y, Yamada T, Tsutsumi H, Matsumoto K, Morishita Y. Novel nitric oxide donor (FK409) ameliorates liver damage during extended liver resection with warm ischemia in dogs. *J Am Coll Surg* 193(3):264. (2001)
- Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, Diehl AM. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 263: G579. (1992)
- Almeida A, Moncada S, Bolaños JP: Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* 6(1):45. (2004)
- Almond NE, Wheatley AM. Measurement of hepatic perfusion in rats by laser Doppler flowmetry. *Am J Physiol* 262(2 Pt 1):G203. (1992)
- Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, Zhao D, Zaky J, Melinek J, Lassman CR, Kolls JK, Alam J, Ritter T, Volk HD, Farmer DG, Ghobrial RM, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 104(11):1631. (1999)
- Amersi F, Farmer DG, Shaw GD, Kato H, Coito AJ, Kaldas F, Zhao D, Lassman CR, Melinek J, Ma J, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. P-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig)-mediated blockade of CD62 selectin molecules protects rat steatotic liver grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant* 2(7):600. (2002)
- Amersi F, Shen XD, Moore C, Melinek J, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, Coito AJ. Fibronectin- $\alpha 4\beta 1$ integrin-mediates blockade protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 162:1229. (2003)
- Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Involvement of Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells in ischemic preconditioning to rat livers stored for transplantation. *Transplant Proc* 31(1-2):425. (1999)
- Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Contribution of adenosine A₂ receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against Storage/Reperfusion injury in rat livers. *Hepatology* 32(2):297. (2000)
- Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Ischemic preconditioning of rat livers against cold storage-reperfusion injury: role of nonparenchymal cells and the phenomenon of heterologous preconditioning. *Liver Transpl* 7(4):292. (2001)
- Ardite E, Ramos C, Rimola A, Grande L, Fernández-Checa JC. Hepatocellular oxidative stress and initial graft injury in human liver transplantation. *J Hepatol* 31:921. (1999)

- Arii S, Monden K, Adachi Y, Zhang W, Higashitsuji H, Furutani M, Mise M, Fujita S, Nakamura T, Imamura M. Pathogenic role of Kupffer cell activation in the reperfusion injury of cold-preserved liver. *Transplantation* 58(10):1072. (1994)
- Arvidsson D, Svensson H, Haglund U. Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. *Am J Physiol* 254(4 Pt 1):G471. (1988)
- Atkinson LL, Kelly SE, Russell JC, Bar-Tana J, Lopaschuck GD. MEDICA 16 inhibits hepatic acetyl-Coa carboxylase and reduces plasma triacylglycerol levels in insulin-resistant JCR:LA-cp rats. *Diabetes* 51:1548. (2002)
- Azoulay D, Samuel D, Castaing D, Adam R, Adams D, Said G, Bismuth H. Domino liver transplants for metabolic disorders: experience with familial amyloidotic polyneuropathy. *J Am Coll Surg* 189(6):584. (1999)
- Azoulay D, Castaing D, Adam R, Savier E, Delvart V, Karam V, Ming BY, Dannaoui M, Krissat J, Bismuth H. Split-liver transplantation for two adults recipients: feasibility and long-term outcomes. *Ann Surg* 233:565. (2001)
- Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA, Smith TW, Michel T. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 269:27580. (1994)
- Bauer M, Bauer I. Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 4(5):749. (2002)
- Baykal A, Kaynaroglu V, Demirpence E, Kilinc K, Sayek I, Sanac Y. Experimental study of the effect of adrenaline tolerance on intestinal ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 85(7):947. (1998)
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* 271:C1424. (1996)
- Behrns KE, Tsiotos GG, DeSouza NF, Krishna MK, Ludwig J, Nagorney DM. Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg* 2(3):292. (1998)
- Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg* 229:369. (1999)
- Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45(4):673. (1988)
- Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press. (1988)
- Bessens M, Doorschodt BM, van Vliet AK, van Gulik TM. Preservation of rat livers by cold storage: a comparison between the University of Wisconsin solution and Hypothermosol. *Ann Transplant* 9(2):35. (2004)
- Biasi F, Bosco M, Chiappino I, Chiarpotto E, Lanfranco G, Ottobrelli A, Massano G, Donadio PP, Vaj M, Andorno E, Rizzetto M, Salizzoni M, Poli G. Oxidative damage in human liver transplantation. *Free Radic Biol Med* 19(3):311. (1995)
- Bilbao G, Contreras J, Eckhoff D, Mikheeva G, Krasnykh V, Douglas J, Thomas F, Thomas J, Curiel D. Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by the in vivo adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. *Ann Surg* 230:185. (1999)
- Bilzer M, Jaeschke H, Vollmar AM, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol* 276:G1137. (1999)

- Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 32:508. (2000)
- Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 87(11):972. (2000)
- Bradham CA, Stachlewitz RF, Gao W, Qian T, Jayadev S, Jenkins G, Hannun Y, Lemasters JJ, Thurman RG, Brenner DA. Reperfusion after liver transplantation in rats differentially activates the mitogen-activated protein kinases. *Hepatology* 25(5):1128. (1997)
- Brandhagen D, Fidler J, Rosen CB. Evaluation of the donor for living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 9:S16. (2003)
- Bray GA. The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc* 36(2):148. (1997)
- Brigelius R, Muckel C, Akerboom TP, Sies H. Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* 32:2529. (1983)
- Brown KM, Brems JJ, Moazzam FN, Hartman GG, Gamelli RL, Ding JW. The nitric oxide donor molsidomine improves survival and reduces hepatocyte apoptosis in cholestasis and endotoxemia. *J Am Coll Surg* 197(2):261. (2003)
- Burke A and Lucey MR. Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. *American Journal of Transplantation* 4:686. (2004)
- Busuttill RW, Goss JA. Split liver transplantation. *Ann Surg* 229(3):313. (1999)
- Busuttill RW and Tanaka. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transplantation* 9(7):651. (2003)
- Bzeizi KI, Jalan R, Plevris JN, Hayes PC. Primary graft dysfunction after liver transplantation: from pathogenesis to prevention. *Liver Transpl Surg* 3(2):137. (1997)
- Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferrareso M, Burra P, Cadrobbi R, Cardin R, Bacelle L, Parnigotto A, Rigotti P. The protective effects of L-arginine after liver ischaemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol* 183(4):477. (1997)
- Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 13(1):83. (1991)
- Camargo Jr CA, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 26(6):1513. (1997)
- Canelo R, Braun F, Sattler B, Klinge B, Lorf T, Ramadori G, Ringe B. Is a fatty liver dangerous for transplantation? *Transplant Proc* 31(1-2):414. (1999)
- Caraceni P, Nardo B, Domenicali M, Turi P, Vici M, Simoncini M, De Maria N, Trevisani F, Van Thiel DH, Derenzini M, Cavallari A, Bernardi M. Ischemia-reperfusion injury in rat fatty liver: role of nutritional status. *Hepatology* 29(4):1139. (1999)
- Caraceni P, Bianchi C, Domenicali M, Pertosa A, Maiolini E, Parenti Castelli G; Nardo B, Trevisani F, Lenaz G, Bernardi M. Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat fatty liver exposed to preservation-reperfusion injury. *J Hepatol* 41:82. (2004)
- Caraceni P, Domenicali M, Vendemiale G, Grattagliano I, Pertosa A, Nardo B, Morselli-Labate AM, Trevisani F, Palasciano G, Altomare E, Bernardi M. The reduced tolerance of fatty liver to ischemia reperfusion is associated with mitochondrial oxidative injury. *J Surg Res* 124:160. (2005)

- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 190(3):255. (2000)
- Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Albano E. Ischemic preconditioning reduces Na(+) accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia. *Hepatology* 31(1):166. (2000)
- Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti MP, Paola D, Pronzato MA, Albano E. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 33:131. (2001a)
- Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Albano E. Stimulation of p38 MAP kinase reduces acidosis and Na(+) overload in preconditioned hepatocytes. *FEBS Lett* 491:180. (2001b)
- Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Domenicotti C, Nitti MP, Pronzato MA, Albano E. Signal pathway responsible for hepatocyte preconditioning by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 34:1047. (2003)
- Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade-a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29:18. (2004)
- Carlson CL, Winder WW. Liver AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase during and after exercise. *J Appl Physiol* 86(2):669. (1999)
- Carrera MT, Bogue EH, Schiano TD. Domino liver transplantation: a practical option in the face of the organ shortage. *Prog Transplant* 13(2):151. (2003)
- Carvalho EM, Massarollo PC, Isern MR, Toledo NS, Kawacama J, Mies S, Raia S. Pulmonary evolution in conventional liver transplantation with venovenous bypass and the piggyback method. *Transplant Proc* 31(7):3064. (1999)
- Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R, Nghiem D, Miracle K, Bronsther O, Randhawa P, Broznick B, Fung JJ, Starzl T. Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. *Transplantation* 59(2):197. (1995)
- Cavaliere B, Perrelli MG, Aragno M, Mastrocola R, Corvetti G, Durazzo M, Poli G, Cutrin JC. Ischemic preconditioning attenuates the oxidant-dependent mechanisms of reperfusion cell damage and death in rat liver. *Liver Transpl* 8(11):990. (2002)
- Cavaliere B, Perrelli MG, Aragno M, Ramadori P, Poli G, Cutrin JC. Ischemic preconditioning modulates the activity of Kupffer cells during in vivo reperfusion injury on rat liver. *Cell Biochem Funct* 21:299 (2003)
- Cerwenka H, Khoschsorur G, Bacher H, Werkgartner G, El-Shabrawi A, Quehenberger F, Rabl H, Mischinger HJ. Normothermic liver ischemia and antioxidant treatment during hepatic resections. *Free Radic Res* 30(6):463. (1999)
- Chavez-Cartaya RE, Pino DeSola G, Ramirez-Romero P, Calne RY, Jamieson NV. Ischemia and reperfusion injury of the rat liver: the role of nimodipine. *J Surg Res* 60:199. (1996)
- Chavin KD, Yang S, Lin HZ, Chatham J, Chacko VP, Hoek JB, Walajtys-Rode E, Rashid A, Chen CH, Huang CC, Wu TC, Lane MD, Diehl AM. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem* 26;274(9):5692. (1999)
- Chen H, Yu YY, Zhang MJ, Deng XX, Yang WP, Ji J, Peng CH, Li HW. Protective effect of doxorubicin induced heat shock protein 72 on cold preservation injury of rat livers. *World Gastroenterol* 10(9):1375. (2004)

- Chen S, Li G, Long L. Clinical research of ischemic preconditioning on lung protection. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 24(4):357. (1999)
- Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodríguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* 443:285. (1999)
- Cho YW, Terasaki PI, Cecka JM. High kidney graft survival rates using non-heart-beating trauma donors. *Transplant Proc* 30(7):3795. (1998)
- Chouker A, Schachtner T, Schauer R, Dugas M, Lohe F, Martignoni A, Pollwein B, Niklas M, Rau HG, Jauch KW, Peter K, Thiel M. Effects of Pringle manoeuvre and ischaemic preconditioning on haemodynamic stability in patients undergoing elective hepatectomy: a randomized trial. *Br J Anaesth* 93(2):204. (2004)
- Chui AK, Haghighi K, Painter D, Jayasundera M, Hall G, Rao AR, Verran DJ, McCaughan GW, Sheil AG. Donor fatty (steatotic) liver allografts in orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 30(7):3286. (1998)
- Chung KY, Jeong GY, Choi KB, Sung SH, Kim YS. Prevention of primary nonfunction after canine liver allotransplantation: the effect of gadolinium chloride. *Transplant Proc* 36(7):1928. (2004)
- Cingolani, Houssay y colaboradores. *Fisiología Humana*. 7ª Edición. (2000)
- Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 53(5):957. (1992)
- Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 28(2):281. (1998)
- Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 232(2):155. (2000)
- Clavien PA, Rudiger HA, Selzner M. Mechanism of hepatocyte death after ischemia: apoptosis versus necrosis. *Hepatology* 33:1555. (2001)
- Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 238(6):843. (2003)
- Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 30(1):1. (1999)
- Cofer JB, Klintmalm GB, Morris CV, Solomon H, Watemberg IA, Husberg BS, Jennings LW. A prospective randomized trial between Euro-Collins and University of Wisconsin solutions as the initial flush in hepatic allograft procurement. *Transplantation* 53(5):995. (1992)
- Cohen AJ, Burczynski FJ, Rosser BG, Lipschitz J, Minuk GY. The effects of various organ preservation solutions on hepatocyte membrane potentials, intracellular calcium concentrations, and outcome following liver transplantation. *Am J Surg* 179(2):154. (2000)
- Coito A, Buelow R, Shen X, Amersi F, Moore C, Volk HD, Bussutil RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme-oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 74:96. (2002)
- Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 85(6):1936. (1990a)

- Colletti LM, Burtch GD, Remick DG, Kunkel SL, Strieter RM, Guice KS, Oldham KT, Campbell DA Jr. The production of tumor necrosis factor alpha and the development of a pulmonary capillary injury following hepatic ischemia/reperfusion. *Transplantation* 49(2):268. (1990b)
- Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 23(3):506. (1996)
- Colletti LM, Cortis A, Lukacs N, Kunkel SL, Green M, Strieter RM. Tumor necrosis factor up-regulates intercellular adhesion molecule 1, which is important in the neutrophil dependent lung and liver injury associated with hepatic ischemia and reperfusion in the rat. *Shock* 10:182. (1998)
- Compagnon P, Wang HB, Southard JH, et al. Ischemic preconditioning in a rodent hepatocyte model of liver hypothermic preservation injury. *Cryobiology* 44:269. (2002)
- Compagnon P, Lindell S, Ametani MS, Gilligan B, Wang HB, D'Alessandro AM, Southard JH, Mangino MJ. Ischemic preconditioning and liver tolerance to warm or cold ischemia: experimental studies in large animals. *Transplantation* 79:1393. (2005)
- Connor HD, Gao W, Nukina S, Lemasters JJ, Mason RP, Thurman RG. Evidence that free radicals are involved in graft failure following liver transplantation in the rat-electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Transplantation* 54:199. (1992)
- Cooper JT, Chin LT, Krieger NR, Fernandez LA, Foley DP, Becker YT, Odorico JS, Knechtle SJ, Kalayoglu M, Sollinger HW, D'Alessandro AM. Donation after cardiac death: the university of Wisconsin experience with renal transplantation. *Am J Transplant* 4(9):1490. (2004)
- Corte ED, Stirpe F. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem J* 126(3):739. (1972)
- Cortez-Pinto H, Zhi Lin H, Qi Yang S, Odwin Da Costa S, Diehl AM. Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 116(5):1184. (1999)
- Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG: 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?. *Eur J Biochem* 229:558. (1995)
- Cottart CH, Do L, Blanc MC, Vaubourdolle M, Descamps G, Durand D, Galen FX, Clot JP. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 29(3):809. (1999)
- Crowley H, Lewis WD, Gordon F, Jenkins R, Khettry U. Steatosis in donor and transplant liver biopsies. *Hum Pathol* 31(10):1209. (2000)
- Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, Saint-Paul MC, Ferrua B, Auberger AP. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *FASEB J* 13(2):253. (1999)
- Cutrin JC, Boveris A, Zingaro B, Corvetti G, Poli G. In situ determination by surface chemiluminescence of temporal relationships between evolving warm ischemia-reperfusion injury in rat liver and phagocyte activation and recruitment. *Hepatology* 31(3):622. (2000)
- Cutrin JC, Perelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Roselló-Catafau J, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of preconditioning. *Free Radic Biol Med* 33(9):1200. (2002)
- D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW, Hoffmann RM, Reed A, Knechtle SJ, Pirsch JD, Hafez GR, Lorentzen D, Belzer FO. The predictive value of donor liver biopsies for the

- development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 51(1):157. (1991)
- D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Knechtle SJ, Eckhoff DE, Love RB, Kalayoglu M, Sollinger HW, Belzer FO. Successful extrarenal transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation* 59(7):977. (1995)
- D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Knechtle SJ, Odorico JS, Becker YT, Musat A, Pirsch JD, Sollinger HW, Kalayoglu M. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors. *Surgery* 128(4):579. (2000)
- Davies SP, Carling D, Hardie DG. Tissue distribution of AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. *Eur J Biochem* 186:123. (1989)
- Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology* 27(6):1463. (1998a)
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114(4):842. (1998b)
- Devlin J, O'Grady J. Indications for referral and assessment in adult liver transplantation: a clinical guideline. *British Society of Gastroenterology. Gut* 45 Suppl 6:VI1. (1999)
- Dikdan GS, Saba SC, Dela Torre AN, Roth J, Wang S, Koneru B. Role of oxidative stress in the increased activation of signal transducers and activators of transcription-3 in the fatty livers of obese Zucker rats. *Surgery* 136(3):677. (2004)
- Donckier V, Loi P, Closset J, Nagy N, Quertinmont E, Le Moine O, Deviere J, Goldman M, Gelin M, Gianello P. Preconditioning of donors with interleukin-10 reduces hepatic ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in pigs. *Transplantation* 75(6):902. (2003)
- Du ZY, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, McDonald P. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant* 15:1258. (1996)
- Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391(6665):393. (1998)
- Elimadi A, Sapena R, Settaf A, Le Louet H, Tillement J, Morin D. Attenuation of liver normothermic ischemia--reperfusion injury by preservation of mitochondrial functions with S-15176, a potent trimetazidine derivative. *Biochem Pharmacol* 62(4):509. (2001)
- Fan CY, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med* 77(8):577. (1999)
- Fan CY, Long Chen C, Lai CY, Liang Huang T, Yu Lee T, Lung Lin C, Lord R, Sen Chen Y, Liew Eng H, Pan TL, Lee TH, Wang YH, Iwashita Y, Kitano S and Goto S. Assessment of donor fatty livers for transplantation. *Transplantation* 71(15):1221. (2001)
- Farmer DG, Amersi F, Kupiec-Weglinski JW, Bussutil RW. Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver. *Transpl Rev* 14:106. (2000)
- Farzaneh-Far R, Moore K. Nitric oxide and the liver. *Liver* 21(3):161. (2001)
- Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 39(6):1477. (2004)
- Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* 138:532. (2003)

- Fernández L, Heredia N, Grande L, Gomez G, Rimola A, Marco A, Gelpí E, Roselló-Catafau J, Peralta C. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology* 36(3):562. (2002)
- Fernández L, Heredia N, Peralta C, Xaus C, Roselló-Catafau J, Rimola A, Marco A, Serafín A, Deulofeu R, Gelpí E, Grande L. Role of ischemic preconditioning and the portosystemic shunt in the prevention of liver and lung damage after rat liver transplantation. *Transplantation* 76(2):282. (2003)
- Fishbein T, Fiel M, Emre S, Cubukcu O, Guy SR, Schwartz ME, Miller CM, Sheiner PA. Use of livers with microvesicular fat safely expands the donor pool. *Transplantation* 64:248. (1997)
- Fondevila C, Bussutil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury- a fresh look. *Exp Mol Pathol* 74:86. (2003)
- Fondevila C, Shen XD, Moore C, Busuttil RW, Coito AJ. Cyclic RGD peptides with high affinity for alpha-5-beta-1 integrin protect genetically fat Zucker rat livers from cold ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 37(4):1679. (2004)
- Fromenty B, Berson A, Pessayre D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *J Hepatol* 26 (Suppl 1):13-22. (1997a)
- Fromenty B, Pessayre D. Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. *J Hepatol* 26:43. (1997b)
- Fryer LG, Hajdich E, Rencurel F, Salt IP, Hundal HS, Hardie DG, Carling D. Activation of glucose transport by AMPK-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase. *Diabetes* 49(12):1978. (2000)
- Fukumori T, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Why is fatty liver unsuitable for transplantation? Deterioration of mitochondrial ATP synthesis and sinusoidal structure during cold preservation of a liver with steatosis. *Transplant Proc* 29(1-2):412. (1997)
- Fukumori T, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. The mechanism of injury in a steatotic liver graft during cold preservation. *Transplantation* 67(2):195. (1999)
- Funaki H, Shimizu K, Harada S, Tsuyama H, Fushida S, Tani T, Miwa K. Essential role for nuclear factor kappaB in ischemic preconditioning for ischemia-reperfusion injury of the mouse liver. *Transplantation* 74(4):551. (2002)
- Furtado AJL. Domino liver transplantation using livers from patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Curr Opin Org Transpl* 5:69. (2000)
- Galiñanes M, Bullough D, Mullane KM, Hearse DJ: Sustained protection by acadesine against ischemia-and reperfusion-induced injury. *Studies in the transplanted rat heart. Circulation* 86:589. (1992)
- Galley HF, Richardson N, Howdle PD, Walker BE, Webster NR. Total antioxidant capacity and lipid peroxidation during liver transplantation. *Clin Sci* 89:329. (1995)
- Ganong. *Review of Medical Physiology*. 20 edition. (2001)
- Gao W, Connor HD, Lemasters JJ, Mason RP, Thurman RG. Primary nonfunction of fatty livers produced by alcohol is associated with a new, antioxidant-insensitive free radical species. *Transplantation* 59(5):674. (1995)
- Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 27(6):1652. (1998)

- García Ureña MA, Colina Ruiz-Delgado F, Moreno González E, Jiménez Romero C, García García I, Loinaz Seguro C, Gonzalez Pinto, Gómez Sanz R. Hepatic steatosis in liver transplant donors: common feature of donor population? *World J Surg* 22:837. (1998)
- García-Valdecasas JC, González FJ, Grande L, Rimola A, Navasa M, Fuster J, Lacy AM, Cugat E, Visa J. The use of the University of Wisconsin (UW) and Euro-Collins (EC) solutions either alone or in a combined method. *Transpl Int* 5(2):77. (1992)
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 199(3):493. (1992)
- Geller D, Chia S, Takahashi Y, Yagnik G, Tsoulfas G, Nurase N. Protective role of L-arginine-nitric oxide synthase pathway on preservation injury after rat liver transplantation. *J Parenter Enteral Nutr* 25:142. (2001)
- Gerbes AL, Vollmar AM, Kierner AK, Bilzer M. The guanylate cyclase-coupled natriuretic peptide receptor: a new target for prevention of cold ischemia-reperfusion damage of the rat liver. *Hepatology* 28:1309. (1998)
- Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *J Hepatol* 38(1):59. (2003)
- Glazeir SS, O'Rourke DM, Graham DI, Welsh FA. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:545. (1994)
- Gondolesi GE, Lausada N, Schinella G, Semplici AM, Vidal MS, Luna GC, Toledo J, de Buschiazzo PM, Raimondi JC. Reduction of ischemia-reperfusion injury in parenchymal and nonparenchymal livers cells by donor treatment with DL-alpha-tocopherol prior to organ harvest. *Transplant Proc* 34(4):1086. (2002)
- Gong JP, Tu B, Wang W, Peng Y, Li SB, Yan LN. Protective effect of nitric oxide induced by ischemic preconditioning on reperfusion injury of rat liver graft. *World J Gastroenterol* 10(1):73. (2004)
- Goto M, Takei Y, Kawano S, Tsuji S, Fukui H, Fushimi H, Nishimura Y, Kashiwagi T, Fusamoto H, Kamada T. Tumor necrosis factor and endotoxin in the pathogenesis of liver and pulmonary injuries after orthotopic liver transplantation in the rat. *Hepatology* 16(2):487. (1992)
- Grande L, Matus D, Manyalic M, Cabrer C, Rodriguez-Montalvo C, Rimola A, Navasa M, García-Valdecasas JC, Visa J. Effect of donor age on graft outcome after liver transplantation. *Transplant Proc* 31(6):2482. (1999)
- Grattagliano I, Vendemiale G, Lauterburg BH. Reperfusion injury of the liver: role of mitochondria and protection by glutathione ester. *J Surg Res* 86(1):2. (1999)
- Greenacre SAB, Evans P, Halliwell B, Brain SD. Formation and loss of nitrated proteins in peroxynitrite-treated rat skin in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 262:781. (1999)
- Grisham MB, Jourdain D, Wink DA. Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 276:G315. (1999)
- Grum CM, Ragsdale RA, Ketani LH, Simon RH. Plasma xanthine oxidase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *J Crit Care* 79:1564. (1991)
- Haberal M, Dalgic A. New concepts in organ transplantation. *Transplant Proc* 36:1219. (2004)
- Habib N, Tanaka K. Living related liver transplantation in adult recipients: a hypothesis: *Clin Transplant* 9:31. (1995)

- Hakamada K, Sasaki M, Takahashi K, Umehara Y, Konn M. Sinusoidal flow block after warm ischemia in rats with diet-induced fatty liver. *J Surg Res* 70(1):12. (1997)
- Harada H, Wakabayashi G, Takayanagi A, Shimazu M, Matsumoto K, Obara H, Shimizu N, Kitajima M. Transfer of the interleukin-1 receptor antagonist gene into rat liver abrogates hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 74(10):1434. (2002)
- Hardie DG. Minireview: The AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular status. *Endocrinology* 144(12):5179. (2003)
- Harris CM, Massey V. The oxidative half-reaction of xanthine dehydrogenase with NAD; reaction kinetics and steady-state mechanism. *J Biol Chem* 272(45):28335. (1997)
- Hashimoto K, Nishizaki T, Yoshizumi T, Uchiyama H, Okano S, Ikegami T, Yanaga K, Sugimachi K. Beneficial effect of FR167653 on cold ischemia/reperfusion injury in rat liver transplantation. *Transplantation* 70(9):1318. (2000)
- Hattori R, Ohshima S, Ono Y, Fujita T, Kinukawa T, Matsuura O. Long-term outcome of kidney transplants from non-heart-beating donors: multivariate analysis of factors affecting graft survival. *Transplant Proc* 31(7):2847. (1999)
- Hayashi M, Tokunaga Y, Fujita T, Tanaka K, Yamaoka Y, Ozawa K. The effects of cold preservation on steatotic graft viability in rat liver transplantation. *Transplantation* 56(2):282. (1993)
- Hayashi M, Fujii K, Kiuchi T, Uryuhara K, Kasahara M, Takatsuki M, Takeichi T, Kitade H, Sugimoto T, Uemoto S, Asonuma K, Egawa H, Fujita S, Inomata Y, Tanaka K. Effects of fatty infiltration of the graft on the outcome of living-related liver transplantation. *Transplant Proc* 31(1-2):403. (1999)
- Henderson JM. Liver transplantation and rejection: an overview. *Hepatology* 46 (Suppl 2):1482. (1999)
- Hines IN, Kawachi S, Harada H, Pavlick KP, Hoffman JM, Bharwani S, Wolf RE, Grisham MB. Role of nitric oxide in liver ischemia and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 234-235(1-2):229. (2002)
- Hisama N, Yamaguchi Y, Ishiko T, Miyanari N, Ichiguchi O, Goto M, Mori K, Watanabe K, Kawamura K, Tsurufuji S, Ogawa M. Kupffer cell production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia/reperfusion injury in rats. *Hepatology* 24(5):1193. (1996)
- Hong F, Radaeva S, Pan HN, Tian Z, Veech R, Gao B. Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver disease. *Hepatology* 40(4):933. (2004)
- Hortelano S, Genaro A, Boscá L. Phorbol esters induce nitric oxide synthase activity in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 267:24937. (1992)
- Hoshida S, Yamashita N, Otsu K, Hori M. Repeated physiologic stresses provide persistent cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Am Coll Cardiol* 40(4):826. (2002)
- Hotter G, Closa D, Prados M, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 222(1):27. (1996)
- Howell JG, Zibari GB, Brown MF, Burney DL, Sawaya DE, Olinde JG, Granger DN, McDonald JC. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. *Transplantation* 69(2):300. (2000)

- Hui AM, Kawasaki S, Makuuchi M, Nakayama J, Ikegami T, Miyagawa S. Liver injury following normothermic ischemia in steatotic rat liver. *Hepatology* 20(5):1287. (1994)
- Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, Lee JH. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF- κ B. *BBRC* 261:917. (1999)
- Ichimori K, Fukahori M, Nakazawa H, Okamoto K, Nishino T. Inhibition of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by nitric oxide. Nitric oxide converts reduced xanthine-oxidizing enzymes into the desulfo-type inactive form. *J Biol Chem* 274(12):7763. (1999)
- Ijaz S, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Impairment of hepatic microcirculation in fatty liver. *Microcirculation* 10(6):447. (2003)
- Imamura H, Sutto F, Brault A, Huet P-M. Role of Kupffer cells in cold ischemia-reperfusion of rat liver. *Gastroenterology* 109:189. (1995)
- Imber CJ, St. Peter SD, Handa A and Friend PJ. Hepatic steatosis and its relationship to transplantation. *Liver Transplantation* 8(5):415. (2002)
- Inglott F, Mathie R. Nitric oxide and hepatic ischemia-reperfusion injury. *HepatoGastroenterology* 47:1722. (2000)
- Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, Korthuis RJ. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock* 8(2):86. (1997)
- Ishii S, Abe T, Saito T, Tsuchiya T, Kanno H, Miyazawa M, Suzuki M, Motoki R, Gotoh M. Effects of preconditioning on ischemia/reperfusion injury of hepatocytes determined by immediate early gene transcription. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 8:461. (2001)
- Isobe M, Katsuramaki T, Hirata K, Kimura H, Nagayama M, Matsuno T. Beneficial effects of inducible nitric oxide synthase inhibitor on reperfusion injury in the pig liver. *Transplantation* 68(6):803. (1999)
- Ito K, Ozasa H, Sanada K, Horikawa S. Doxorubicin preconditioning: a protection against rat hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 31:416. (2000)
- Iwasaki Y, Tagaya N, Hattori Y, Yamaguchi K, Kubota K. Protective effect of ischemic preconditioning against intermittent warm-ischemia-induced liver injury. *J Surg Res* 107(1):82. (2002)
- Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 4(15):3355. (1990)
- Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 260(3 Pt 1):G355. (1991a)
- Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic Res Commun* 15:277. (1991b)
- Jaeschke H. Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem Biol Interact* 79(2):115. (1991c)
- Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukoc Biol* 52(4):377. (1992a)
- Jaeschke H, Schini VB, Farhood A. Role of nitric oxide in the oxidant stress during ischemia/reperfusion injury of the liver. *Life Sci* 50(23):1797. (1992b)

- Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ, Smith CW. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 17(5):915. (1993)
- Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol* 25(5):774. (1996)
- Jaeschke H, Smith CW. Mechanism of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 61:647. (1997)
- Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 5(4):402. (1998)
- Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 15:718. (2000)
- Jaeschke H. Xanthine oxidase-induced oxidant stress during hepatic ischemia-reperfusion: are we coming full circle after 20 years? *Hepatology* 36(3):761. (2002a)
- Jaeschke H. Reperfusion injury after warm ischemia or cold storage of the liver: role of apoptotic cell death. *Transplant Proc* 34:2656. (2002b)
- Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(1):G15. (2003a)
- Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 125:1246. (2003b)
- Javaux F, Vincent MF, Wagner DR, Van der Bergue G. Cell-type specificity of inhibition of glycolysis by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside. Lack of effect in rabbit cardiomyocytes and human erythrocytes, and inhibition in FTO-2B rat hepatoma cells. *Biochem J* 305:913. (1995)
- Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart* 77(4):314. (1997)
- Jiménez Romero C, Moreno González E, Colina Ruiz F, Palma Carazo F, Loinaz Seguro C, Rodríguez Gonzalez F, Gonzalez Pinto I, García García I, Rodríguez Romano D, Moreno Sanz C. Use of octogenarian livers safely expands the donor pool. *Transplantation* 68(4):572. (1999)
- Jones SM, Thurman RG. L-arginine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow model of liver perfusion. *Hepatology* 24(1):163. (1996)
- Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 28(1):47. (1979)
- Kang KJ. Mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury and protection against reperfusion injury. *Transplant Proc* 34:2659. (2002)
- Kawachi S, Hines IN, Laroux FS, Hoffman J, Bharwani S, Gray L, Leffer D, Grisham MB. Nitric oxide synthase and postischemic liver injury. *Biochem Biophys Res Commun* 276(3):851. (2000)
- Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* 213(2):815. (1993)

- Kawamura E, Yamanaka N, Okamoto E, Tomoda F, Furukawa K. Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 21:1138. (1995)
- Kazuo H, Nishida T, Seiyama A, Ueshima S, Hamada E, Ito T, Matsuda H. Recovery of blood flow and oxygen transport after temporary ischemia of rat liver. *Am J Physiol* 275(1 Pt 2):H243. (1998)
- Keswani RN, Ahmed A, Keefe EB. Older age and liver transplantation: a review. *Liver Transpl* 10(8):957. (2004)
- Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, Vogel M, Sorensen K, Redington AN, MacAllister R. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation* 106(23):2881. (2002)
- Kiemer AK, Gerbes AL, Bilzer M, Vollmar AM. The atrial natriuretic peptide and cGMP: novel activators of the heat shock response in rat livers. *Hepatology* 35:88. (2002)
- Kitade H, Sakitani K, Inoue K, Masu Y, Kawada N, Hiramatsu Y, Kamiyama Y, Okumura T, Ito S. Interleukin 1 β markedly stimulates nitric oxide formation in the absence of other cytokines or lipopolysaccharide in primary cultured rat hepatocytes but not in Kupffer cells. *Hepatology* 23(4):797. (1996)
- Kito K, Arai T, Mori K, Morikawa S, Inubushi T. Hepatic blood flow and energy metabolism during hypotension induced by prostaglandin E1 and nicardipine in rabbits: an in vivo magnetic resonance spectroscopic study. *Anesth Analg* 77(3):606. (1993)
- Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Takeuchi Y, Harada A, Nakao A, Takagi H. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 59(6):772. (1995)
- Koeppel TA, Lehmann TG, Thies JC, Gehrcke R, Gebhard MM, Herfarth C, Otto G, Post S. Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 61(9):1397. (1996)
- Koeppel TA, Thies JC, Schemmer P, Trauner M, Gebhard MM, Otto G, Post S. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol* 27(1):163. (1997)
- Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 67(8):1099. (1999)
- Koken T, Inal M. The effect of nitric oxide on ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Clin Chim Acta* 288(1-2):55. (1999)
- Koneru B, Reddy MC, dela Torre AN, Patel D, Ippolito T, Ferrante RJ. Studies of hepatic warm ischemia in the obese Zucker rat. *Transplantation* 59(7):942. (1995)
- Koneru B and Dikdan G. Hepatic steatosis and liver transplantation current clinical and experimental perspectives. *Transplantation* 73(15):325. (2002)
- Kooij A. A re-evaluation of the tissue distribution of physiology of xanthine oxidoreductase. *Histochem J* 26:889. (1994)
- Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 21(1):89. (2001)
- Koti RS, Yang W, Dashwood MR, Davidson BR, Seifalian AM. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transpl* 8(12):1182. (2002)

- Koti RS, Tsui JC, Lobos E, Yang W, Seifalian AM, Davidson BR. Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver. *FASEB J* May 3. (2005a)
- Koti RS, Yang W, Glantzounis G, Quaglia A, Davidson BR, Seifalian AM. Effect of ischaemic preconditioning on hepatic oxygenation, microcirculation and function in a rat model of moderate hepatic steatosis. *Clin Sci* 108(1):55. (2005b)
- Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, Yagi T, Nakagami M, Takada Y, Morimoto T, Yamaoka Y. Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 128: 251. (1996)
- Kuzume M, Nakano H, Yamuchi M, Matsumiya A, Shimokohbe G, Kitamura N, Nagasaki H, Kumada K. A monoclonal antibody against ICAM-1 suppresses hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Eur Surg Res* 29:93. (1997)
- Laight DW, Desai KM, Gopaul NK, Anggard EE, Carrier MJ. F2-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat: effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol* 377(1):89. (1999)
- Langle F, Steininger R, Waldmann E, Grunberger T, Benditte H, Mittlbock M, Soliman T, Schindl M, Windberger U, Muhlbacher F, Roth E. Improvement of cardiac output and liver blood flow and reduction of pulmonary vascular resistance by intravenous infusion of L-arginine during the early reperfusion period in pig liver transplantation. *Transplantation* 63(9):1225. (1997)
- Lanir A, Jenkins RL, Caldwell C, Lee RG, Khetry U, Clouse ME. Hepatic transplantation survival: correlation with adenine nucleotide level in donor liver. *Hepatology* 8(3):471. (1988)
- Lanteri R, Greco R, Licitra E, Di Benedetto F, Li Destri G, Di Cataldo A. Ischemia and hepatic reperfusion: is it possible to reduce hepatic alterations? *Microsurgery* 23(5):458. (2003)
- Le Moine O, Louis H, Stordeur P, Collet JM, Goldman M, Deviere J. Role of reactive oxygen intermediates in interleukin 10 release after cold liver ischemia and reperfusion in mice. *Gastroenterology* 113(5):1701. (1997)
- Leclerc IA, Kahn A, Doiron B. The 5'-AMP-activated protein kinase inhibits the transcriptional stimulation by glucose in liver cells, acting through the glucose response complex. *FEBS Lett* 17:180. (1998)
- Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 105(8):1067. (2000)
- Leducq N, Delmas-Beauvieux MC, Bourdel-Marchasson I, Dufour S, Gallis JL, Canioni P, Diolez P. Mitochondrial and energetic dysfunctions of the liver during normothermic reperfusion: protective effect of cyclosporine and role of the mitochondrial permeability transition pore. *Transplant Proc* 32(2):479. (2000)
- Lee VC, Johnson ML, Baust J, Laubach VE, Watkins SC, Billiar TR. The role of iNOS in liver ischemia-reperfusion injury. *Shock* 16:335. (2001)
- Lehmann TG, Wheeler MD, Schwabe RF, Connor HD, Schoonhoven R, Bunzendahl H, Brenner DA, Samulski RJ, Zhong Z, Thurman RG. Gene delivery of Cu/Zn-superoxide dismutase improves graft function after transplantation of fatty livers in the rat. *Hepatology* 32(6):1255. (2000)
- Lehmann TG, Wheeler MD, Froh M, Schwabe RF, Bunzendahl H, Samulski RJ, Lemasters JJ, Brenner DA, Thurman RG. Effects of three superoxide dismutase gene delivered with an

- adenovirus on graft function after transplantation of fatty livers in the rat. *Transplantation* 76:28. (2003)
- Lemasters JJ, Gao W, Currin RT, Thurman RG. Ultrastructure of livers from alcohol-treated rats following orthotopic liver transplantation. *Toxicologist* 14:284. (1994)
- Lemasters JJ, Thurman RG. The many facets of reperfusion injury. *Gastroenterology* 108(4):1317. (1995a)
- Lemasters JJ, Bunzendahl H, Thurman RG. Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. *Liver Transplant Surg* 1:124. (1995b)
- Lemasters JJ, Thurman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:327. (1997)
- Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 32(2):169. (2000)
- Letteron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol* 24(2):200. (1996)
- Li SQ, Liang LJ, Huang JF, Li Z. Ischemic preconditioning protects liver from hepatectomy under hepatic inflow occlusion for hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis. *World J Gastroenterol* 10(17):2580. (2004)
- Lichtman SN, Lemasters JJ. Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver. *Semin Liver Dis* 19:171. (1999)
- Light JA, Barhyte DY, Gage FA, Sasaki TM, Aquino AO. Long-term graft survival after transplantation with kidneys from uncontrolled nonheartbeating donors. *Transplantation* 68(12):1910. (1999)
- Link EM. Enzymatic pathways involved in cell response to H₂O₂. *Free Radic Res Commun* 11(1-3):89. (1990)
- Liu P, Hock CE, Nagele R, Wong PY. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol* 272(5 Pt 2):H2327. (1997)
- Liu P, Xu B, Hock CE, Nagele R, Sun FF, Wong PY. NO modulates P-selectin and ICAM-1 mRNA expression and hemodynamic alterations in hepatic I/R. *Am J Physiol* 275(6 Pt 2):H2191. (1998a)
- Liu P, Yin K, Nagele R, Wong PY. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxynitrite generation, but augments neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 284(3):1139. (1998b)
- Loinaz C, Gonzalez EM. Marginal donors in liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 47:256. (2000)
- Lucey MR, Brown KA, Everson GT, Fung JJ, Gish R, Keeffe EB, Kneteman NM, Lake JR, Martin P, McDiarmid SV, Rakela J, Shiffman ML, So SK, Wiesner RH. Minimal criteria for placement of adults on the liver transplant waiting list: a report of a national conference organized by the American Society of Transplant Physicians and the American Association for the Study of Liver Diseases. *Transplantation* 66(7):956. (1998)
- Lutterová M, Kukan M, Vajdová K, Kuba D, Mišlanová C, Kebis A, Danninger F, Mráz P. Protection of the rat liver against rewarming ischemic injury by University of Wisconsin solution. *Langenbeck's Arch Surg* 386:31. (2001)

- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. Peroxynitrite-mediated inactivation of Manganese Superoxide Dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 37:1613. (1998)
- Malhi H, Gorla GR, Irani AN, Annamaceri P, Gupta S. Cell transplantation after oxidative hepatic preconditioning with radiation and ischemia-reperfusion leads to extensive liver repopulation. *PNAS* 99(20):13114. (2002)
- Manzarbeitia CY, Ortiz JA, Jeon H, Rothstein KD, Martinez O, Araya VR, Munoz SJ, Reich DJ. Long-term outcome of controlled, non-heart-beating donor liver transplantation. *Transplantation* 78(2):211. (2004)
- Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 88(3):1264. (1993)
- Marcos A, Ham JM, Fisher RA, Olzinski AT, Posner MP. Single-center analysis of the first 40 adult-to-adult living donor liver transplants using the right lobe. *Liver Transpl* 6(3):296. (2000)
- Markin RS, Wisecarver JL, Radio SJ, Stratta RJ, Langnas AN, Hirst K, Shaw BW JR. Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. *Transplantation* 56:1403. (1993)
- Marsman WA, Wiesner RH, Rodriguez L, Batts KP, Porayko MK, Hay JE, Gores GJ, Krom RA. Use of fatty donor liver is associated with diminished early patient and graft survival. *Transplantation* 62:1246. (1996)
- Martínez-Mier G, Toledo-Pereyra LH, McDuffie JE, Warner RL, Ward PA. Neutrophil depletion and chemokine response after liver ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 14(2):99. (2001)
- Marubayashi S, Oshiro Y, Maeda T, Fukuma K, Okada K, Hinoi T, Ikeda M, Yamada K, Itoh H, Dohi K. Protective effect of monoclonal antibodies to adhesion molecules on rat liver ischemia-reperfusion injury. *Surgery* 122 :45. (1997)
- Marzi I, Knee J, Menger MD, Harbauer G, Buhren V. Hepatic microcirculatory disturbances due to portal vein clamping in the orthotopic rat liver transplantation model. *Transplantation* 52(3):432. (1991)
- Mathews WR, Guido DM, Fisher MA, Jaeschke H. Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia. *Free Radic Biol Med* 16(6):763. (1994)
- Matsumoto K, Honda K, Kobayashi N. Protective effect of heat preconditioning of rat liver graft resulting in improved transplant survival. *Transplantation* 71(7):862. (2001)
- Matsuyama K, Chiba Y, Ihaya A, Kimura T, Tanigawa N, Muraoka R. Effect of spinal cord preconditioning on paraplegia during cross-clamping of the thoracic aorta. *Ann Thorac Surg* 63(5):1315. (1997)
- Mayoral P, Criado M, Hidalgo F, Flores O, Arévalo MA, Eleno N, Sanchez-Rodriguez A, Lopez-Novoa JM, Esteller A. Effects of chronic nitric oxide activation or inhibition on early hepatic fibrosis in rats with bile duct ligation. *Clin Sci* 96:297. (1999)
- Melendez HV, Heaton ND. Understanding "marginal" liver grafts. *Transplantation* 68(4):469. (1999)
- Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B, Glasz J. Role of microcirculation in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 46:1452. (1999)

- Miki C, Iriyama K, Mirza DF, Mayer AD, Buckels JAC, Suzuki H, McMaster P. Postperfusion energy metabolism of steatotic graft and its relation to early graft viability following liver transplantation. *Dig Dis Sci* 43(1):74. (1998)
- Minato K, Miyake Y, Fukumoto S, Yamamoto K, Kato Y, Shimomura Y, Osawa T. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life Sci* 72:1609. (2003)
- Minor T, Akbar S, Tolba R, Dombrowski F. Cold preservation of fatty liver grafts: prevention of functional and ultrastructural impairments by venous oxygen persufflation. *J Hepatol* 32(1):105. (2000)
- Mittnacht S, Sherman SC, Farber JL. Reversal of ischemic mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem* 254:9871. (1979)
- Mizoe A, Kondo S, Azuma T, Fujioka H, Tanaka K, Hashida M, Kanematsu T. Preventive effects of superoxide dismutase derivatives modified with monosaccharides on reperfusion injury in rat liver transplantation. *J Surg Res* 73(2):160. (1997)
- Mochida S, Arai M, Ohno A, Masaki N, Ogata I, Fujiwara K. Oxidative stress in hepatocytes and stimulatory state of Kupffer cells after reperfusion differ between warm and cold ischemia in rats. *Liver* 14(5):234. (1994)
- Mojena M, Hortelano S, Castrillo A, Díaz-Guerra MJ, García-Barchino MJ, Seaz GT, Bosca L. Protection by nitric oxide against liver inflammatory injury in animals carrying a nitric oxide synthase-2 transgene. *FASEB J* 15:583. (2001)
- Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature* 3:214. (2002)
- Montalti R, Nardo B, Bertelli P, Beltempo P, Puviani L, Vivarelli M, Cavallari A. Donor pool expansion in liver transplantation. *Transplant Proc* 36:520. (2004)
- Monteiro E, Perdigoto R, Furtado AL. Liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy. *Hepatology* 45(23):1375. (1998)
- Moreno C, Jimenez C, Hernandez D, Scoane J, Palomo JC, Moreno E. Disfunción primaria del hígado transplantado. *Avances en trasplantes de órganos abdominales. Cuadecon S.L.* 267. (1997)
- Mühlbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation solutions for transplantation. *Transplant Proc* 31:2069. (1999)
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74(5):1124. (1986)
- Naito Y, Yoshikawa T, Matsuyama K, Yagi N, Arai M, Nakamura Y, Kaneko T, Yoshida N, Kondo M. Neutrophils, lipid peroxidation, and nitric oxide in gastric reperfusion injury in rats. *Free Radic Biol Med* 24(3):494. (1998)
- Nakano H, Nagasaki H, Barama A, Boudjema K, Jaeck D, Kumada K, Tatsuno M, Baek Y, Kitamura N, Suzuki T, Yamaguchi M. The effects of N-acetylcysteine and anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody against ischemia-reperfusion injury of the rat steatotic liver produced by a choline-methionine-deficient diet. *Hepatology* 26(3):670. (1997)
- Nakano H, Yamaguchi M, Kaneshiro Y, Yoshida K, Kigawa G, Nagasaki H, Fujiwara Y, Matsumoto F, Kitamura N, Sasaki J, Kuzume M, Takeuchi S, Kumada K. S-adenosyl-methionine attenuates ischemia-reperfusion injury in steatotic livers. *Transplant Proc* 30:3735. (1998)

- Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S, Ishikawa Y, Ozaki N, Shimahara Y, Yamaoka Y. Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery* 126(5):945. (1999)
- Nardo B, Grattagliano I, Domenicali M, Caraceni P, Catena F, Santoni B, Turi P, Cavallari G, Dall'Agata M, Trevisani F, Bernardi M, Cavallari A. Mitochondrial oxidative injury in rat fatty livers exposed to warm ischemia-reperfusion. *Transplant Proc* 32(1):51. (2000)
- Nardo B, Caraceni P, Pasini P, Domenicali M, Catena F, Cavallari G, Santoni B, Maiolini E, Grattagliano I, Vendemiale G, Trevisani F, Roda A, Bernardi M, Cavallari A. Increased generation of reactive oxygen species in isolated rat fatty liver during postischemic reoxygenation. *Transplantation* 71(12):1816. (2001)
- Natori S, Selzner M, Valentino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA, Gores GJ. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 68(1):89. (1999)
- Natori S, Higuchi H, Contreras P, Gores GJ. The caspase inhibitor IDN-6556 prevents caspase activation and apoptosis in sinusoidal endothelial cells during liver preservation injury. *Liver Transpl* 9(3):278. (2003)
- Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 213(2):137. (1991)
- Neuberger J. Liver transplantation. *J Hepatol* 32(1 Suppl):198. (2000)
- Neuberger J. Developments in liver transplantation. *Gut* 53(5):759. (2004)
- Nilsson B, Friman S, Gustafsson BI, Delbro DS. Preconditioning protects against ischemia/reperfusion injury of the liver. *J Gastrointest Surg* 4:44. (2000)
- Nishimura Y, Takei Y, Kawano S, Yoshihara H, Goto M, Hijioka T, Fukui H, Oshita M, Fusamoto H, Kamada T. Long-term storage of liver grafts is associated with a postoperative elevation of tumor necrosis factor: a possible role in the pathogenesis of primary nonfunction of the graft and pulmonary complications. *Transplant Proc* 25(1 Pt 1):130. (1993)
- Nomura K, Yano E, Shinozaki T, Tagawa K. Efficacy and effectiveness of liver screening program to detect fatty liver in the periodic health check-ups. *J Occup Health* 46(6):423. (2004)
- Nuzzo G, Giuliante F, Vellone M, De Cosmo G, Ardito F, Murazio M, D'Acapito F, Giovannini I. Pedicle clamping with ischemic preconditioning in liver resection. *Liver Transpl* 10(2 Suppl 1):S53. (2004)
- Ohmori H, Dhar DK, Nakashima Y, Hashimoto M, Masumura S, Nagasue N. Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor, on reperfusion injury of rat liver. *Transplantation* 66(5):579. (1998)
- Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351. (1978)
- Okuaki Y, Miyazaki H, Zeniya M, Ishikawa T, Ohkawa Y, Tsuno S, Sakaguchi M, Hara M, Takahashi H, Toda G. Splenectomy-reduced hepatic injury induced by ischemia/reperfusion in the rat. *Liver* 16(3):188. (1996)
- Organización Nacional de Trasplante. <http://www.ont.es>

- Otsuka M, Tkada Y, Fukunaga K, Taniguchi H, Todoroki T. Activation of intracellular neutrophil elastase in the transplantation of ischemic liver. *Eur Surg Res* 33(5-6):355. (2001)
- Pabla R, Buda AJ, Flynn DM, Blesse SA, Shin AM, Curtis MJ, Lefer DJ. Nitric oxide attenuates neutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischemia and reperfusion. *Circ Res* 78(1):65. (1996)
- Pacheco-Moreira LF, de Oliveira ME, Balbi E, da Silva AC, Miecznikowski R, de Faria LJ, Andre RP, Pereira JL, Muharre RJ, Martinho JM. A new technical option for domino liver transplantation. *Liver Transpl* 9(6):632. (2003)
- Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 29(6):782. (1995)
- Pannen BH, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 27(3):755. (1998)
- Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 29(2):106. (2005)
- Pedotti P, Cardillo M, Rigotti P, Gerunda G, Merenda R, Cillo U, Zanusi G, Baccarani U, Berardinelli ML, Boschiero L, Caccamo L, Calconi G, Chiaramonte S, Canton AD, De Carlis L, Di Carlo V, Donati D, Pulvirenti A, Remuzzi G, Sandrini S, Valente U, Scalapogna M. A comparative prospective study of two available solutions for kidney and liver preservation. *Transplantation* 77(10):1540. (2004)
- Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpí E, Prats N, Roselló-Catafau J. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 229(1):264. (1996)
- Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpí E, Bulbena O, Roselló-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 25(4):934. (1997)
- Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpí E, Roselló-Catafau J, Hotter G. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 28(3):768. (1998)
- Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Roselló-Catafau J. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 29(1):126. (1999a)
- Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 30(6):1481. (1999b)
- Peralta C, Bartrons R, Riera L, Manzano A, Xaus C, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(1):G163. (2000)
- Peralta C, Rull R, Rimola A, Deulofeu R, Roselló-Catafau J, Gelpí E, Rodes J. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 71(4):529. (2001a)
- Peralta C, Bartrons R, Serafín A, Blazquez C, Guzman M, Prats N, Xaus C, Cutillas B, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 34(6):1164. (2001b)

- Peralta C, Fernández L, Panes J, Prats N, Sans M, Pique JM, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 33(1):100. (2001c)
- Peralta C, Bulbena O, Xaus C, Prats N, Cutrin JC, Poli G, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation* 73(8):1203. (2002)
- Pesonen EJ, Linder N, Raivio KO, Sarnesto A, Lapatto R, Hockerstedt K, Makisalo H, Andersson S. Circulating xanthine oxidase and neutrophil activation during human liver transplantation. *Gastroenterology* 114(5):1009. (1998)
- Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, Sasaki T, Sollinger HW, Belzer FO, Kalayoglu M. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation-a multivariate analysis. *Transplantation* 55:807. (1993)
- Pocock G, Richards C.D. La base de la medicina. *Fisiología Humana*. (2002)
- Porte RJ, Ploeg RJ, Hansen B, van Bockel JH, Thorogood J, Persijn GG, Hermans J, Terpstra OT and the European Muticentre Study Group. Long-term graft survival after transplantation in the UW era: late effects of cold ischemia and primary dysfunction. *Transpl Int* 11(Suppl 1):S164. (1998)
- Qian T, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol* 273(6 Pt 1):C1783. (1997)
- Que X, Debonera F, Xie J, Furth EE, Aldeguer X, Gelman AE, Olthoff KM. Pattern of ischemia reperfusion injury in a mouse orthotopic liver transplant model. *J Surg Res* 116(2):262. (2004)
- Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from live donors. *Lancet* 2(8661):497 (1989)
- Rashid A, Wu TC, Huang CC, Chen CH, Lin HZ, Yang SQ, Lee FY, Diehl AM. Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology* 29(4):1131. (1999)
- Redaelli CA, Tian YH, Schaffner T, Ledermann M, Baer HU, Dufour JF. Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1. *Hepatology* 35(5):1082. (2002)
- Reddy MC, Koneru B, Soni S, Patel D. ³¹P nuclear magnetic resonance study of phospholipids in ischemia/reperfusion injury in a rat fatty liver model. *Transplantation* 61(8):1151. (1996)
- Reddy S, Zilvetti M, Brockmann J, McLaren A, Friend P. Liver transplantation from non-heart-beating donors: current status and future prospects. *Liver Transpl* 10:1123. (2004)
- Ricci C, Longo R, Gioulis E, Bosco M, Pollesello P, Masutti F, Croce LS, Paoletti S, de Bernard B, Tiribelli C, Dalla Palma L. Noninvasive in vivo quantitative assessment of fat content in human liver. *J Hepatol* 27(1):108. (1997)
- Ricciardi R, Meyers WC, Schaffer BK, Kim RD, Shah SA, Wheeler SM, Donohue SE, Sheth KR, Callery MP, Chari RS. Protein kinase C inhibition abrogates hepatic ischemic preconditioning responses. *J Surg Res* 97(2):144. (2001a)
- Ricciardi R, Schaffer BK, Kim RD, Shah SA, Donohue SE, Wheeler SM, Quarfordt SH, Callery MP, Meyers WC, Chari RS. Protective effects of ischemic preconditioning on the cold-preserved liver are tyrosine kinase dependent. *Transplantation* 72(3):406. (2001b)
- Ricciardi R, Shah SA, Wheeler SM, Quarfordt SH, Callery MP, Meyers WC, Chari RS. Regulation of NFκB in hepatic ischemic preconditioning. *J Am Coll Surg* 195(3):319. (2002)

- Risby TH, Maley W, Scott RP, Bulkley GB, Kazui M, Sehnert SS, Schwarz KB, Potter J, Mezey E, Klein AS. Evidence for free radical-mediated lipid peroxidation at reperfusion of human orthotopic liver transplants. *Surgery* 115(1):94. (1994)
- Rivera-Chavez FA, Toledo-Pereyra LH, Dean RE, Crouch L, Ward PA. Exogenous and endogenous nitric oxide but not iNOS inhibition improves function and survival of ischemically injured livers. *J Invest Surg* 14(5):267. (2001)
- Rocha MB, Boin IF, Escanhoela CA, Leonardi LS. Can the use of marginal liver donors change recipient survival rate? *Transplant Proc* 36(4):914. (2004)
- Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 114(2):344. (1998)
- Roth S, Li b, Rosenbaum PS, Gupta H, Goldstein IM, Maxwell KM, Gidday JM. Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:777. (1998)
- Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but no Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 122(1):202. (2002a)
- Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning, intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 235:400. (2002b)
- Saito T, Ishii S, Abe T, Tsuchiya T, Kanno H, Miyazawa M, Suzuki M, Gotoh M. Effect of preconditioning in the liver against ischemia/reperfusion injury, protection of sinusoidal cells and alterations of gene transcription. *Transplant Proc* 33:849. (2001)
- Salizzoni M, Franchello A, Zamboni F, Ricchiuti A, Cocchis D, Fop F, Brunati A, Cerutti E. Marginal grafts: finding the correct treatment for fatty livers. *Transpl Int* 16(7):486. (2003)
- Sankary HN, Foster P, Brown E, Williams J. Do splanchnic viscera contribute to liver preservation reperfusion injury? *Transplantation* 61(8):1142. (1996)
- Sankary HN, Yin DP, Chong AS, Ma LL, Blinder L, Shen JK, Foster P, Liu LP, Li C, Williams JW. The portosystemic shunt protects liver against ischemic reperfusion injury. *Transplantation* 68(7):958. (1999)
- Saugstad OD, Aasen AO. Plasma hypoxanthine concentrations in pigs. A prognostic aid in hypoxia. *Eur Surg Res* 12(2):123. (1980)
- Saugstad OD. Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury. *Pediatrics* 98(1):103. (1996)
- Sawaya DE Jr, Brown M, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger DN, McDonald JC, Zibari GB. The role of ischemic preconditioning in the recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 85(1):163. (1999)
- Schauer RJ, Kalmuk S, Gerbes AL, Leiderer R, Meissner H, Schildberg FW, Messmer K, Bilzer M. Intravenous administration of glutathione protects parenchymal and non-parenchymal liver cells against reperfusion injury following rat liver transplantation. *World J Gastroenterol* 10:864. (2004)
- Schlegel J, Peters I, Orrenius S, Miller DK, Thornberry NA, Yamin TT, Nicholson DW. CPP32/Apopain is a key interleukin 1 β converting enzyme-like protease involved in fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 271(4):1841. (1996)

- Schlossberg H, Zhang Y, Dudus L, Engelhardt JF. Expression of c-fos and c-jun during hepatocellular remodeling following ischemia/reperfusion in mouse liver. *Hepatology* 23(6):1546. (1996)
- Schmekel B, Karlsson SE, Linden M, Sundstrom C, Tegner H, Venge P. Myeloperoxidase in human lung lavage. I. A marker of local neutrophil activity. *Inflammation* 14(4):447. (1990)
- Schmidt HH, Nashan B, Propsting MJ, Nakazato M, Flemming P, Kubicka S, Boker K, Pichlmayr R, Manns MP. Familial Amyloidotic Polyneuropathy: domino liver transplantation. *J Hepatol* 30(2):293. (1999)
- Schulak JA. What's new in general surgery: transplantation. *J Am Coll Surg* 200(3):409. (2005)
- Seifalian AM, Mallet SV, Rolles K, Davidson BR. Hepatic microcirculation during orthotopic liver transplantation. *Br J Surg* 84:1391. (1997)
- Seifalian AM, Chidambaram V, Rolles K, Davidson BR. In vivo demonstration of impaired microcirculation in steatotic human liver grafts. *Liver Transpl Surg* 4(1):71. (1998)
- Seifalian AM, Piasecki C, Agarwal A, Davidson BR. The effect of graded steatosis on flow in the hepatic parenchymal microcirculation. *Transplantation* 68(6):780. (1999)
- Seino Y, Ohki K, Nakamura T, Tsukamoto H, Takano T, Aramaki T, Okumura H, Hayakawa H. Pathophysiological characteristics of cutaneous microcirculation in patients with liver cirrhosis: relationships to cardiovascular hemodynamics and plasma neurohormonal factors. *Microvasc Res* 46(2):206. (1993)
- Selzner M, Camargo CA, Clavien PA. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6. *Hepatology* 30:469. (1999)
- Selzner M, Rudiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology* 32(6):1280. (2000)
- Selzner M, Clavien PA. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin Liver Dis* 21(1):105. (2001)
- Selzner M, Rudiger H, Selzner N, Thomas DW, Sindram D, Clavien PA. Bcl-2 overexpression in transgenic mice protects against ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Hepatol* 36:218. (2002)
- Selzner N, Selzner M, Jochum W, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the steatotic mouse liver against reperfusion injury: an ATP dependent mechanism. *J Hepatology* 39(1):55. (2003a)
- Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 125(3):917. (2003b)
- Serafín A, Roselló-Catafau J, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Peralta C. Ischemic preconditioning increases the tolerance of Fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am J Pathol* 161(2):587. (2002)
- Serafín A, Roselló-Catafau J, Prats N, Gelpí E, Rodés J, Peralta C. Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion. *Hepatology* 39:688. (2004)
- Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 181(2):160. (2001)
- Serracino-Inglott F, Virlos IT, Habib NA, Williamson RC, Mathie RT. Differential nitric oxide synthase expression during hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Surg* 185(6):589. (2003)

- Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, Frangos JA, Mennone A, Groszmann RJ, Sessa WC. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest* 100(11):2923. (1997)
- Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the liver and biliary system*. 11 edition. (2002)
- Sheron N, Eddleston A. Preservation-reperfusion injury, primary graft non-function and tumor necrosis factor. *J Hepatol* 16(3):262. (1992)
- Shibuya H, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Tumor necrosis factor-induced, superoxide-mediated neutrophil accumulation in cold ischemic/reperfused rat liver. *Hepatology* 26(1):113. (1997)
- Shimada M, Fujii M, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Ishibashi H. Living-donor liver transplantation: present status and future perspective. *J Med Invest* 52(1,2):22. (2005)
- Shimamura T, Zhu Y, Zhang S, Jin MB, Ishizaki N, Urakami A, Totsuka E, Kishida A, Lee R, Subbotin V, Furukawa H, Starzl TE, Todo S. Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Am Coll Surg* 188(1):43. (1999)
- Shinoda M, Shimazu M, Wakabayashi G, Tanabe M, Hoshino K, Kitajima M. Tumor necrosis factor suppression and microcirculatory disturbance amelioration in ischemia/reperfusion injury of rat liver after ischemic preconditioning. *J Gastroenterol Hepatol* 17(11):1211. (2002)
- Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, Oshima A, Shito M, Kawachi S, Karahashi T, Kumamoto Y, Yoshida M, Kitajima M. Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 64(10):1398. (1997)
- Shiratori Y, Kiriyaama H, Fukushi Y, Nagura T, Takada H, Hai K, Kamii K. Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. *Dig Dis Sci* 39:1265. (1994)
- Shiratori Y, Ohmura K, Hikiba Y, Matsumura M, Nagura T, Okano K, Kamii K, Omata M. Hepatocyte nitric oxide production is induced by Kupffer cells. *Dig Dis Sci* 43(8):1737. (1998)
- Shiroki R, Hoshinaga K, Horiba M, Izumitani M, Tsukiashi Y, Yanaoka M, Naide Y, Kanno T. Favorable prognosis of kidney allografts from unconditioned cadaveric donors whose procurement was initiated after cardiac arrest. *Transplant Proc* 29(1-2):1388. (1997)
- Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, Shimazu M, Shirasugi N, Endo M, Mukai M, Kitajima M. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* 63(1):143. (1997)
- Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 118(1):183. (2000)
- Sindram D, Rudiger HA, Upadhyay AG, Strasberg SM, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism. *J Hepatol* 36:78. (2002)
- Sitzer M, Foerch C, Neumann-Haefelin T, Steinmetz H, Misselwitz B, Kugler C, Back T. Transient ischaemic attack preceding anterior circulation infarction is independently associated with favourable outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75(4):659. (2004)
- Soejima Y, Yanaga K, Nishizaki T, Yoshizumi T, Uchiyama H, Sugimachi K. Effect of specific neutrophil elastase inhibitor on ischemia/reperfusion injury in rat liver transplantation. *J Surg Res* 86(1):150. (1999)

- Sola A, Hotter G, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Modification of oxidative stress in response to intestinal preconditioning. *Transplantation* 69(5):767. (2000)
- Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: Rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology* 34(1):13. (2001)
- Southard JH, van Gulik TM, Ametani MS, Vreugdenhil PK, Lindell SL, Pienaar BL, Belzer FO. Important components of the UW solution. *Transplantation* 49(2):251. (1990)
- Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. *Annu Rev Med* 46:235. (1995)
- Speechly-Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM. Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res* 75(3):586. (1994)
- Spiegel HU, Schleimer K, Kranz D, Oldhafer KJ. Organ preservation with EC, HTK, and UW solutions in orthotopic liver transplantation in syngeneic rats. Part I: Functional parameters. *J Invest Surg* 11(1):49. (1998)
- Stachlewitz RF, Gao W, Zhong Z, Connor HD, Mason RP, Thurman RG. Generation of lipid free radicals by adherent leukocytes from transplanted rat liver. *Transpl Int* 11(5):353. (1998)
- Stamler JS. Redox signalling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78:931. (1994)
- Stein H, Oosthuyzen M, Hinder R, Lamprechts H. Effect of verapamil on hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Surg* 165:96. (1993)
- Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 264:3855. (1969)
- Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP, Herti M. Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 20:829. (1994)
- Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit Care Med* 21(10 Suppl):S447. (1993)
- Sugino K, Yamada K, Kawasaki T. Analysis of adenine nucleotides by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 361:427. (1986)
- Sumimoto R, Jamieson NV, Kamada N. Examination of the role of the impermeants lactobionate and raffinose in a modified UW solution. *Transplantation* 50(4):573. (1990)
- Sun CK, Zhang XY, Zimmermann A, Davis G, Wheatley AM. Effect of ischemia-reperfusion injury on the microcirculation of the steatotic liver of the Zucker rat. *Transplantation* 72(10):1625. (2001)
- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34:497. (1988)
- Sun Z, Klein AS, Radaeva S, Hong F, El-Assal O, Pan HN, Jaruga B, Batkai S, Hoshino S, Tian Z, Kunos G, Diehl AM, Gao B. In vitro interleukin-6 treatment prevents mortality associated with fatty liver transplants in rats. *Gastroenterology* 125(1):202. (2003)
- Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ. Role of neutrophils during the first 24 hours after liver ischemia and reperfusion injury. *Transplant Proc* 26:3695. (1994a)
- Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin-1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischaemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 57:253. (1994b)

- Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Monoclonal antibody to intracellular adhesion molecule 1 as an effective protection for liver ischemia and reperfusion injury. *Transplant Proc* 26:325. (1994c)
- Suzuki S, Nakamura S, Serizawa A, Sakaguchi T, Konno H, Muro H, Kosugi I, Baba S. Role of Kupffer cells and the spleen in modulation of endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy. *Hepatology* 24(1):219. (1996)
- Szabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 6(2):79. (1996)
- Takano H, Manchikalapudi S, Tang XL, Qiu Y, Rizvi A, Jadoon AK, Zhang Q, Bolli R. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation* 98(5):441. (1998)
- Taneja C, Prescott L, Koneru B. Critical preservation injury in rat fatty liver is to hepatocytes, not sinusoidal lining cells. *Transplantation* 65(2):167. (1998)
- Teoh NC, Dela Pena A, Farrell G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology* 36:94. (2002)
- Teoh NC, Leclercq I, Pena AD, Farrell G. Low-dose TNF-alpha protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: implications for preconditioning. *Hepatology* 37:118. (2003a)
- Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 18(8):891. (2003b)
- Teoh N, Field J, Sutton J, Farrell G. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in hepatic ischemia-reperfusion injury: studies in tumor necrosis factor-alpha gene knockout mice. *Hepatology* 39(2):412. (2004)
- Terajima H, Enders G, Thiaener A, Hammer C, Kondo T, Thiery J, Yamamoto Y, Yamaoka Y, Messmer K. Impact of hyperthermic preconditioning on postischemic hepatic microcirculatory disturbances in an isolated perfusion model of the rat liver. *Hepatology* 31(2):407. (2000)
- Teramoto K, Bowers JL, Khettry U, Palombo JD, Clouse ME. A rat fatty liver transplant model. *Transplantation* 55:737. (1993a)
- Teramoto K, Bowers JL, Kruskal JB, Clouse ME. Hepatic microcirculatory changes after reperfusion in fatty and normal liver transplantation in the rat. *Transplantation* 56(5):1076. (1993b)
- Teramoto K, Bowers JL, Kruskal JB, Hara J, Iwai T, Endo M, Clouse ME. In vivo microscopic observation of fatty liver grafts after reperfusion. *Transplant Proc* 26(4):2391. (1994)
- Thiel M, Imendorffer S, Chouker A, Groh J, Briegel J, Anthuber M, Kramling HJ, Arfors KE, Peter K, Messmer K. Expression of adhesion molecules on circulating polymorphonuclear leukocytes during orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 28(6):1538. (1998)
- Toledo-Pereyra LH, Suzuki S. Neutrophils, cytokines, and adhesion molecules in hepatic ischemia and reperfusion injury. *J Am Coll Surg* 179:758. (1994)
- Trevisani F, Colantoni A, Caraceni P and Van Thiel DH. The use of donor fatty liver for transplantation: a challenge or a quagmire? *J Hepatol* 24:114. (1996)
- Trush MA, Egnor PA, Kensler TW. Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. *Food Chem Toxicol* 32:143. (1994)

- Turman MA, Bates CM. Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Ren Fail* 19(1):47. (1997)
- Uchinami H, Yamamoto Y, Kume M, Yonezawa K, Ishikawa Y, Taura K, Nakajima A, Hata K, Yamaoka Y. Effect of heat shock preconditioning on NF-kappaB/I-kappaB pathway during I/R injury of the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(6):G962. (2002)
- Uhlmann D, Scommotau S, Witzigmann H, Spiegel HU. Exogenous L-arginine protects liver microcirculation from ischemia reperfusion injury. *Eur Surg Res* 30(3):175. (1998)
- Uhlmann D, Uhlmann S, Spiegel HU. Endothelin/nitric oxide balance influences hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 36:212. (2000)
- Unal D, Yeni E, Erel O, Bitiren M, Vural H. Antioxidative effects of exogenous nitric oxide versus antioxidant vitamins on renal ischemia reperfusion injury. *Urol Res* 30(3):190. (2002)
- Urata K, Brault A, Rocheleau B, Huet PM. Role of Kupffer cells in the survival after rat liver transplantation with long portal vein clamping times. *Transpl Int* 13(6):420. (2000)
- Ureña MA, Ruiz-Delgado FC, Gonzalez EM, Seguro CL, Romero CJ, Garcia IG, Gonzalez-Pinto I, Gomez Sanz R. Assessing risk of the use of livers with macro and microsteatosis in a liver transplant program. *Transplant Proc* 30(7):3288. (1998)
- Ureña MA, Moreno Gonzalez E, Romero CJ, Ruiz-Delgado FC, Moreno Sanz C. An approach to the rational use of steatotic donor livers in liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 46:1164. (1999)
- Van der Vliet A, Eiserich JP, Cross CE. Nitric oxide: a pro-inflammatory mediator in lung disease? *Respir Res* 1:67. (2000)
- Van der Woude FJ, Schnuelle P, Yard BA. Preconditioning strategies to limit graft immunogenicity and cold ischemic organ injury. *J Invest Med* 52(5):323. (2004)
- Varadarajan R, Golden-Mason Lucy, Young L, McLoughlin P, Nolan N, McEntee G, Traynor O, Geoghegan J, Hegarty JE, O'Farrelly C. Nitric oxide in early ischaemia reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 78:250. (2004)
- Vázquez-Gil MJ, Mesonero MJ, Flores O, Criado M, Hidalgo F, Arévalo MA, Sanchez-Rodríguez A, Tunon MJ, Lopez-Novoa JM, Esteller A. Sequential changes in redox status and nitric oxide synthases expression in the liver after bile duct ligation. *Life Sci* 75:717. (2004)
- Velasco G, Geelen MJH, Guzmán M. Control of hepatic fatty acid and oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism. *Arch Biochem Biophys* 337:169. (1997)
- Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M, Trevisani F, Guerrieri F, Bernardi M, Altomare E. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 33(4):808. (2001)
- Viera L, Ye YZ, Estevez AG, et al. Immunohistochemical methods to detect nitrotyrosine. *Methods Enzymol* 301:373. (1999)
- Vincent MF, Bontemps F, Van der Bergue G. Inhibition of glycolysis by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 281:267. (1992)
- Virág L, Szabó E, Bakondi E, Bai P, Gergely P, Hunyadi J, Szabó C. Nitric oxide-peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Exp Dermatol* 11:189. (2002)

- Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 145:1421. (1994)
- Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 117(2):195. (1995)
- von Frankenberg M, Golling M, Mehrabi A, Netwich H, Klar E, Kraus TW. Donor pretreatment with gadolinium chloride improves early graft function and survival after porcine liver transplantation. *Transpl Int* 16(11):806. (2003)
- Walus KM, Fondacaro JD, Jacobson ED. Effects of adenosine and its derivatives in the canine intestinal vasculature. *Gastroenterology* 81:327. (1981)
- Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Farhood A, Jaeschke H. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. *Shock* 4(4):282. (1995)
- Wang D, Wang C, Tian Y. Effect of total flavonoids of *Astragalus* on nitroxide in ischemia reperfusion injury. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 19(4):221. (1999)
- Wang Y, Lawson JA, Jaeschke H. Differential effect of 2-aminoethyl-isothiourea, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on microvascular blood flow and organ injury in models of hepatic ischemia-reperfusion injury and endotoxemia. *Shock* 10:20. (1998)
- Wanner GA, Ertel W, Muller P, Hofer Y, Leiderer R, Menger MD, Messmer K. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 5:34. (1996)
- Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, Knab R, Fiebach JB, Schellinger PD, Kucinski T, Jungehulsing GJ, Brunecker P, Muller B, Banasik A, Amberger N, Wernecke KD, Siebler M, Rother J, Villringer A, Weih M; MRI in Acute Stroke Study Group of the German Competence Network Stroke. Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke* 35(3):616. (2004)
- Weinbroum A, Nielsen VG, Tan S, Gelman S, Matalon S, Skinner KA, Bradley E Jr, Parks DA. Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine oxidase. *Am J Physiol* 268(6 Pt 1):G988. (1995)
- Wheeler M, Katuna M, Smutney O, Froh M, Dikalova A, Mason RP, Samulski RJ, Thurman RG. Comparison of the effect of adenoviral delivery of three superoxide dismutase genes against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hum Gene Ther* 12:2167. (2001)
- Wink DA, Cook JA, Pacelli R, Liebmann J, Krishna MC, Mitchell JB. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Toxicol Lett* 82-83:221. (1995)
- Xiao JS, Cai FG, Niu Y, Zhang Y, Xu XL, Ye QF. Preconditioning effects of expression of proto-oncogenes c-fos and c-jun after hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 4(2):197. (2005)
- Yabe Y, Nishikawa M, Tamada A, Takakura Y, Hashida M. Targeted delivery and improved therapeutic potential of catalase by chemical modification: combination with superoxide dismutase derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 289:1176. (1999)
- Yabe Y, Kobayashi N, Nishihashi T, Takahashi R, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 289(3):894. (2001)

- Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 30(5):1223. (1999)
- Yagihashi A, Hirata K, Zou XM, Tsuruma T, Araya J, Yajima T, Kameshima H, Yanai Y, Nakamura M, Wada Y, Asanuma K, Watanabe N. Downregulation of cytokine-induced neutrophil chemoattractants and reduction of reperfusion injury in liver allograft by interleukin-10. *Transplant Proc* 32(7):2302. (2000)
- Yagnik GP, Takahashi Y, Tsoufas G, Reid K, Murase N, Geller D. Blockade of the I- arginine/NO synthase pathway worsens hepatic apoptosis and liver transplant preservation injury. *Hepatology* 36(3):573. (2002)
- Yamada S, Iida T, Tabata T, Nomoto M, Kishikawa H, Kohno K, Eto S. Alcoholic fatty liver differentially induces a neutrophil-chemokine and hepatic necrosis after ischemia-reperfusion in rat. *Hepatology* 32(2):278. (2000)
- Yamada S, Tomiya T, Yamaguchi Y, Hiura M, Otsuki M. Activation of hepatic macrophage contributes to hepatic necrosis after post-ischemic reperfusion in alcoholic fatty liver. *Hepato Res* 26:209. (2003)
- Yamaoka Y, Washida M, Honda K, Tanaka K, Mori K, Shimahara Y, Okamoto S, Ueda M, Hayashi M, Tanaka A. Liver transplantation using a right lobe graft from a living related donor. *Transplantation* 57(7):1127. (1994)
- Yang BC, Mehta JL. Inhibition of nitric oxide does not affect reperfusion-induced myocardial injury, but it prevents lipid peroxidation in the isolated rat heart. *Life Sci* 61(3):229. (1997)
- Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(6):2557. (1997)
- Yang SQ, Lin HZ, Mandal AK, Huang J, Diehl AM. Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology. *Hepatology* 34(4 Pt 1):694. (2001)
- Yang Y, Chen SX, Zhang WX. Effect of ischemic preconditioning on human lung cell apoptosis in vivo and the expression of regulating gene bcl-2. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 27(1):43. (2002)
- Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 342(8866):276. (1993)
- Yersiz H, Renz JF, Farmer DG, Hisatake GM, McDiarmid SV, Busuttil RW. One hundred in situ split-liver transplantations: a single-center experience. *Ann Surg* 238(4):496. (2003)
- Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P, Williams JW. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 66(2):152. (1998)
- Yonezawa K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Ishikawa Y, Uchinami H, Taura K, Nakajima A, Yamaoka Y. Suppression of tumor necrosis factor-alpha production and neutrophil infiltration during ischemia-reperfusion injury of the liver after heat shock preconditioning. *J Hepatol* 35(5):619. (2001)
- Yoong KF, Gunson BK, Neil DA, Mirza DF, Mayer AD, Buckels JA, McMaster P. Impact of donor liver microvesicular steatosis on the outcome of liver retransplantation. *Transplant Proc* 31(1-2):550. (1999)

- Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology* 30(1):203. (1999)
- Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T, Uchiyama H, Sugimachi K. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg* 85(12):1636. (1998)
- Yost CS, Matthay MA, Gropper MA. Etiology of acute pulmonary edema during liver transplantation: a series of cases with analysis of the edema fluid. *Chest* 119(1):219. (2001)
- Yuan GJ, Ma JC, Gong ZJ, Sun XM, Zheng SH, Li X. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 11(12):1825. (2005)
- Zakim, Boyer. *Hepatology. A textbook of liver disease*, 4 edition. (2002)
- Zapletal C, Maksan SM, Lehmann T, Guenther L, Fallsehr C, Mehrabi A, Weiss G, Golling M, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. Ischemic preconditioning improves liver microcirculation after ischemia/reperfusion. *Transplant Proc* 31(8):3260. (1999)
- Zhang JX, Pegoli W Jr, Clemens MG. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 266(4 Pt 1):G624. (1994)
- Zhang JX, Bauer M, Clemens MG. Vessel and target cell-specific actions of endothelin-1 and endothelin-3 in the rat liver. *Am J Physiol* 269:G269. (1995)
- Zhang SJ, Chen S. The role of ischemic preconditioning in rat liver graft. *Transplant Proc* 36:190. (2004)
- Zhong Z, Connor H, Mason RP, Qu W, Stachlewitz RF, Gao W, Lemasters JJ, Thurman RG. Destruction of Kupffer cells increases survival and reduces graft injury after transplantation of fatty livers from ethanol-treated rats. *Liver Transpl Surg* 2:383. (1996)
- Zhong Z, Connor H, Stachlewitz RF, Frankenberg M, Mason RP, Lemasters JJ, Thurman RG. Role of free radicals in primary nonfunction of marginal fatty grafts from rats treated acutely with ethanol. *Mol Pharmacol* 52(5):912. (1997)
- Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 16(5):1236. (1992)
- Zingarelli B, Szabó C, Salzman AL. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. *GUT* 45:199. (1999)
- Zou XM, Hirata K, Nie G, Liang YW, Zhang JG, Qin HD, Zhang B. Investigation of rhIL-10 inhibition of acute rejection after liver transplantation. *Transplant Proc* 32(7):2123. (2000)
- Zwacka RM, Zhou W, Zhang Y. Redox gene therapy for ischemia/reperfusion injury of the liver reduces AP-1 and NF-KB activation. *Nat Med* 4:698. (1998)

VIII. ANEXO

A continuación se citan los artículos que han dado lugar a esta tesis:

- Fernández L, Carrasco-Chaumel E, Serafín A, Xaus C, Grande L, Rimola A, Roselló-Catafau J, Peralta C. Is ischemic preconditioning a useful strategy in steatotic liver transplantation? *Am J Transplant* 4:888. (2004)
- Carrasco-Chaumel E, Roselló-Catafau J, Bartrons R, Franco-Gou R, Xaus C, Casillas A, Gelpí E, Rodés J, Peralta C. Adenosine monophosphate-activated protein kinase and nitric oxide in rat steatotic liver transplantation. *J Hepatology* (en prensa)