

11209

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

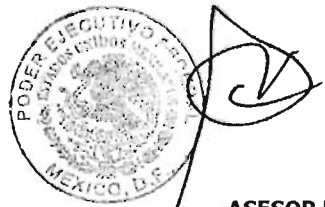


HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
CIRUGÍA GENERAL

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y NIVELES DE LIPOPEROXIDACIÓN EN EL PRECONDICIONAMIENTO HEPÁTICO

**T E S I S D E P O S G R A D O
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN CIRUGÍA GENERAL
P R E S E N T A :
DR. MARCO ANTONIO GARCÍA PUIG**

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO



DIRECCION DE ENSEÑANZA

**ASESOR DE TESIS: DR. EDUARDO MONTALVO JAVÉ
MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE URGENCIAS
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

MÉXICO D.F.

SEPTIEMBRE 2005

m348603



Universidad Nacional
Autónoma de México

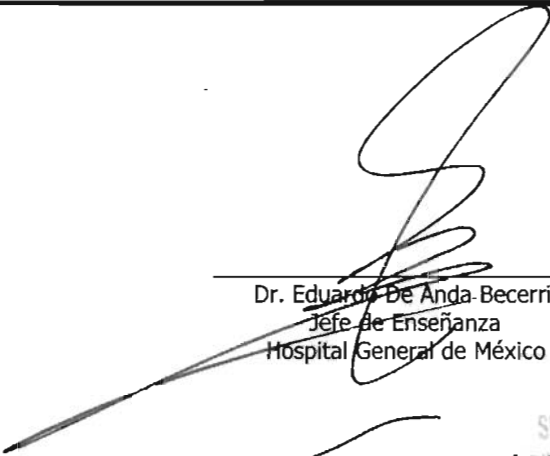


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso


DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

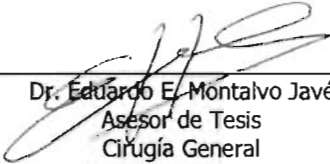
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



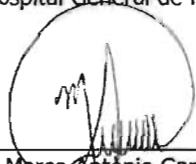
Dr. Eduardo De Anda Becerril
Jefe de Enseñanza
Hospital General de México



Dr. Rafael Gutiérrez Vega
Profesor Titular
Curso Universitario de Posgrado
Cirugía General
Hospital General de México



Dr. Eduardo E. Montalvo Javé
Asesor de Tesis
Cirugía General
Hospital General de México



Dr. Marco Antonio García Puig
Residente de 4º Año
Hospital General de México

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: García Puig Marco Antonio

FECHA: 30-09-2005

FIRMA: _____



A Dios, por colocarme en la cuna donde nací.

A mis padres, quienes han sido mis pilares y mi ejemplo, que con su amor, paciencia, esfuerzo y dedicación he podido llegar a cumplir esta gran meta en mi vida. A ustedes todo mi amor y agradecimiento.

A mis hermanos, parte indispensable en mi corazón y vida, que con su apoyo, ejemplo y cariño me alientan día con día a seguir adelante.

A Issa, por estar siempre a mi lado brindándome tu incondicional apoyo, cariño y comprensión. Te amo.

A mis amigos del Hospital, Tomás, Álvaro, Vero, Jorge, Antonio, Sergio, Francisco, Lisbeth, con quienes he surcado y disfrutado estos cuatro años inolvidables de Residencia.

A Daniel, Juan, Alex, Pedro, y Mariana, quienes me han hecho este largo andar más corto y placentero.

A mis tíos y primos, por su gran apoyo en esta última etapa de mi formación.

A mis médicos de base, quienes han sido piedra angular en mi formación compartiendo sus conocimientos y experiencias.

Al Hospital General de México, por haber sido mi segundo hogar en estos cuatro años, en donde me he formado como cirujano, y sobretodo, he crecido como ser humano.

A mis pacientes, quienes al depositar en mis manos su vida y salud, han sido libro abierto durante mi formación.

Y finalmente, a Eduardo Montalvo, por su amistad, dedicación, tiempo y apoyo para llevar a cabo este trabajo.

Introducción	1
Anatomía e histología del hígado	1
Fisiología del hígado	9
Pruebas de funcionamiento hepático	12
Estrés oxidativo	15
Mecanismos antioxidativos	17
Especies reactivas de oxígeno en la señalización celular	19
Enzimas antioxidantes	21
Funciones enzimáticas	22
Radicales libres: su importancia e implicaciones clínicas	25
Oxidación y reducción	26
Antioxidantes	28
Enfermedad y radicales libres	29
Isquemia y reperfusión	32
Membranas celulares y lipoperoxidación	49
Protección del hígado a la lesión por isquemia-reperfusión	53
Justificación	68
Planteamiento del problema	68
Objetivos	68
Objetivo general	68
Objetivos específicos	69
Material y métodos	69
Análisis estadístico	71
Resultados	71
Discusión	77
Conclusión	79
Referencias bibliográficas	80

INTRODUCCIÓN:

Existen numerosas situaciones fisiopatológicas en la actividad clínica en las que el hígado se somete a una situación de isquemia transitoria, total o parcial (hepatectomías parciales, trasplante hepático, donantes en asistolia, estados de choque, situaciones de paro cardiorrespiratorio reversibles), puede desarrollarse la lesión por la isquemia-reperusión, que no se ha evitado sus complicaciones aun con el advenimiento científico de nuestra era.

Por tanto, es importante investigar, utilizando modelos experimentales, los acontecimientos que están implicados en su producción, así como los mecanismos que pueden disminuir el daño por Isquemia reperusión (IR) y mejorar tanto la viabilidad del órgano en cuestión como la supervivencia del sujeto que sufre estas alteraciones.

Hoy en día sabemos sobre un fenómeno conocido como "precondicionamiento hepático" (PCH), se refiere a la inducción por distintos medios del aumento a la resistencia del tejido hepático a la lesión por IR, efecto potencialmente benéfico que disminuye la aparición de eventos deletéreos producidos en el hígado.¹³⁴

ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL HÍGADO

Anatomía:

Es la glándula de mayor tamaño del organismo, es el órgano más grande del cuerpo. En un cadáver pesa 1500 g. y en el individuo vivo 1900g aprox., ya que tiene sangre contenida. El hígado está localizado en la región del hipocondrio derecho del abdomen, normalmente no sobrepasa el límite del borde costal, justo por debajo del diafragma, llenando el espacio de la cúpula diafragmática, en donde puede alcanzar hasta la quinta costilla. Está recubierto por una cápsula fibrosa, la capsula de Glisson. El peritoneo cubre la mayor parte de la superficie del hígado, con excepción de la zona desnuda, La cápsula de Glisson se introduce en el hígado y forma un soporte para los vasos sanguíneos, linfáticos y los conductos biliares.¹

Macroscópicamente está dividido en cuatro lóbulos:

1. Lóbulo derecho, el más voluminoso.
2. Lóbulo izquierdo, extendido sobre el estómago.

3. Lóbulo cuadrado, en la base, de menor tamaño que los anteriores, entre la fosa de la vesícula biliar y el ligamento redondo.
4. Lóbulo caudado, situado en la parte posterior de la base del hígado, entre el surco de la vena cava inferior y la fisura del ligamento venoso.^{2,3}

Clínicamente, y quirúrgicamente sobre todo, se emplea el concepto de segmento hepático, basándose en las divisiones arteriales y en el hecho de que haya pocas anastomosis entre segmentos. Si miramos por la cara antero-superior el hígado podemos distinguir de derecha a izquierda un segmento posterior, en el borde del lado derecho, seguido de un segmento anterior, un segmento medial y un segmento lateral que forma el límite izquierdo.

Cara superior del hígado: El hígado se relaciona principalmente con estructuras situadas al lado derecho del abdomen, muchas de las cuales dejan una impresión en la cara inferior del lóbulo derecho del hígado. Así tenemos de atrás a adelante la impresión cólica, la impresión duodenal, pegada a la fosa cística, y la impresión renal, menos marcada. En la cara inferior del lóbulo izquierdo están la impresión gástrica y la escotadura del esófago en el borde posterior. Las relaciones con el diafragma y con el corazón completan los órganos vecinos al hígado. La base del hígado da entrada al hilio hepático, que no es sino la zona de entrada del omento (epiplón) menor con la vena porta, la arteria hepática y la salida del conducto hepático. El omento (epiplón) menor (fijado en una prominencia de la cara inferior denominada tubérculo omental) reviste el fondo de los surcos de la base del hígado (surco del ligamento venoso, surco del ligamento redondo) y alcanza el borde posterior de la cara inferior, en donde el peritoneo que lo recubre pasa a revestir el diafragma y la pared posterior formando el ligamento hepatorenal. Por delante el peritoneo reviste la cara diafragmática hasta su límite superior, en donde salta a revestir la cara abdominal del diafragma. Entre los dos repliegues de peritoneo que saltan de la superficie del hígado al diafragma queda comprendida la cara desnuda del hígado, zona en la que el peritoneo no recubre la cápsula hepática. Por esta zona la vena cava inferior se relaciona con el hígado y recibe las venas hepáticas.^{2,3}

Cara inferior del hígado: En la cara diafragmática se encuentra el ligamento falciforme, el cual se extiende hasta alcanzar la zona umbilical. Por su borde libre corre el ligamento redondo del hígado (restos de la vena umbilical embrionaria). Este resto de

la vena umbilical se unen a las venas subcutáneas periumbilicales que irradian desde el ombligo, las cuales drenan en la vena ilíaca externa y finalmente en la cava inferior. En casos patológicos con hipertensión portal estas venas se dilatan formando el fenómeno de la cabeza de medusa.

El ligamento falciforme puede ser considerado como los restos del mesogastrio ventral (en la porción no desarrollada del septum transversum por la invasión embrionaria del brote duodenal) que se extiende por el mesogastrio ventral y que contribuye a la formación del hígado. Este ligamento, al llegar a la parte posterior de la cara diafragmática del hígado se divide en dos hojas, dando lugar al ligamento coronario (límite superior del área desnuda del hígado). Cada una de estas hojas se dirige hacia cada uno de los bordes derecho e izquierdo del hígado, en donde se une a la hoja peritoneal de la cara visceral del hígado que se refleja sobre el diafragma, formando los ligamentos triangulares derecho e izquierdo (éste último más definido que el derecho). La estructura del hígado va a seguir estrechamente las divisiones de la vena porta. Tras la división en ramos segmentarios, las ramas de la vena porta, acompañadas de las de la arteria hepática y de las divisiones de los conductos hepáticos, se encuentran juntos en el espacio porta (vena interlobulillar, arteria interlobulillar y conductillos interlobulillares).¹

Circulación sanguínea del hígado

La circulación hepática es de carácter centrípeto y doble, está formada por el sistema porta y la arteria hepática. El sistema porta constituye el 70-75% del flujo sanguíneo (15 ml/min) y contiene sangre poco oxigenada y rica en nutrientes proveniente del tracto gastrointestinal y bazo. La circulación general depende de la arteria hepática, rama del tronco celíaco, que contiene la sangre oxigenada es la irrigación nutricia. Ambos vasos entran a través del hilio, la sangre sale del hígado por las venas hepáticas, las que drenan a la vena cava inferior. Cada espacio porta se encuentra en la confluencia de los lobulillos hepáticos, que son formaciones más o menos hexagonales de células hepáticas y que posee en el centro la vena centrolobulillar. La confluencia de venas centrolobulillares da lugar a las venas hepáticas, que finalmente drenan en la vena cava inferior. Por lo tanto, la sangre rica en nutrientes de la absorción intestinal (vena porta) y en oxígeno (arteria hepática) se mezclan en los sinusoides hepáticos (espacios entre hepatocitos), para elaborar los metabolitos y sintetizar las sales biliares. El hígado ocupa una posición central en el metabolismo,

todos los nutrientes excepto los quilomicrones, que se absorben por el tubo digestivo se transportan hacia el órgano por la vena porta. La sangre del bazo rica en hierro se transporta por la vena porta al hígado.^{1,6}

La bilis deja al hilio por los conductos hepáticos derecho e izquierdo, que se descarga en la vesícula biliar para su concentración y almacenamiento

Drenaje linfático del hígado

El drenaje linfático del hígado corre a cargo de vasos que desembocan hacia la cava inferior o hacia los ganglios hepáticos que siguen el recorrido inverso de la arteria hepática.¹

Inervación del hígado

El aporte nervioso también le proviene del plexo celíaco que inerva al hepático, mezcla de fibras simpáticas y parasimpáticos. Estos nervios llegan al hígado junto a la arteria hepática.^{2,3}

Histología:

Los tipos celulares residentes en el hígado (hepatocitos, células de Kupffer, células estrelladas y células endoteliales) interactúan entre sí y con la matriz extracelular. Esta interacción permite mantener la estructura hepática normal y el funcionamiento armónico de las células.⁴

Las células de Kupffer son los macrófagos residentes y se cree que son migratorias ya que no establecen uniones intercelulares con las células vecinas. Se relacionan con las células de revestimiento sinusoidal. Son macrófagos fijos pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear que se encuentran adheridos al endotelio y emiten sus prolongaciones hacia el espacio de Disse. Su función es fagocitar eritrocitos envejecidos y otros antígenos. Además actúan como células presentadoras de antígeno. Las células estrelladas (células de Ito) están alrededor del sinusoides y constituyen un tercio de las células no parenquimatosas del hígado. Almacenan la Vitamina A. En el hígado normal no son proliferativas.^{4,5}

Las células endoteliales poseen receptores que permiten la endocitosis de sustancias como el LDL y ácido hialurónico. También producen mediadores vasoactivos (endotelina-1) y citocinas.

Los hepatocitos constituyen alrededor del 80% de la población celular del tejido hepático. Son células poliédricas o poligonales de 20-30 μm de diámetro, con 1 ó 2 núcleos esféricos y nucléolo prominente. Presentan el citoplasma acidófilo con cuerpos basófilos y son muy ricos en organelos. Además en su citoplasma contienen inclusiones de glucógeno y grasa. Se dice que el plasmalema o membrana del hepatocito tiene dominios laterales y sinusoidales. La membrana plasmática de los hepatocitos presenta un dominio sinusoidal con microvellosidades que mira hacia el espacio de Disse y un dominio lateral que mira hacia el hepatocito vecino. Las membranas plasmáticas de dos hepatocitos contiguos delimitan un canalículo donde será secretada la bilis. La presencia de múltiples organelos en el hepatocito se relaciona con sus múltiples funciones, como son la síntesis de proteínas (albúmina, fibrinógeno y lipoproteínas del plasma), el metabolismo de hidratos de carbono, la formación de bilis, el catabolismo de fármacos y tóxicos y el metabolismo de lípidos, purinas y gluconeogénesis. Las células hepáticas se disponen laminarmente, de una o dos células de espesor (Figura 1). Según su localización dentro del lobulillo, manifiestan diferentes propiedades estructurales, histoquímicas y bioquímicas. Además, no solo hacen contacto entre ellas, sino que bordean un espacio (Espacio de Disse) y por esto se dice que el mismo hepatocito tiene distintos dominios dentro de su citoplasma.⁵

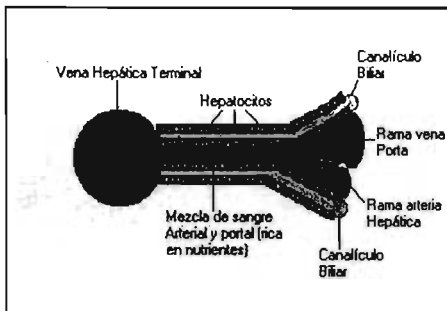


Figura 1. Esquema de la disposición de los hepatocitos y otros componentes del hígado.

Dominios del hepatocito:

-Dominios Laterales: Estos forman los canaliculos biliares, que son espacios intercelulares laberínticos (1-2 μm de diámetro), llamados canaliculos biliares. En esta zona se secreta la bilis, cuya producción se ve aumentada por la presencia de

microvellosidades laterales. Se previene la fuga de bilis al formarse uniones ocluyentes entre células hepáticas vecinas, lo que aísla a los canalículos biliares del espacio extracelular restante. Se proyectan microvellosidades cortas y ciegas del hepatocito a los canalículos biliares, lo que incrementa las áreas de superficie por las que se secreta la bilis, misma que es conducida hacia la periferia de los lobulillos. Esta zona de la membrana plasmática tiene altas concentraciones de Na-K ATPasa y adenilciclase.^{4,5}

-Dominios sinusoidales: Es la cara que da hacia el espacio de Disse, tienen microvellosidades que se proyectan hacia este espacio, lo que facilita el intercambio de materiales entre el hepatocito y el plasma en el espacio perisinusoidal, aquí es donde se descargan las secreciones endocrinas del hepatocito y entra el material que proviene de la sangre. También tiene microvellosidades y es rica en receptores manosa 6-P, Na-K ATPasa y adenilciclase, ya que es aquí en donde el hepatocito hace su descarga endocrina.^{4,5}

Organelos e inclusiones de los hepatocitos: Cerca del 75% de los hepatocitos tienen un solo núcleo, 25% tienen dos. Contienen un retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi abundantes para la síntesis de albúmina y fibrinógeno. Posee 2,000 mitocondrias, las células cercanas a la vena central contienen casi el doble de las mitocondrias. Tienen además endosomas, lisosomas y peroxisomas. En el retículo endoplásmico liso ocurre la detoxificación de ciertos fármacos y toxinas. El hepatocito contiene inclusiones principalmente lipoproteínas de muy baja densidad sobre todo después del consumo de comidas grasosas. Al glucógeno acumulado se le conoce como partículas B. En la vecindad de la vena central los hepatocitos manifiestan depósitos de glucógeno y varían según el estado dietético del individuo, son abundantes después de una comida y disminuyen después de ayunar.^{4,5}

Organización de los hepatocitos: los hepatocitos están distribuidos en lobulillos de forma hexagonal de unos 2 mm de longitud y 0.7 mm de diámetro con límites muy escasos de tejido conectivo (lobulillo clásico). En los sitios en que tres lobulillos hacen contacto se incrementa el tejido conectivo en donde encontramos los espacios porta que consiste en una arteriola, rama de la arteria, hepática; vénula, rama de la vena porta; conductos biliares y vasos linfáticos. El eje longitudinal de cada lobulillo está ocupado por una vena central, rama inicial de la vena hepática. Los hepatocitos se proyectan al igual que los rayos de una rueda desde la vena central y forman placas fenestradas anastomosantes separadas entre sí por grandes espacios vasculares

llamados sinusoides hepáticos. Arteriolas de entrada, vénulas de entrada y ramas del plexo capilar peribiliar que perforan la placa limitante para unirse a los sinusoides hepáticos. Conforme entra sangre en los sinusoides su flujo se vuelve lento en grado considerable y pasa con esta lentitud hacia la vena central. Varias venas centrales se unen para formar las venas sublobulillares, éstas se unen entre sí para formar las venas colectoras, estas se unen para formar las venas hepáticas derecha e izquierda.

Lobulillo hepático clásico: organizado en torno a una vena central. Son subunidades irregularmente hexagonales formadas por láminas fenestradas de hepatocitos que se disponen en forma radiada en torno a una vena central o vena centrolobulillar, ubicada en el centro del lobulillo. Desde las ramas de la vena porta y arteria hepática ubicadas en la periferia la sangre va a los sinusoides.^{4,5}

El acino hepático es la unidad estructural y funcional del hígado (Figura 2). Es un conjunto de células que rodean un ductulo y pequeñas ramas terminales de la vena porta y de la arteria hepática. Es la base para diferenciar las distintas zonas dentro del hígado:

- La zona uno, representa el área de tejido hepático que rodea en forma inmediata al ductulo biliar y a las ramas terminales de la vena porta y la arteria hepática. Es la que cuenta con más abundancia de oxígeno.
- La zona dos, está formada por el tejido hepático ubicado entre la zona 1 y 3.
- La zona tres, es la capa más externa y es la región que rodea a la vena central. Es la más deficiente en oxígeno

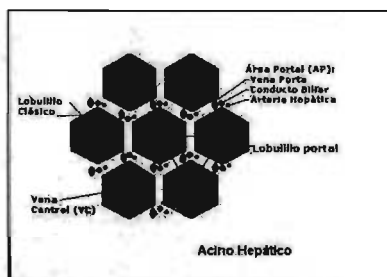


Figura 2: Acino hepático

Espacios porta o tríadas: Son áreas triangulares situados en los ángulos de los lobulillos hepáticos, constituidas por un estroma conjuntivo laxo, que contienen en su interior una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta, un capilar linfático y un conductillo biliar. La bilis producida por los hepatocitos se vierte en una red de canalículos dentro de las láminas de hepatocitos y fluye en forma centrípeta al lobulillo hacia los conductillos biliares de los espacios porta.⁵

Sinusoides hepáticos: Son unos canalículos que se disponen entre las láminas de hepatocitos y donde confluyen desde la periferia de los lobulillos las ramas de la arteria hepática y vena porta. La sangre fluye desde las tríadas a la vena central, circulando en forma centrípeta. La pared de los sinusoides está formada por una capa discontinua de células endoteliales fenestradas que carecen de membrana basal. En los sinusoides confluyen la circulación hepática y porta. Estos drenan su contenido a la vena hepática central, de ésta a las venas hepáticas derecha e izquierda y finalmente a la vena cava inferior.^{4,5}

Espacio de Disse: Es un estrecho espacio perisinusoidal que se encuentra entre la pared de los sinusoides y las láminas de hepatocitos, ocupado por una red de fibras reticulares y plasma sanguíneo que baña libremente la superficie de los hepatocitos. En el espacio de Disse se produce el intercambio metabólico entre los hepatocitos y el plasma donde se forma la abundante linfa hepática. En este espacio también se encuentran células almacenadoras de grasa o células de Ito, de forma estrellada y función poco conocida.

Conductos hepáticos: Los canalículos biliares se anastomosan entre sí y forman túneles laberínticos entre los hepatocitos. No tienen pared propia, conforme estos canalículos llegan a la periferia de los lobulillos clásicos se funciona en colangiolo que es una combinación de hepatocitos y células cuboideas bajas. La bilis entra a los colangiolo a los conductos de Herring formado por epitelio cúbico simple, estos se unen para formar los conductos biliares interlobulillares con epitelio cilíndrico simple, los cuales se fusionan para formar conductos cada vez más grandes que por último se une al conducto hepático derecho e izquierdo. Las células epiteliales de los colangiolo, los conductos de Herring y los conductos biliares interlobulillares secretan bicarbonato a semejanza de los conductos del páncreas. La secreción es regulada por la secretina del duodeno.^{4,5}

Función básica del hígado

El hígado es un órgano muy versátil. El hepatocito tiene 100 diferentes funciones: Elabora bilis, almacena glucógeno, hierro, cobre, vitamina A, muchas de las vitaminas del complejo vitamínico B, y vitamina D. Produce albúmina y otras proteínas, muchas de éstas son esenciales para la coagulación normal de la sangre (protrombina y fibrinógeno) y una sustancia anticoagulante que es la heparina, síntesis de factores de coagulación III, V, VII, IX, y XI, neutraliza toxinas, elimina insulina y otras hormonas, transforma amonio en urea. Las células de Kupffer fagocitan las partículas extrañas transportadas por la sangre y a los eritrocitos muertos o envejecidos.⁶

Debido a la multiplicidad y variabilidad de funciones hepáticas, la medición de estas actividades es complicada. Las pruebas de función hepática más usadas son la determinación de la bilirrubina, albúmina y el tiempo de protrombina. El nivel sérico de bilirrubina mide la conjugación y excreción hepática, en cambio el nivel de albúmina y el tiempo de protrombina se relacionan con la síntesis de proteínas. La integridad del hepatocito se evalúa a través de la medición de la Aspartato Aminotransferasa (AST) y Alanino Aminotransferasa (ALT), y es por esto que se elevan en la necrosis de las células hepáticas. La disfunción hepática es la alteración de cualquiera de estos patrones.⁶

Elaboración de la Bilis: Produce entre 600 y 1200 ml por día. Se constituye principalmente por agua, pero además contiene sales biliares (ácidos biliares), glucuronato de bilirrubina, fosfolípidos, lecitina, electrolitos (Na⁺ y HCO₃⁻), colesterol e IgA. La bilis es una secreción exocrina; se compone principalmente de ácidos biliares y bilirrubina. El 90 % de los ácidos biliares proviene de la reabsorción intestinal, llegando al hígado por la vena porta, pasando por los hepatocitos hasta los canalículos biliares. El 10 % restante se sintetiza en el hepatocito, por la conjugación de ácido cólico con glicina y taurina.^{6,7}

La bilis tiene circulación enterohepática. Esta consiste en que la bilis se vierte en el duodeno mediante la contracción vesicular. En el intestino delgado lleva a cabo su acción emulsificadora de grasas. En el íleon terminal, una parte de los ácidos biliares es eliminada por las heces (10%) y otra porción de los ácidos es reabsorbida. Los que regresan al hígado lo hacen por la sangre de la vena porta y son captados ávidamente

por los hepatocitos volviendo a ser secretados al canalículo biliar, formando parte de la bilis. Las sales biliares son resintetizadas en el retículo endoplásmico liso (REL) de los hepatocitos.

Producción de bilirrubina: La biliverdina proviene de la digestión de la hemoglobina en el bazo y el hígado (células de Kupffer). Ésta es insoluble en agua, al captarla el hepatocito la transforma en glucuronato de bilirrubina, elemento hidrosoluble, que lo pasa al canalículo biliar. La bilirrubina es un producto tóxico proveniente de la degradación de los eritrocitos lo que sucede en el bazo y por las células de Kupffer, la bilirrubina se descarga a la sangre y se fija la albúmina llamada bilirrubina libre o no conjugada. El hepatocito la transforma en glucuronato que es hidrosoluble, se excreta por el canalículo biliar y se descarga por el excremento.⁷

Degradación de hormonas: Los hepatocitos endocitan y degradan las hormonas y, posteriormente sin ser modificadas, las trasladan al canalículo biliar. Luego llegan hasta la luz del tubo digestivo y son digeridas. También pueden ser descargadas en endosomas tardíos para ser degradadas por enzimas lisosómicas. La degradación de hormonas y destoxificación de fármaco y toxinas ocurre en el retículo endoplásmico liso del hepatocito, por mutilación, conjugación u oxidación. En ocasiones esto ocurre en los peroxisomas, más que en el retículo endoplásmico liso.^{6,7}

Destoxificación de toxinas y fármacos: El hígado también depura muchos fármacos y segrega bilirrubina (producto de la degradación de la hemoglobina), y muchas otras sustancias, incluyendo enzimas. El endotelio que tapiza los sinusoides está provisto de poros o fenestraciones que permiten el pasaje de la mayor parte de las proteínas del plasma hacia el espacio de Disse. De esta forma las moléculas se ponen en contacto directo con la membrana hepatocítica y pueden difundir o ser transportadas activamente al interior del hepatocito.

En el retículo endoplásmico liso de los hepatocitos existe una enzima llamada oxidasa de acción mixta. Ésta metila, conjuga u oxida distintos fármacos y toxinas, y de esta forma los inactivan. Cuando se consume por tiempo prolongado distintos fármacos, el REL se hipertrofia, aumentando sus enzimas oxidantes. Muchas veces también son los peroxisomas los que detoxifican.

Almacenamiento de vitaminas: En los seres humanos el hígado actúa como el principal depósito de vitamina A, tanto que podría prevenir su deficiencia por 10 meses. El retinol (vitamina A preformada) se transporta del hígado a otros sitios del cuerpo mediante una proteína específica, la proteína fijadora de retinol (PFR). La carencia de ésta proteína puede influir en el estado de vitamina A y reducir la síntesis de la PFR. También almacena (aunque en cantidades menores) vitamina B12 y vitamina D, pudiendo prevenir su deficiencia por 12 y 4 meses respectivamente.^{6,7}

Metabolismo de carbohidratos: Los hepatocitos, a diferencia de las células musculares y adipocitos, son permeables a la glucosa, lo cual facilita sus tareas y por tanto la insulina no tiene efecto en la incorporación de glucosa en este órgano. Estos pueden transportar glucosa desde la sangre a su interior y allí almacenarlo como glucógeno. Este proceso permite al organismo mantener niveles normales de glucosa en la sangre (euglicemia). El glucógeno es hidrolizado (glicogenólisis) por los hepatocitos en el caso que los niveles de glucosa disminuyan por debajo de lo normal (hipoglicemia), transportando la glucosa al espacio de Disse. Otro proceso que pueden realizar los hepatocitos es la gluconeogénesis. Esta consiste en sintetizar glucosa a partir de otras fuentes (como aminoácidos) u otros azúcares. Este proceso mediado por la propia concentración de glucosa y por hormonas (glucagon, epinefrina e insulina), consiste en almacenar la glucosa excedente o bien liberarla. Ambos procesos se llevan a cabo mediante la interconversión al metabolito de encrucijada de los carbohidratos, que es la glucosa-6-fosfato (G6P). Cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados el hígado la incorpora y transforma el G6P para almacenarla posteriormente en forma de glucógeno (una de las reservas energéticas de los animales). La cantidad de glucógeno almacenada, solo puede mantener las necesidades de glucosa por alrededor de 6 h.^{6,7}

Metabolismo de proteínas: El hígado también degrada aminoácidos (AA), a variados intermediarios metabólicos. Los glucogénicos son transformados a piruvato o intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, por ejemplo oxaloacetato (OAA) y por tanto son precursores glucogénicos. Por el contrario, los AA cetogénicos, muchos de los cuales también son glucogénicos, son transformados a cuerpos cetónicos.

En el hígado también se lleva a cabo el ciclo de la urea, en el cual el cuerpo desecha el excedente de nitrógeno que viene de los AA y el lactato, producto del metabolismo anaerobio de la glucosa en músculo, es utilizado en el hígado para la gluconeogénesis, lipogénesis y fosforilación oxidativa.

El amoníaco es tóxico para el organismo. Este es producto de la acción bacteriana en el tubo digestivo y de la deaminación de aminoácidos realizada por los hepatocitos. El hepatocito es capaz de convertir este amoníaco en urea.

Metabolismo de lípidos: En condiciones de requerimientos energéticos elevados. Los triglicéridos (TG) son degradados a Ac-CoA que posteriormente es transformado en cuerpos cetónicos; o bien, en la situación contraria, los ácidos grasos se utilizan para sintetizar TG, que son finalmente almacenados en el tejido adiposo como reserva energética.^{6,7}

Fosfolípidos, colesterol y cuerpos cetónicos son almacenados en los hepatocitos hasta que estos los descargan. Este proceso se inicia cuando llegan al hígado los quilomicrones. Los hepatocitos se encargan de degradarlos en ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos se usan para sintetizar fosfolípidos y colesterol. El hígado también produce lipoproteínas de muy baja densidad, que se descargan en el espacio de Disse.

Inmunológica: Los hepatocitos no elaboran IgA, ya que estas son sintetizadas en la mucosa digestiva y desde ahí son transportadas al hígado. La IgA forma un complejo con un componente secretor elaborado por el hígado, que permite que la IgA sea secretada a la bilis y llegue al duodeno. Las células de Kupffer retiran de la sangre detritus (desechos celulares) y eritrocitos viejos o en mal estado. Además retiran microorganismos provenientes del tubo digestivo a través de la vena porta, ya que los opsonizan.⁷

PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPÁTICO (PFH):⁶

Hay dos categorías generales de PFH. El primer grupo incluye la aminotransferasa del alanina (ALT) y aminotransferasa del aspartato (AST), designadas antes el SGPT y el SGOT respectivamente. Estas enzimas indican daño celular hepático. El segundo grupo incluye a la fosfatasa alcalina y la gamma glutamiltranspeptidasa (GGT) que indica obstrucción del sistema biliar, intra y extrahepático.

La ALT y la AST son enzimas intracelulares y hay fuga hacia la circulación general cuando se dañan las células del hígado. La ALT es un indicador más específico de inflamación hepática, puesto que la AST se puede elevar en enfermedades de otros órganos tales como el corazón o el músculo. En lesión hepática aguda, tal como hepatitis viral aguda, la ALT y la AST se pueden elevar tan alto como 1.000 U/ml. En hepatitis o cirrosis crónica, la elevación de estas enzimas puede ser mínima (de 2-3 veces) o moderada (100-300 U/ml). Las elevaciones moderadas de ALT o de AST son no específicas y su causa puede ser por una amplia gama de enfermedades hepáticas. La ALT y AST se utilizan a menudo para analizar el curso de la hepatitis crónica y de la respuesta a los tratamientos, tales como prednisona e interferón.⁶

La fosfatasa alcalina y la GGT se elevan cuando se afecta el drenaje de bilis, en circunstancias como litiasis biliar o neoplasia que bloquea el conducto biliar común, o enfermedad alcohólica del hígado o hepatitis inducida por fármacos, bloqueando el flujo de la bilis en los pequeños conductos intrahepáticos. La fosfatasa alcalina también se produce en otros órganos, tales como hueso, placenta e intestino. Por esta razón, la GGT se utiliza como prueba suplementaria para determinar que la elevación de la fosfatasa alcalina es de origen hepático u obstrucción biliar. En contraste con la fosfatasa alcalina, la GGT no se eleva en las enfermedades del hueso, la placenta o el intestino. La elevación leve o moderada de GGT en la presencia de una fosfatasa alcalina normal es difícil de interpretar y es causada a menudo por los cambios enzimáticos de la célula hepática inducidos por el alcohol o medicamentos, pero sin causar lesión al hígado.⁶⁵

Las pruebas del funcionamiento hepático representan una amplia gama de las funciones normales realizadas por el hígado. El diagnóstico de las enfermedades hepáticas depende del de una historia clínica completa, de una exploración física completa, y de evaluación de las pruebas de funcionamiento hepático y otras pruebas invasoras y no invasoras.

La inflamación de las células hepáticas da lugar a la elevación en la aminotransferasa del alanina (ALT), la aminotransferasa del aspartato (AST) y posiblemente la bilirrubina. La inflamación de las células biliares da lugar predominante a una elevación de

fosfatasa alcalina. En la patología hepática existen interrelaciones entre la enfermedad puramente biliar y la enfermedad hepatocelular.^{6,65}

Aminotransferasa de Alanina (ALT): La ALT es la enzima producida por los hepatocitos. Poco útil en determinar la función hepática, Los niveles de ALT se aumentan en condiciones de inflamación o muerte celular hepática. Al dañarse o morir las células, hay liberación de de ALT hacia la circulación sanguínea que conduce a un incremento de los niveles séricos. Cualquier forma de daño celular hepático puede dar lugar a una elevación de ALT. Todos los tipos de hepatitis (viral, alcohólica, inducida por fármacos, etc.) dañan al hepatocito y puede conducir a elevaciones de ALT del suero. El nivel de ALT también se aumenta en casos de muerte celular hepática como resultando de otras causas, tales como choque o toxicidad inducida por fármacos. Esta enzima es el marcador más sensible de daño celular hepático. El nivel de ALT puede o no correlacionarse con el grado de muerte o inflamación hepatocelular. Una estimación exacta de la actividad inflamatoria o de muerte hepatocelular se puede hacer solamente por biopsia hepática.

Aminotransferasa de Aspartato (AST): Esta enzima también refleja daño a la célula hepática. Es menos específica que ALT en patología hepática ya que se produce en músculo y puede estar elevada en otras condiciones tales como infarto del miocardio. Aunque la AST no es específica para el hígado como la ALT, los cocientes entre ALT y AST son útiles en la determinación de la etiología de las anormalidades de estas enzimas en el hígado. En muchos casos de inflamación hepática, las actividades de ALT y AST se elevan en un cociente de 1:1 en hepatitis viral, hígado alcohólico y choque la elevación sérica de AST puede ser mayor a la de ALT.^{6,65}

Fosfatasa Alcalina: Es una enzima producida en los conductos biliares, el intestino, el riñón, la placenta y el hueso. Una elevación en el nivel de esta enzima en el suero, con niveles de AST y ALT normal o levemente aumentadas, sugiere patología de los conductos biliares. La actividad del esta enzima se puede elevar de manera marcada en la obstrucción hepatobiliar o en enfermedades hepáticas tales como cirrosis biliar primaria o colangitis esclerosante primaria. La fosfatasa alcalina también se produce en hueso por lo que su concentración sérica se puede también elevar en patología ósea.

Gamma-glutamiltanspeptidasa (GGT): Se produce en los conductos biliares. Las elevaciones en el suero de GGT, especialmente junto con elevaciones de fosfatasa

alcalina, sugieren enfermedad hepática. La medición de GGT es extremadamente sensible, sin embargo, y puede estar elevada virtualmente en cualquier enfermedad del hígado y a veces en individuos sanos. Elevaciones de GGT también están inducidas por muchas drogas, incluyendo el alcohol, y su actividad del suero se puede aumentar en bebedores pesados incluso en ausencia de daño o inflamación del hígado.

Deshidrogenasa Láctica (DHL): Enzima insensible como indicador de lesión hepatocelular, es mejor como marcador de hemólisis, puede estar considerablemente elevada en procesos malignos hepáticos, no de utilidad en diagnóstico de enfermedad hepática, ya que se produce en diversas partes del cuerpo, se observa su elevación en hepatitis viral aguda, cirrosis, carcinoma metastático a hígado, su elevación marcada en asociación con otras elevaciones en PFH puede reflejar malignidad hematológica como linfoma, ninguna elevación tiene valor significativo en diagnóstico como la elevación de aminotransferasas.^{8, 65}

EL ESTRES OXIDATIVO

Definición: Daño a moléculas producido por acciones de radicales libres o de especies reactivas de oxígeno.

El desequilibrio entre la producción de prooxidantes y antioxidantes en las células

¿De donde provienen?

"Especies reactivas" es el término que se aplica colectivamente a las moléculas químicas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. Las fuentes exógenas generadoras de especies reactivas de oxígeno en los organismos son antibióticos, medicamentos (p.e. paracetamol) contaminantes (p.e. dióxido de nitrógeno, ozono, humo de cigarrillo), quimioterapia y exposición a radiación ultravioleta e ionizante.⁸

Está comprobado que algunas de las especies reactivas de oxígeno, nitrógeno, fierro y cobre se generan en el metabolismo. Algunas de las especies reactivas que tienen funciones fisiológicas, (p.e. en la respuesta inmune) y su producción puede ser un factor importante que desencadene una variedad de funciones celulares.⁹

Otras fuentes endógenas de radicales libres son los metales de transición como cobre y fierro, sin embargo, la regulación en la generación de estas moléculas es importante

para evitar patologías, su incremento siempre acompaña a tejidos lesionados en la mayoría de las enfermedades humanas y puede darse por una disminución de las defensas antioxidativas (p.e. por acción de un xenobiótico) o incremento en la generación de especies reactivas (p.e. en presencia de toxinas que al metabolizarse generen especies reactivas) ¹⁰

En algunas patologías el estrés oxidativo tiene una contribución significativa en su desarrollo, como en la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, artritis reumatoide y el fenómeno llamado "paradoja del oxígeno" que se presenta posterior a un fenómeno de isquemia, durante la reperfusión, cuando el aporte de oxígeno no disminuye el daño sino que lo incrementa participando en reacciones de oxidación de proteínas y lipoperoxidación. ¹³

En la mitocondria se estima que del 2-4% del oxígeno consumido durante el transporte de electrones no se reduce a agua por la citocromo C oxidasa sino se forma el anión semiquinona el cual puede transferir uno o dos electrones al oxígeno molecular con la subsecuente formación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este, a su vez puede generar otras especies reactivas de oxígeno; en exceso reaccionan con toda clase de macromoléculas, estas causan anormalidades conductuales, citotoxicidad y daño mutagénico. ^{13,11}

El $O_2^{\cdot-}$ es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mediante la reacción Fenton con complejos de bajo peso molecular de Fe(II) como el citrato Fe(II) o la ATPFe(II) genera radicales hidroxilo ($OH^{\cdot-}$). A su vez los iones de cobre pueden participar en reacciones Fenton. La re-reducción y reciclaje de los iones fierro y cobre son catalizadas in vivo por el $O_2^{\cdot-}$ y el ascorbato. El proceso neto de producción de $OH^{\cdot-}$ a partir de $O_2^{\cdot-}$ y de H_2O_2 es la reacción Haber-Weiss en la cual los iones metálicos actúan como catalizadores. ^{11, 12}

Otras fuentes de $O_2^{\cdot-}$ y de H_2O_2 son las enzimas oxidativas, como la xantino oxidasa, las NADPH/NADH oxidasas, la acil CoA oxidasa y los citocromos P-450 y pequeñas moléculas autooxidables como las catecolaminas y las quinonas. ^{15,12}

En el sistema inmunológico de los organismos, en especial las células fagocíticas generan una importante cantidad de H_2O_2 , mediante NADPH oxidasa unida a membrana. Aunque las células no fagocíticas también generan H_2O_2 mediante NADPH

oxidasa esta es estructural y genéticamente diferente, y su tasa de generación es apenas el 1% del generado por las células fagocíticas.¹²

En el humano hay pruebas que señalan que el plasma sanguíneo y en los tejidos oculares se está generando H_2O_2 continuamente a partir de la oxidación del GSH y/o del ascorbato.^{13,14}

Bajo condiciones fisiológicas cada día el 3% de la hemoglobina total se convierte a la forma oxidada (metahemoglobina). La autoxidación de la hemoglobina resulta en la generación de $O_2^{\cdot-}$.¹⁵

Otra especie de oxígeno reactivo es el oxígeno en singlete que puede generarse cuando los electrones que han sido excitados por la luz pasan su energía de excitación a uno de los electrones desapareados del O_2 cambia su giro y se aparea con el otro electrón. También puede formarse durante la dismutación del $O_2^{\cdot-}$, en las reacciones de Haber-Weiss y por la descomposición H_2O_2 . Produce daños en las membranas celulares, causa modificaciones en los aminoácidos y daños al ADN.¹⁶

MECANISMOS ANTIOXIDATIVOS

Halliwell y Gutteridge (1998), propusieron la siguiente definición para antioxidante: "Aquella sustancia que se encuentra en pequeñas concentraciones comparada a un sustrato oxidable e inhibe o retarda significativamente la oxidación de dicho sustrato".

A partir de esta definición se considera que las defensas antioxidativas incluyen:

- a) Los agentes que remueven catalíticamente las especies reactivas,
- b) Las proteínas que minimizan la disponibilidad de prooxidantes como iones de hierro o cobre,
- c) Las proteínas que protegen biomoléculas por otros mecanismos y
- d) Agentes de bajo peso molecular que reducen las especies reactivas.

La importancia antioxidante de estas biomoléculas depende de la especie reactiva sobre la que actúan, donde y como se genera este, así como del daño que produce. Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción.¹³

Entre los antioxidantes sintetizados en las células animales se encuentran enzimas y agentes de bajo peso molecular. Entre las enzimas se cuentan:

a) La familia de las superóxido dismutasas (SOD). Esta familia está constituida por metaloenzimas que convierten el $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , se encuentran virtualmente en todos los organismos aerobios. Son cuatro tipos de enzimas: CuZnSOD, CuSOD, FeSOD y MnSOD.

b) La catalasa y las peroxidasas transforman el H_2O_2 a agua y están ampliamente distribuidas en bacterias aerobias, plantas y animales. La glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión transferasa participan en la detoxificación de xenobióticos como herbicidas, y usan el glutatión reducido (GSH) como sustrato. Las peroxidasas no específicas se han encontrado en plantas y bacterias y pueden usar una amplia gama de sustratos.¹⁷

En los fluidos extracelulares no se encuentran catalasas ni peroxidasas y la SOD se encuentra en cantidades muy pequeñas, sin embargo la lista de reductores extracelulares es amplia e incluye a proteínas con capacidad de prevenir reacciones catalizadas por iones metálicos, uniéndose a metales y complejos metálicos biológicos de hierro y cobre.^{13,19} Entre estos se cuentan:

a) Ceruloplasmina: tiene actividad ferroxidasa, se une a cobre e inhibe reacciones tipo Fenton

b) Transferrina y lactoferrina: se unen al hierro e inhiben reacciones tipo Haber Weiss,

c) Haptoglobina y Hemopexina participan en la inhibición de la peroxidación lipídica catalizada por la hemoglobina y

d) Albúmina que tiene función poco clara, se une al hierro y al cobre pero no inhibe las reacciones Fenton.¹²

Entre los agentes de bajo peso molecular de mayor importancia se encuentran:

a) El tripéptido glutatión (GSH) en su forma reducida, es el antioxidante que se encuentra en las mayores concentraciones intracelulares. Actúa como cofactor de la GPx para detoxificar H_2O_2 ; puede detoxificar radicales libres por vías no enzimáticas, p.e. participa en la detoxificación de drogas con grupos funcionales que reducen parcialmente al oxígeno molecular, la medición del glutatión oxidado (GSSG) es uno de los mejores medidores de la generación de oxiradicales de forma droga-dependiente. El GSH está involucrado en otros procesos metabólicos, como el mantenimiento de comunicación intercelular, el transporte intracelular de cobre y es cofactor de enzimas en diversas vías. Participa en la regulación del estado redox de los disulfuros en

proteínas con otras moléculas como la tioredoxina y glutaredoxina entre otros tioles. El GSH está sujeto a control hormonal y a su vez puede modular la expresión hormonal al regular los receptores hormonales en la membrana que contienen grupos tioles o disulfuros p.e. el receptor NMDA (N metil D aspartato) tiene grupos sulfidrilos y está sujeto a control redox.^{13,17,12,9}

b) La bilirrubina y el ácido úrico se han propuesto como antioxidantes al unirse a metales e impedir reacciones tipo Fenton. El ácido úrico también es eficiente protegiendo en contra del ozono y NO₂⁻.

c) Los aminoácidos con capacidad para secuestrar iones metálicos y su susceptibilidad para oxidarse en presencia de H₂O₂ y concentraciones fisiológicas de bicarbonato (Stadtman y Berlett, 1991).

d) La melatonina atrapa al radical OH⁻ además de estimular enzimas antioxidativas importantes (SOD, GPx y GR), se considera actualmente como un importante antioxidante. En dosis farmacológicas es efectiva para reducir el daño ocasionado por agentes tóxicos y paradigmas experimentales que inducen el estrés oxidativo.¹⁸

Los antioxidantes derivados de la dieta parecen ser importantes para mantener una buena salud complementando las funciones de las defensas celulares, entre los más importantes antioxidantes obtenidos a partir de la dieta están los carotenoides, el a tocoferol y el ácido ascórbico, los dos primeros son antioxidantes liposolubles que disminuyen el insulto fotoquímico en la oxidación de lípidos en el ojo y en la piel. El ácido ascórbico es requerido como cofactor por diferentes enzimas, en diversas enfermedades que producen estrés oxidativo hay disminución de niveles de ácido ascórbico (p.e. artritis reumatoide)^{13,15,17} Algunos antioxidantes tienen funciones paradójicas en tanto que pueden funcionar como prooxidante, p.e. el ácido ascórbico cuando está en presencia de fierro o cobre.^{13,15}

PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS EN LA SEÑALIZACION CELULAR

Algunas respuestas a oxidantes pueden involucrar sobreestimulación de vías de señalización reguladas por especies reactivas de oxígeno. Los cambios asociados con daño oxidativo y con reestablecimiento de la homeostasis celular frecuentemente llevan a la activación o inactivación de genes de factores de transcripción, enzimas de defensa antioxidativa y proteínas estructurales. Algunas familias de genes son activados por incremento del estrés oxidativo y responden aumentando las defensas antioxidativas^{17,9}

Las diferentes estrategias antioxidantes empleadas por las células, dentro de las membranas y en los fluidos extracelulares han originado la propuesta de que estas diferencias sean importantes para la señalización humoral¹⁹

La especie señalada como la más importante en la señalización en mamíferos es el H_2O_2 , que puede actuar como segundo mensajero. En concentraciones de 1-50 mM el H_2O_2 tiene una citotoxicidad limitada y puede ser utilizado como una molécula de señalización intra y extracelular. En zonas donde hay inflamación el H_2O_2 que generan los fagocitos modula el proceso inflamatorio regulando la expresión de moléculas de adhesión, controlando la proliferación celular y la apoptosis así como la agregación plaquetaria.¹⁴

En las células eucariontes el H_2O_2 actúa como segundo mensajero en la activación de las vías de señalización de estrés y que producen una respuesta genética común. Varias condiciones que inducen estrés oxidativo resultan en la activación de los factores de transcripción NFkB, (grupo de genes que parecen interactúa como una red de defensa contra condiciones patológicas) y del AP1 (dímero producto de los genes jun y fos). Hay otras vías que son activadas como la protein cinasa activada por mitógeno p389 (MAPK), el sistema de activación p53 y la respuesta al choque de calor. Estas vías participan en la regulación de respuestas celulares ante otros tipos de estrés, en el crecimiento normal y en el metabolismo.^{11,12}

Algunas bacterias exhiben respuestas diferentes ante diversas especies reactivas. Esta capacidad sugiere la presencia de moléculas sensoriales que responden específicamente. En *E. coli* se han identificado algunas moléculas con estas características: OxyR es una proteína que se produce en células expuestas a H_2O_2 o nitrosotioles, además regula la transcripción de 9 diferentes enzimas, entre las que se encuentran la glutatión reductasa y la alquilhidroperoxido reductasa. La proteína soxRS se activa ante óxido nítrico y O_2^- y la Frn sólo se expresa durante el crecimiento anaerobio.

Las especies reactivas también se han establecido como agentes mitogénicos, además de que regulan numerosos pasos en la señalización de factores de crecimiento. Se ha demostrado que pueden inducir señales iónicas similares a las mediadas por receptores como hiperpolarización de la membrana y cambios en el pH intracelular.¹²

Las especies reactivas de oxígeno en la mitocondria y en el citosol determinan el estado redox de residuos de grupos sulfidrilos críticos para el establecimiento de interacciones proteína-proteína. Los factores de transcripción contienen residuos de cisteína, por lo que el estado redox de los tioles regula la unión al DNA de factores como Fos y Jun modulando la actividad de transcripción.^{20, 16, 21}

PRINCIPALES ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Las enzimas antioxidantes son esenciales para las células aeróbicas, puesto que mantienen dentro de niveles aceptables las concentraciones de especies químicas conocidas como radicales libres, que se caracterizan por presentar un electrón desapareado y por ser muy reactivas. De todos los radicales resultan de gran interés las especies reactivas de oxígeno (ERO), debido a la estructura birradicálica de esta molécula y al gran número de procesos que las generan y en los que pueden verse involucradas, en los diversos procesos celulares. El hecho de que la célula disponga en tanta abundancia del dispositivo defensivo constituido por las enzimas antioxidantes, pone en evidencia el importante grado de toxicidad que poseen los radicales libres.²²

Durante el metabolismo aerobio se generan pequeñas cantidades de especies reactivas de oxígeno (ERO), incluyendo radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), aniones superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), como respuesta a estímulos externos e internos. Estas mínimas concentraciones de ROS pueden ser indispensables en muchos procesos, como el sistema de señales intracelulares (que está relacionado con otros procesos como la proliferación celular y la apoptosis), la inmunidad, y la defensa contra microorganismos.²³

Sin embargo, altas dosis o una eliminación inadecuada de ROS dan lugar a estrés oxidativo, que puede causar graves disfunciones metabólicas y daño a macromoléculas biológicas. Va a existir, por tanto, una relación entre los niveles de las enzimas antioxidantes y los tres tipos de moléculas mensajeras (factores de crecimiento, prostaglandinas y óxido nítrico) implicadas en la homeostasis celular, es decir, un equilibrio entre el mantenimiento de las condiciones estáticas o constantes en el medio interno celular y el nivel de ROS.^{24, 25}

En síntesis se le está dando la importancia de toxicidad que conllevan los radicales libres, durante los procesos biológicos donde una de las consecuencias del estrés oxidativo es la peroxidación lipídica, cuya prevención es esencial en todos los

organismos aerobios, ya que los productos derivados de este proceso pueden interactuar con el ADN y son potencialmente mutágenos. Los epóxidos formados pueden reaccionar espontáneamente con centros nucleofílicos en la célula o unirse a los ácidos nucleicos (ADN y ARN).

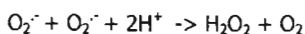
Esta reacción puede dar lugar a citotoxicidad, alergia, mutagénesis o carcinogénesis, dependiendo de las propiedades del epóxido en cuestión. En los organismos aerobios existen una gran variedad de sistemas de defensa antioxidante tanto enzimáticos como no enzimáticos, que se coordinan cooperativamente y protegen al organismo de los riesgos que conlleva el estrés oxidativo. Entre ellos destacan las actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT); glutatión (GSH) además del ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno, vitamina A, flavonoides y ácidos fenólicos.

Por otro lado, también existe una relación entre los niveles de ROS celulares y el incremento ó descenso de las actividades de las enzimas antioxidantes. La adición de H₂O₂ causa un incremento, dosis dependiente, del ARNm de CAT en células que se encuentran en crecimiento exponencial. Además, también se detecta un incremento de los niveles estacionarios del ARNm de GPX y SOD, cuando hay una sobreexpresión de alguna de las enzimas antioxidantes da lugar a un menor daño oxidativo. Cuando el ADN resulta dañado por radicales hidroxilo se produce la especie 8-oxo-2'-desoxiguanosina. La sobreexpresión de Cu/Zn-SOD y CAT causa un retardo en la acumulación de esta especie durante el crecimiento. El descontrol de todas estas especies reactivas de oxígeno puede, por tanto, afectar a diferentes procesos esenciales del organismo, siendo una de las piedras angulares en la génesis de distintas patologías.^{26, 27}

FUNCIONES ENZIMATICAS

Superóxido Dismutasa (SOD)

Descubierta por McCord y Fridovich (1969), constituye la primera fase de defensa antioxidante, cataliza la reacción de destrucción de los radicales superóxido (O₂⁻) mediante su transformación en peróxido de hidrógeno, el cual puede ser destruido a su vez por las actividades catalasa o glutatión peroxidasa.²⁸



Se han identificado cuatro clases de SOD: una de ellas contiene un cofactor con dos átomos metálicos, uno de Cu y otro de Zn. Las demás presentan cofactores mononucleares de Fe, Mn o Ni. FeSODs y MnSODs presentan homologías en cuanto a

sus secuencias y estructura tridimensional. Además poseen residuos quelantes idénticos en el sitio activo. En humanos existen tres tipos de SOD: la Mn-SOD mitocondrial, la Cu/Zn-SOD citosólica y la SOD extracelular (EC-SOD).

- **Mn-SOD**

Es un homotetrámero de 96 kDa que contiene un átomo de Mn en cada subunidad. El átomo metálico cambia su estado de oxidación desde Mn(III) a Mn(II), volviendo de nuevo a Mn(III), durante los dos pasos que constituyen la reacción de dismutación del $O_2^{\cdot -}$. La importancia biológica de la Mn-SOD se ha demostrado entre otros hechos por los siguientes:

- 1) La inactivación de los genes de Mn-SOD en *E. coli* aumenta la frecuencia de mutaciones cuando las bacterias crecen bajo condiciones aerobias.
- 2) La eliminación del gen en *Saccharomyces cerevisiae* aumenta su sensibilidad al oxígeno.
- 3) La falta de expresión de la enzima en ratones transgénicos da lugar a miocardiopatías y elevada mortalidad neonatal.
- 4) El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) induce selectivamente el ARNm de Mn-SOD, pero no el de Cu/Zn-SOD, CAT o GPX en tejidos de ratón y en células cultivadas.
- 5) La transfección de ADNc de Mn-SOD en células cultivadas les confiere resistencia a la citotoxicidad inducida por paraquat (una sustancia que induce la generación intracelular de $O_2^{\cdot -}$), TNF-alfa y adriamicina.
- 6) La expresión de genes humanos de Mn-SOD en ratones transgénicos los protege de lesiones pulmonares inducidas por oxígeno y toxicidad cardíaca inducida por adriamicina.

Así pues, aunque el contenido de Mn-SOD en tejidos humanos es aproximadamente la mitad del contenido de Cu/Zn-SOD, la expresión de Mn-SOD es esencial para la supervivencia de la vida aerobia y el desarrollo de resistencia celular a la toxicidad inducida por las sustancias reactivas de oxígeno.²⁹

- **Cu/Zn-SOD (SOD-1)**

Posee dos subunidades idénticas de unos 32 kDa, aunque a elevadas concentraciones de proteína en *E. coli* se encontró una estructura monomérica. Cada subunidad contiene un cluster metálico, el sitio activo, constituido por un átomo de Cu y otro de Zn. Mientras que la Mn-SOD existe en todos los tumores, y la relación de actividades Cu/Zn-SOD/Mn-SOD no difiere de la encontrada en tejidos normales, los tumores poseen menos Cu/Zn-SOD que los tejidos metabólicamente más activos. Por otro lado,

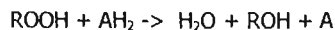
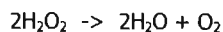
la Mn-SOD es esencial para la vida, mientras que la Cu/Zn-SOD no lo es: los ratones con el gen Cu/Zn-SOD truncado aparentan ser normales y sólo muestran anomalías después de un daño traumático, mientras que los que tenían truncado el gen Mn-SOD no sobreviven más de tres semanas. Por otra parte, la supervivencia de ratones expuestos al 100% de oxígeno aumentó cuando se les inyectaron intravenosamente liposomas conteniendo SOD y CAT antes y durante la exposición.

- **EC-SOD**

Es una glucoproteína tetramérica, que contiene Cu y Zn. Se ha encontrado en los espacios intersticiales de tejidos y también en fluidos extracelulares. La EC-SOD no es inducida por su sustrato u otros oxidantes, y su regulación en tejidos de mamíferos ocurre en primer lugar de un modo coordinado por citocinas, en vez de como respuesta de las células individuales a los oxidantes.

- **Catalasa (CAT)**

Es una enzima tetramérica, con cuatro subunidades idénticas de 60 kDa dispuestas tetraédricamente y contiene cuatro grupos de ferro-protoporfirina por molécula. Es una de las enzimas conocidas más eficientes, tanto que no puede ser saturada por H₂O₂ a ninguna concentración, catalizando su conversión en H₂O y O₂, para proteger a las células del H₂O₂ que se genera en su interior. Con dadores de H (metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles...) presenta actividad peroxidasa.



Por lo tanto, el H₂O₂ es catabolizado enzimáticamente en organismos aerobios por la catalasa y otras peroxidasas. En animales, el peróxido de hidrógeno se detoxifica mediante las actividades de la catalasa y la glutatión peroxidasa. Aunque la catalasa no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células. La catalasa captura el H₂O₂ antes de que pueda escapar de la célula y lo convierte en oxígeno molecular.

- **Glutatión peroxidasa (GPX)**

Está formada por cuatro subunidades idénticas, y cada una de ellas contiene un residuo de selenocisteína, que es esencial para su actividad enzimática. La GPX comparte su sustrato con la catalasa, pero además puede reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H₂O₂) usando glutatión reducido (GSH) que es

transformado en glutatión oxidado (GSSG) y así contribuye a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo.



Se han encontrado al menos cinco isoenzimas de GPX en mamíferos. Aunque su expresión es ubicua, el nivel de cada isoforma varía dependiendo del tipo de tejido. La GPX citosólica ó mitocondrial (GPX1) reduce los hidroperóxidos de ácidos grasos y el H_2O_2 a expensas del glutatión. La GPX1 y la GPX4 (PHGPX o fosfolípido hidroperóxido GPX) se encuentran en más tejidos. La GPX4 se localiza tanto en la fracción citosólica como en la membrana. PHGPX puede reducir directamente los hidroperóxidos de los fosfolípidos, peróxidos de ácidos grasos y hidroperóxidos de colesterol, que se producen en las membranas peroxidadas y en las lipoproteínas oxidadas.

La GPX1 se encuentra predominantemente en eritrocitos, riñón e hígado, y la GPX4 se expresa mayoritariamente en células del epitelio renal y en los testículos. La GPX2 citosólica (o GPX-G1) y la GPX3 extracelular (o GPX-P) se detectan escasamente en la mayoría de los tejidos, excepto en el tracto intestinal y el riñón, respectivamente. Recientemente se ha encontrado un nuevo miembro, la GPX5, que es independiente de selenio y se expresa específicamente en el epidídimo de ratón.

El ciclo rédox del glutatión es la mayor fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo, pero la catalasa es más importante a la hora de proteger contra el estrés oxidativo severo. En células animales, y especialmente en eritrocitos humanos, la principal enzima antioxidante para la destoxificación de H_2O_2 es la GPX, ya que la CAT presenta mucha menos afinidad por el H_2O_2 .¹⁸

RADICALES LIBRES EN PATOLOGÍA HUMANA

SU IMPORTANCIA Y SUS IMPLICACIONES CLÍNICAS

QUE ES UN RADICAL LIBRE ?

Es cualquier especie química capaz de existencia independiente y que contiene uno o más electrones no apareados. Esto conlleva a propiedades de atracción paramagnética y hace además que estas especies sean muy reactivas, comportándose como verdaderos misiles biológicos, ya que no requieren receptores específicos para cumplir su acción, sino que atacan o inestabilizan todo lo que encuentren al frente, no solo moléculas sino estructuras (ácidos nucleicos, membranas etc.). Sin embargo, estas acciones pueden ser reversibles.^{34,40}

COMO SE FORMA UN RADICAL LIBRE?

Se puede formar por la pérdida o ganancia de un electrón a partir de un no radical. Lo anterior puede suceder cuando se rompe un enlace covalente, quedándose un electrón compartido en cada átomo (fisión homolítica). Este proceso consume energía la cual puede ser aportada mediante radiación electromagnética, calor o sustancias químicas. ³⁴

CONCEPTO DE OXIDACION Y REDUCCIÓN

Oxidación consiste en un proceso de pérdida de electrones por un átomo o molécula.

Reducción: ganancia de electrones por un átomo o molécula.

Agente oxidante: es capaz de absorber electrones de la molécula a la cual oxida

Agente reductor: es un donador de electrones.

Agente antioxidante: aquel que en bajas concentraciones retarde la oxidación del sustrato.

ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ERO)

Desde el punto de vista fisiopatológico tienen interés las siguientes:

Súperoxido.-Involucrado en procesos de autooxidación.

Perhidroxi.-Radical libre liposoluble

Peróxido de Hidrógeno.-Tóxico sobre mitocondrias y el DNA. Ocasiona desbalance autonómico entre receptores muscarínicos (constrictores) y receptores β (vasorelajadores) a favor de los muscarínicos, especialmente a nivel del tracto respiratorio.

Hidroxilo.-Uno de los más reactivos. Tiene una acción directa sobre DNA. Ha sido llamado el pequeño cancerígeno. Se involucra en el proceso de peroxidación lipídica y en la ecuación de Fenton (magnificación del daño tisular en presencia de iones metálicos).

Alcoxi y Peroxi.-Involucrados en la peroxidación lipídica.

Acido Hipocloroso.-Producido por la mieloperoxidasa en polimorfonucleares activados. Tiene un gran papel en el daño tisular directo y a distancia en el proceso de inflamación.

Oxido nítrico. Es un gas hiporeactivo y de vida media ultracorta (5-10 segundos) Desempeña un papel benéfico, principalmente vasodilatador, antiadherente y antiagregante plaquetario. Es antimitótico y además responsable en gran parte del tono vascular, manteniéndolo en estado vasodilatador. Es producido constantemente en el endotelio sano. Es producido a partir de la L-Arginina mediante una enzima no ATP dependiente: la NO sintetasa constitutiva.

El endotelio disfuncionante, como primera, manifestación, deja de producir Oxido Nítrico lo cual ocasiona predominio de otras moléculas producidas por el endotelio: ECA tisular, Endotelina I (el vasoconstrictor más potente hasta la fecha conocido y prostaglandinas, especialmente PGH₂).

INTRODUCCIÓN

El endotelio en presencia de citocinas expresa la isoenzima NO sintetasa inducible, la cual produce enormes cantidades de NO, produciendo ya efectos adversos, principalmente vasodilatación o plejía vascular y efecto inotrópico negativo, como sucede típicamente en el shock séptico.

Peroxinitrito.- Producido cuando hay un desbalance entre el NO y radical superóxido. En exceso, es tóxico e incluso letal para la propia célula alterando el DNA

Citocromo P 450.-Producido por las mitocondrias y muy importante en el papel de oxidación de xenobióticos.³⁰

RADICALES LIBRES EN PATOLOGIA HUMANA

Como ya se mencionó los radicales libres tienen la capacidad de dañar, reversible o irreversiblemente compuestos bioquímicos tales como: ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos libres, lípidos, lipoproteínas, carbohidratos y macromoléculas de tejido conectivo. Ahora bien, estas alteraciones se manifiestan como disfunción de membrana o del metabolismo y/o en la expresión genética. Finalmente, los radicales libres pueden - y lo hacen fácilmente- amplificar o mediar la respuesta a toxinas.

INTERACCION DE LOS RADICALES LIBRES

Es muy importante tener en mente el hecho de que los radicales libres, son hipereactivos y se buscan entre sí para formar otras moléculas. Es así como se ha descrito en la ecuación de Haber-Weiss, en la cual el peróxido de hidrógeno reacciona con el oxígeno originando radical hidroxilo. A su vez, el radical hidroxilo, en presencia de hierro produce una amplificación del daño celular (ecuación de Fenton)³¹.

DAÑO PRIMARIO POR RADICALES LIBRES

Los radicales libres ocasionan daño primario por diferentes mecanismos moleculares, siendo los más sobresalientes la depleción de la forma reducida del dinucleótido de nicotinamida-adenina (NADH, a partir de la NADH oxidasa), disminución del glutatión reducido (GSH) disminución del adenosina trifosfato (ATP) y ocasionando finalmente un aumento del Ca⁺⁺ en el citosol (se produce una verdadera cito-calcinosis). Este proceso de daño primario se sucede en condiciones de estrés oxidativo (desbalance entre oxidantes y antioxidantes)³⁴

FUENTES DE RADICALES LIBRES

Los radicales libres son producidos tanto endógenamente como exógenamente.

Entre las fuentes exógenas, las más relevantes son las sustancias con acción oxidación-reducción (ciclo-redox) como el paraquat, diquat, aloxano, doxorubicina etc.; oxidación de drogas (tetracloruro de carbono, paracetamol); tabaquismo; radiación ionizante; luz solar; shock de calor y las sustancias que oxidan el glutatión.

El organismo humano tiene endógenamente múltiples fuentes que dan origen a las especies reactivas de oxígeno. Se producen a nivel de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, en la cadena de transporte de electrones microsomal y a nivel de los cloroplastos.

Son producidos principalmente por células endoteliales, leucocitos, macrófagos, y en general, se producen como un desecho metabólico

ANTIOXIDANTES

Se define como antioxidante a cualquier sustancia o molécula que en pequeñas concentraciones retarde o inhiba la oxidación de un sustrato, o que disminuya la concentración local de O₂, o que prevenga la formación de radicales libres, o que ligue metales antes de que unan con el radical hidroxilo. También a cualquier sustancia que barra radicales libres, o finalmente, cualquier especie química que rompa cadenas de peroxidación (fenoles o aminas aromáticas).³²

Para tal fin, el organismo humano está dotado de defensas antioxidantes y otras que han sido sintetizadas por el hombre.

DEFENSAS ANTIOXIDANTES.-De estas, las más importantes son la superoxidodismutasa, Coenzima Q10, β-caroteno, tocoferoles, ácido úrico, el alopurinol, los fármacos IECAS, calcioantagonistas dihidropiridínicos, los inhibidores de receptores de angiotensina, el ácido ascórbico, el Ginkgo Biloba (EGb 761) las sustancias quelantes, el selenio y la N-acetilcisteína, entre otros.

SUBSTANCIAS ANTIOXIDANTES INTRACELULARES:

El organismo está dotado de una serie de enzimas antioxidantes que contrarregulan un eventual exceso de especies reactivas de oxígeno, evitando el estrés oxidativo. Pero en caso de desbordamiento de los oxidantes, o la disminución o bloqueo de estas enzimas, generarán estrés oxidativo y el consiguiente daño endotelial.³⁶

Estas son:

-Superóxidodismutasa (SOD) Dismuta al radical superóxido Previene el estrés oxidativo.

INTRODUCCIÓN

Catalasa.- Cataliza la reacción que convierte al radical superóxido en agua y oxígeno. Esta reacción se presenta básicamente a nivel de los peroxisomas)

Glutación peroxidasa.-Oxida H_2O_2 y peróxidos orgánicos

Glutación (GSH).-Básica e importantemente previene la peroxidación de membranas

Radical sulfidrilo.-Actúa fundamentalmente como capturador o barredor de radicales libres.

Coenzima Q10.-Desempeña un papel preponderante en el sistema de transporte de electrones mitocondrial (cadena respiratoria) , teniendo además un efecto muy favorable a nivel del metabolismo energético -especialmente en corazón. De depleta en el miocardio enfermo, especialmente en el tejido isquémico.

DEFENSAS ANTIOXIDANTES EXTRACELULARES

A nivel extracelular existen una serie de elementos que protegen al organismo contra el ataque del exceso de estrés oxidativo .Entre otras, las más importantes son:

a) Transferrina-lactoferrina. Inhibe la peroxidación lipídica b) Ceruloplasmina. Oxida Fe^{++} a Fe^{+++} sin producir radical OH. Inhibe la lipoxidación y es uno de los más potentes antioxidantes del plasma c) Albúmina.-Liga Cobre y Hierro. Se le ha llamado antioxidante de sacrificio, ya que comparativamente entre su cantidad y su acción es mucha la diferencia

d) Haptoglobina-homopexina. Liga hemoglobina libre y grupo heme.

e) Acido úrico. Potente antioxidante endógeno. Inhibe la lipoxidación.

f) Glucosa.-Es un barredor (débil) de OH-.

g) Vitamina E.-Rompe reacciones de cadena. Es un potentísimo antioxidante al igual que un excelente barredor de radicales libres. Es el antioxidante más importante en el organismo (liposoluble)

y como tal preserva membranas ^{33,34}

CONDICIONES CLINICAS EN LAS CUALES SE HA RELACIONADO A LOS RADICALES LIBRES

Actualmente la lista de procesos patológicos en los cuales los radicales libres se cree que están estrechamente relacionados, está día a día en expansión. No se pretende aquí hacer una descripción de las diferentes entidades nosológicas. Simplemente se enumerarán las enfermedades en donde se ha demostrado su relación o asociación con las especies reactivas de oxígeno: ³⁵

Insulto inflamatorio/inmune

- Glomerulonefritis membranosa idiopática Vasculitis. Hepatitis B y hepatitis por drogas
- Enfermedades autoinmunes

Estados isquemia-reperusión

Reacciones inducidas por drogas-toxinas

Sobrecarga de Hierro

- Hemocromatosis idiopática
- Dietética Talasemia. Otras anemias

Deficiencias nutricionales

- Kwashiorkor. Deficiencia de vitamina E

Alcohol

Corazón y sistema cardiovascular

- Cardiomiopatía alcohólica
- Enfermedad Keshian (deficiencia selenio)
- Ateroesclerosis

Eclampsia

Riñón

- Síndrome nefrótico (anticuerpos antimembrana)
- Nefrotoxicidad por aminoglucósidos
- Nefrotoxicidad por metales pesados
- Rechazo trasplante renal

Tubo Digestivo

- Pancreatitis por Ácidos Grasos Libres
- Insulto hepático por endotoxinas
- Insulto hepático por CCl₄. Diabetes inducida por aloxano

Articulaciones

- Artritis reumatoide

Insulto por Radiación

Envejecimiento

- Alteraciones por envejecimiento prematuro (progeria)
- Deficiencia inmunológica de la vejez

Cáncer

Enfermedad por amiloide

Compromiso de órganos simples

Eritrocitos: malaria. Protoporfirina. Anemia células falciformes.

favismo. Anemia Fanconi

Pulmón

Tabaquismo

Enfisema

Hiperoxia Displasia broncopulmonar

Polución de oxidantes

Síndrome dificultad aguda respiratoria del adulto

Neumoconiosis

Toxicidad por drogas (amiodarona)

Ojos

Cataratogénesis

Hemorragia intraocular

Daño retiniano degenerativo

Retinopatía por inmadurez

Piel

Radiación solar

Insulto por hipertermia

Porfirias

Dermatitis de contacto

Síndrome de Bloom

Cerebro

Oxígeno hiperbárico

Neurotoxinas

Demencia senil

Enfermedad de Parkinson

Alzheimer

Potenciación de daño por accidente cerebro vascular y por trauma

cerebral Encéfalo mielitis alérgica. Enfermedades desmielinizantes

Síndrome ataxia-telangiectasia

Abetalipoproteinemia

Sobrecarga de aluminio.

RADICALES LIBRES E ISQUEMIA-REPERFUSIÓN-REOXIGENACIÓN-

Con el advenimiento y gran auge de la revascularización en la cirugía de trasplantes se ha aprendido que en estos procedimientos, al reoxigenar los tejidos previamente isquémicos, ocasionan una serie de alteraciones que están mediadas por los radicales libres (DAÑO OXIDATIVO). El conocimiento de estos aspectos ha sugerido la posibilidad de prevenir estas consecuencias, empleando antioxidantes antes del procedimiento, así el estudio de los mecanismos moleculares o de señalización celular.

Se ha imputado como mecanismo deletéreo de la reoxigenación precisamente la formación de radicales libres a partir de un estado de hipoxia.

Los radicales libres producidos durante la reoxigenación se forman a partir de las siguientes fuentes biológicas: mitocondrial, por las células endoteliales, macrófagos, polimorfonucleares (PMN): neutrófilos.³⁶

ISQUEMIA-REPERFUSION

En cirugía, existen diversos procedimientos en donde es inevitable la interrupción del flujo sanguíneo al hígado, como en el manejo de trauma hepático, hepatectomías parciales, trasplante hepático, etc. Cuando el hígado es sometido a una situación de isquemia transitoria, total o parcial, se sabe que desarrolla una lesión por la isquemia-reperfusión, que no se ha podido prevenir aun con el advenimiento científico de nuestra era.

En la isquemia-reperfusión se desarrollan una serie de fenómenos fisiopatológicos complejos en los que se implican todos los componentes celulares del parénquima hepático, así como del endotelio vascular. Durante la isquemia, la hipoxia y otras situaciones de déficit energéticos, algunas proteasas citosólicas se activan por el aumento del calcio intracelular y catalizan la conversión de xantina deshidrogenasa (XD) a xantina oxidasa (XO). La xantina oxidasa, utilizando la hipoxantina por un lado y por otro el oxígeno molecular, aportado en la reperfusión, cataliza la formación del radical superóxido⁸. Los radicales libres formados, durante el período de reperfusión, atacan los enlaces insaturados de los ácidos grasos libres en la bicapa fosfolipídica de la membrana celular. Esta reacción, denominada lipoperoxidación, se propaga en cadena y provoca la fragmentación de la membrana celular y, con ello, severas alteraciones estructurales y funcionales de la membrana, finalizando en un daño celular

Irreversible. En esta reacción se generan aldehídos, que se utilizan como indicadores del grado de peroxidación³⁷

El uso de antioxidantes y scavengers o eliminadores de radicales libres (superóxido-dismutasa, alopurinol, vitamina E, captopril, propanolol, etc.) podrá disminuir la reacción de lipoperoxidación y, con ello, la cadena patogénica de la isquemia-reperfusión, con un posible efecto beneficioso sobre la función hepática.

En el hígado existe información contradictoria sobre la acción del óxido nítrico en las situaciones de estrés oxidativo. Se ha descrito su papel oxidante, pero también se conoce su capacidad generadora de potentes intermediarios oxidativos¹.

El flujo sanguíneo de los pequeños vasos (microcirculación), durante la perfusión tiene un papel central en el daño que aparece durante la perfusión. La flujometría mediante láser-Doppler se ha demostrado como un método útil para medir el flujo tisular hepático, demostrándose una relación entre la mayor duración de la isquemia, con un menor flujo y oxigenación tisular, durante la primera hora tras la perfusión.

Así pues, la isquemia-reperfusión va a generar una reacción de lipoperoxidación más o menos intensa, dependiendo del tiempo de isquemia, asociada a una disminución del flujo sanguíneo y oxigenación tisular. Como consecuencia de estos fenómenos, aparecerá una alteración en la función hepática.³⁸

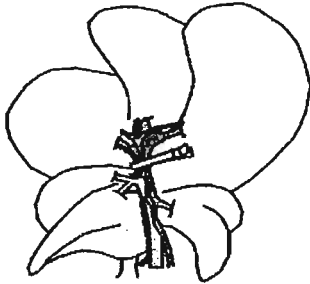
Fundamentos patogénicos de las lesiones por isquemia-reperfusión

El conocimiento de los fenómenos de isquemia-reperfusión es de gran interés en los trasplantes de órganos, ya que están implicados en los acontecimientos fisiopatológicos de la revascularización del órgano tras la isquemia fría. También existen otras situaciones clínicas frecuentes, como los traumatismos importantes de extremidades, para las que en su tratamiento quirúrgico se precisa mantener la extremidad sin flujo sanguíneo, desencadenándose los fenómenos de isquemia-reperfusión.

Cada órgano o tejido del organismo tiene una sensibilidad y resistencia distinta para la pérdida total o parcial de su flujo sanguíneo, que varía desde pocos minutos en el caso del cerebro, a horas en el caso de las extremidades. Por otro lado, en las situaciones patológicas donde se disminuye de forma aguda o crónica la perfusión sanguínea de los órganos, aparecen lesiones no sólo en el órgano diana, sino también sistémicas. Por ejemplo, en el caso del shock hemorrágico, se puede terminar desarrollando, si la

volemia no se restablece adecuadamente, un fallo multiorgánico. Lo mismo puede suceder ante disminuciones del flujo sanguíneo total de un órgano, como es el caso de la embolia mesentérica, etc.

Se han descrito diferentes tipos de isquemia: la isquemia caliente, que sucede con la interrupción del flujo sanguíneo, y en la que la temperatura del órgano se mantiene al mismo nivel que tiene habitualmente en el organismo (fig. 2), y la isquemia fría, que se desarrolla con el órgano fuera del organismo, a una temperatura de 4 °C, con la finalidad de entretener el metabolismo del órgano al máximo antes de ser implantado.



2. Modelo experimental de isquemia caliente en hígado de ratón.

Finalmente, con el desarrollo de los donantes a corazón parado se han desarrollado una serie de técnicas de preservación *in situ* de los órganos para mantenerlos hasta que se pueda hacer la extracción multiorgánica de los mismos, donde el órgano se mantiene a unos 12-14 °C (isquemia tibia) durante el menor tiempo posible.

Durante el proceso de abolición del flujo sanguíneo de un órgano, y su posterior restauración, se desarrollan cronológicamente una serie de lesiones, que en función de su reversibilidad o no van a hacer que un órgano o tejido tenga o no posterior viabilidad funcional.

La primera fase se caracteriza por la lesión isquémica, en la que se interrumpe el aporte de oxígeno al órgano y el metabolismo celular del mismo se transforma de aerobio en anaerobio. A partir de este hecho, si el flujo sanguíneo no se restablece se produce una secuencia de hechos bioquímicos que llevan a la disfunción celular, al edema intersticial y finalmente a la muerte celular. El metabolismo anaerobio existente, junto con el aumento del ácido láctico local, provocan una acidosis metabólica, con disminución del nivel energético que se asocia a alteraciones en el gradiente transmembranal celular que impide el mantenimiento de la homeostasis celular. Con la

disminución del nivel energético y degradación de los metabolitos de alta energía aparece una disfunción del sistema de transporte transmembranal que genera un incremento del Ca^{2+} citosólico. El aumento del Ca^{2+} activa diferentes sistemas enzimáticos, actuando como segundo mensajero, tales como fosfolipasas y proteasas, implicados fundamentales en la respuesta inflamatoria que posteriormente se desarrollará. Además, se cambia el flujo de algunos sistemas enzimáticos mediante la activación de la enzima xantina oxidasa y secundariamente a la producción de peróxido de hidrógeno.

La disminución del flujo sanguíneo, durante un período de tiempo predeterminado, puede realizarse de forma ininterrumpida o de forma intermitente, es decir, intercalando entre los períodos de tiempo sin flujo sanguíneo otros con recuperación del flujo tisular del órgano, comprobándose experimentalmente que la función y vitalidad del hígado es la misma al finalizar el período isquémico, con independencia del método que se utilice. Es decir, provoca la misma alteración en el hígado la interrupción continua durante 30 min del flujo sanguíneo que la interrupción del flujo durante 30 min pero en períodos de 10 min⁴. Se ha demostrado que períodos de tiempo de isquemia mayores de 60 min son capaces de provocar alteraciones irreversibles en la estructura hepática, y estas lesiones irreversibles empeoran cuando a la isquemia se le asocia un período de reperfusión. Se ha observado que durante la restauración de nuevo del flujo sanguíneo se producen la mayoría de las lesiones o, al menos, se ponen de manifiesto aquellas que se habían iniciado durante la isquemia, denominándose por ello lesión por reperfusión.³⁹

Durante la reperfusión, proceso imprescindible para la viabilidad del órgano, se produce el restablecimiento del flujo sanguíneo y se recupera el nivel energético que había disminuido durante la isquemia. También se ponen de manifiesto los efectos de los metabolitos tóxicos, que se habían formado durante la fase previa, que pueden tener repercusión sistémica y local⁴⁰. Al inicio de la reperfusión aparecen una serie de lesiones, que son distintas de las que aparecen a las 4-6 h del inicio de la reperfusión. A nivel sistémico, aparece una acidosis metabólica y una hipercalemia que, si no se compensan, pueden conducir a la muerte del sujeto. Aparecen, además, mioglobinemia y mioglobinuria, y en el pulmón se describe un aumento de la permeabilidad microvascular y una acumulación de neutrófilos, pudiéndose desarrollar el denominado edema pulmonar no cardiogénico (pulmón de choque).

A nivel local, en el hígado, durante la reperfusión, aparece el fenómeno de "no reflujo", caracterizado por la imposibilidad de la reperfusión del órgano debido a la obstrucción progresiva en la microcirculación. Aunque no se sabe exactamente su mecanismo de producción, se ha observado que se puede prevenir su aparición con la administración de agentes fibrinolíticos durante el inicio de la reperfusión y que, como veremos más adelante, tienen un papel fundamental la adhesión de los leucocitos al endotelio y la activación de éste.

Finalmente, se ha descrito la lesión de preservación, que aparece tras la isquemia fría. Es importante reseñar que los procesos que ocurren durante este período tendrán trascendencia en la viabilidad del injerto una vez trasplantado.⁴¹

Se han implicado numerosos metabolitos y células en la lesión por isquemia-reperfusión, con una importancia diferente según el momento en que intervienen en la misma.⁴² A continuación analizaremos los más importantes.

El calcio

Es uno de los primeros implicados en la patogenia de la lesión por isquemia-reperfusión. Durante la isquemia aparece inmediatamente un aumento citosólico del calcio, activándose diferentes sistemas enzimáticos que, con la reoxigenación del órgano, producirán a su vez una activación de los mediadores de la inflamación.

Se han usado distintos bloqueadores de los canales del Ca^{2+} en modelos experimentales de isquemia caliente. El verapamilo, el nicardipino y el nimodipino sólo protegen de la lesión por isquemia-reperfusión cuando se administran antes de la realización de la misma, implicándose en su mecanismo de acción protectora la activación de proteasas que convierten la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa. Así mismo, también mejoran la microcirculación durante la reperfusión, aumentando el flujo tisular hepático durante este período.

La utilización de estos antagonistas del calcio en estudios de preservación hepática también ha demostrado la mejor funcionalidad hepática del órgano, aunque otros autores no han encontrado diferencias con respecto al grupo control.⁴³

El papel del Ca^{2+} , por tanto, está todavía en discusión, y se necesitarán nuevos estudios para definir completamente el papel de este ión en la isquemia-reperfusión hepática.

El endotelio vascular

Desempeña un papel muy importante en la lesión por isquemia-reperfusión. Se produce una activación de su superficie endotelial que conlleva la secreción de mediadores de la inflamación que facilitarán posteriormente la penetración de los neutrófilos en el parénquima hepático. En su superficie se observan receptores para interleucinas, complemento, etc., mediadores que participan en el desarrollo de la lesión por isquemia-reperfusión. Muchas de estas respuestas del endotelio vascular a la lesión no son exclusivas de la lesión por isquemia-reperfusión, sino que también aparecen en la inflamación.

Entre los mediadores que se han implicado en la lesión por isquemia-reperfusión cabe destacar algunas citocinas. La interleucina 1 y el factor de necrosis tumoral activan la célula endotelial para que exprese las moléculas de adhesión, a la vez que activan a los neutrófilos a través de la interleucina 8. Así mismo, también están implicadas en la producción y modulación de los radicales libres, ya que éstos disminuyen cuando se administran anticuerpos contra la interleucina 1.

La endotelina 1 es un potente vasoconstrictor local, derivado de las células endoteliales, que regula fisiológicamente la microcirculación de los tejidos. Se ha comprobado que está implicada en los mecanismos de isquemia-reperfusión. La administración de suero antiendotelina 1 disminuye las lesiones por isquemia-reperfusión al mejorar el flujo sanguíneo local.⁴⁴

En estudios de isquemia caliente realizados en perros, con diferentes tiempos de isquemia, se ha observado que los valores portales de endotelina son mayores que los sistémicos, y este aumento es más acusado cuanto mayor es el tiempo de isquemia practicado.

Los neutrófilos

Están implicados en la lesión por isquemia-reperfusión hepática. Su papel ha quedado demostrado, no sólo por su presencia en las muestras anatomopatológicas tomadas tras este fenómeno, sino también en diferentes tipos de estudios funcionales. Cuando se realiza una neutropenia periférica sanguínea, se observa una disminución del número de neutrófilos en el tejido hepático asociado a una disminución de la lesión por isquemia-reperfusión. En los procesos inflamatorios, la adhesión de los leucocitos a la célula endotelial es un requisito necesario e imprescindible para que migren dentro del tejido lesionado. La migración la realizan a través de las moléculas de adhesión, que se

hallan habitualmente en el endotelio vascular del huésped y que son reguladas por el mismo mecanismo de quimiotaxis.⁴⁵

La mayoría de las lesiones por reperfusión están mediadas por los neutrófilos que se fijan al endotelio a través de una glucoproteína adhesiva, denominada CD 18, que parece ser la señal que necesita el neutrófilo para producir H₂O₂ y proteasas en el espacio extracelular. Esta adhesión está influida por factores plasmáticos, nucleótidos cíclicos, productos de las lipooxigenasas y factores plaquetarios. Los neutrófilos se adhieren bien a nivel precapilar o en las vénulas poscapilares, provocando un aumento de la viscosidad sanguínea que podría explicar en parte el fenómeno de "no reflujo" que a veces sucede en la reperfusión.

Una vez que los neutrófilos han pasado al tejido hepático, se constituyen en una fuente de mediadores citotóxicos, fosfolipasas, peroxidasas, proteasas y radicales libres. Los neutrófilos migran desde el endotelio hacia los hepatocitos, a través de los sinusoides venosos, por un mecanismo que parece dependiente de las integrinas 1. En el caso de una situación de estrés oxidativo están involucradas, además, las integrinas 2, la Mac-1 en el neutrófilo, y la ICAM-1 en la célula endotelial. Los neutrófilos provocan la lesión celular a través de dos mediadores citotóxicos mayores: los compuestos oxígeno reactivos y las proteasas, sobre todo catepsina y elastasa, que son las responsables de la necrosis parenquimatosa. Durante la preservación fría del hígado se ha demostrado un aumento de la adherencia leucocitaria al endotelio, que es más elevada cuanto mayor es el tiempo de isquemia fría, lo cual podría estar relacionado con el fallo primario del injerto. La importancia de los mecanismos de adhesión leucocitaria varían según el hígado sea sometido a períodos cortos o prolongados de preservación. En el caso de períodos cortos de preservación en la patogenia de la lesión generada, tienen más importancia los radicales libres y las células de Kupffer, mientras que en el caso de períodos prolongados, son las proteínas de las superficie celular las que desempeñan un papel más importante.⁴⁶

Finalmente, debemos reseñar que los leucocitos activados pueden inducir, por la vía del ácido araquidónico, un incremento de leucotrienos, que también están implicados en la lesión por isquemia-reperfusión.

Activación del complemento

Durante la isquemia-reperfusión asistimos a la activación del complemento en la superficie endotelial, preferentemente a través de la vía alternativa.

La actividad del complemento es la resultante de la interacción de las proteínas que lo forman, que se encuentran en las membranas celulares y en gran número de proteínas plasmáticas, provocando la opsonización de células fagocíticas y activación de los mecanismos de la inflamación. Cuando se activa localmente, puede inducir la adherencia leucocitaria en el endotelio vascular, diapédesis de los neutrófilos y migración de los mismos a los focos inflamatorios con su posterior descarga de productos citotóxicos y bactericidas⁴³. Con la depleción del complemento se ha conseguido disminuir el infiltrado leucocitario en la zona de isquemia-reperfusión⁴⁴. Estudios experimentales, con inhibidores solubles del complemento (sCR1) y frente a otros elementos del complemento, han demostrado una disminución de las lesiones por isquemia-reperfusión.

Los metales pesados

Son elementos que también se han implicado en la lesión por isquemia-reperfusión. Contribuyen a la desintoxicación y catálisis de los radicales libres. Sobre todo, el hierro y el cobre tienen importancia en la formación de radicales libres, mientras que el selenio es un constituyente de la enzima glutatión peroxidasa, imprescindible para la reducción de los hidroperóxidos lipídicos a su forma análoga. El zinc evita la oxidación de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa e interactúa con el hierro y el cobre previniendo sus efectos prooxidantes. Además, el zinc, junto con el cobre, es un cofactor de la superóxido dismutasa.

El hierro puede catalizar la degradación de los lipoperóxidos dentro de compuestos carbonilos citosólicos, como aldeídos e hidroxiálcalis, algunos de los cuales, como el malondialdehído, pueden provocar la rotura de la membrana celular e inactivar los sistemas enzimáticos y de transporte. Durante la isquemia, se produce una acumulación intracelular de hierro y puede ser utilizado posteriormente para la formación de radicales libres derivados del oxígeno. Durante la perfusión, la administración de desferroxamina (quelante del hierro) ejerce un efecto protector sobre la lesión por isquemia-reperfusión en muchos tejidos del organismo, no sólo en el hígado.⁴⁷

Secuestrando el hierro, en forma de ferritina, se puede disminuir la producción de radicales libres, ya que la formación de OH necesita la presencia de metales como hierro y cobre para su producción. Finalmente, algunos autores han demostrado que dietas con sobrecarga de hierro provocan una depleción en los antioxidantes endógenos y, por tanto, aumento de la tendencia oxidante, ocasionando lesiones moderadas.⁴⁸

Los radicales libres de oxígeno

Son sustancias que tienen uno o varios electrones no apareados en su estructura y han sido ampliamente implicados en la patogenia de la lesión por isquemia-reperusión⁵⁴. Por ser sustancias inestables, tienden a producir reacciones en cadena hasta generar compuestos más estables. Durante este proceso se producen compuestos intermedios que pueden o no generar lesiones, dependiendo de los compuestos que alteren o de las reacciones que condicionen.

Los radicales libres se producen de forma fisiológica en el organismo humano en diferentes fuentes: como componentes del sistema de transporte electrónico mitocondrial, en el retículo endoplásmico, durante la síntesis de prostaglandinas y sistemas de las lipooxigenasas, de proteínas y enzimas, y también se producen por autooxidación de numerosos compuestos. De ello se deducen la gran cantidad de relaciones que los radicales libres pueden tener con numerosas situaciones de homeostasis intra y extracelular.⁴⁹

En situaciones patológicas de reperusión, tras una disminución o abolición del flujo sanguíneo, las fuentes de radicales libres más importantes son los siguientes sistemas enzimáticos: la xantina oxidasa, la oxidasa NADPH de los neutrófilos, la lipoperoxidación, la oxidasa de las catecolaminas y la síntesis de las prostaglandinas.

El complejo enzimático xantina oxidasa. En el hígado ha sido identificado como una deshidrogenasa tipo D (xantina deshidrogenasa tipo D), dependiente de NAD⁺ y una oxidasa dependiente de O₂ (xantina oxidasa tipo O). La oxidación de la deshidrogenasa tipo D es estimulada por NAD⁺ con formación de NADP, mientras que la de la deshidrogenasa tipo O no modifica su actividad en presencia del NAD⁺. La xantina oxidasa es un complejo molibdoflavoproteína que se asume que es una enzima encargada del catabolismo de las purinas en muchos tejidos, y provoca la oxidación de hipoxantina a xantina y ácido úrico, con la generación del radical superóxido.

En condiciones normales, cerca del 98% de la reducción del oxígeno es catabolizado por el complejo citocromo oxidasa en la mitocondria, produciendo H_2O_2 , que es un compuesto totalmente inocuo, sin la detección de formas intermedias oxígeno reducidas. Según el número de electrones que se reduzcan en el oxígeno molecular, uno, dos o tres, se producen superóxido O_2^- , peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o radical hidróxilo OH, respectivamente. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es citotóxico debido a su moderada capacidad oxidativa, siendo usado comúnmente como antiséptico. El radical hidróxilo es extremadamente reactivo e inestable, y un potente oxidante de radicales libres, produciéndose a partir de una reacción catabolizada por metales, entre el O_2^- y el H_2O_2 . Fisiológicamente provoca un gran daño oxidativo no específico, además de iniciar reacciones radical libre. En cuanto al superóxido, es una sustancia químicamente buena reductora y moderadamente oxidativa, que también puede iniciar reacción radical libre. Puede ser citotóxico en gran número de circunstancias, como son la toxicidad del oxígeno, daño por radiaciones, inflamación mediada por células fagocíticas y la lesión por isquemia. Sus concentraciones en los tejidos y sangre se han utilizado como un parámetro de actividad radical libre. Así mismo, también se ha estudiado qué células dentro de los tejidos son las que lo producen, observándose que los neutrófilos y las células de Kupffer pueden generarlo, no sólo en situaciones de isquemia caliente, sino también durante la preservación fría.

Las moléculas radicales libres oxígeno provocan un daño a las membranas celulares, directamente por la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y de los fosfolípidos de la membrana. Este fenómeno es producido preferentemente por el anión superóxido o por el radical hidróxilo, aunque también los radicales peróxido lipídicos e hidróxilos lipídicos poseen actividad oxidante y, por tanto, capacidad de ampliar el efecto lesivo. El daño de la membrana celular puede afectar a su integridad o la de organelas celulares importantes, como lisosomas y mitocondrias, comprometiendo seriamente la función celular.

En el proceso de isquemia-reperfusión, durante el período de revascularización, la enzima xantina oxidasa es la mayor fuente de radicales superóxido, los cuales se forman a partir de la hipoxantina, acumulada por la degradación de las moléculas energéticas durante el período de isquemia. La xantina deshidrogenasa tipo D, que es como se encuentra la enzima en los tejidos no lesionados, pasa por una proteasa

dependiente del Ca^{2+} a xantina oxidasa O, durante el período de isquemia, la cual, a su vez, en presencia de oxígeno durante la reperusión, transforma la hipoxantina a peróxido de hidrógeno, anión hidrógeno y ácido úrico.

Se han descrito dos formas de transformar la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa: una forma irreversible, que sucede en la mayoría de los tejidos, por la acción proteolítica existente durante la isquemia, y otra forma de conversión reversible, que se halla precedida por la disminución de glutatión durante la isquemia. Secuencialmente primero sucede la conversión reversible y con posterioridad la irreversible.⁵⁰

La administración de anticuerpos contra la xantina oxidasa ha facilitado que se pudiese crear un mapa de su localización, detectándose su presencia en las células endoteliales de muchos tejidos, entre ellos el hígado, corazón, pulmón y riñón, pero no se ha detectado en las células epiteliales de estos órganos, así como tampoco en los leucocitos, linfocitos, macrófagos ni eritrocitos.

Actualmente se discute si la transformación de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa se produce durante el período de isquemia hepática o en los primeros momentos de la re perfusión. Se ha observado que los valores de hipoxantina y xantina aumentan progresivamente con el mayor tiempo de isquemia, mientras que la cantidad de enzima xantina deshidrogenasa más xantina oxidasa permanece constante durante 90 y 120 min de isquemia y en la reperusión⁶³. Otros estudios con inhibidores de la xantina oxidasa, como el alopurinol, han demostrado que el estado oxidante durante la reperusión no es debido únicamente a los radicales superóxido. Por otro lado, diversos estudios con las técnicas de quimioluminiscencia han demostrado la producción de radicales libres oxígeno durante la isquemia-reperusión en cultivos celulares hepáticos y de células endoteliales.⁵¹

La influencia de los radicales libres en la lesión por isquemia-reperusión hepática ha quedado patente en diferentes estudios. La administración de scavengers de los radicales libres en diferentes estudios experimentales en perros, y en modelos de isquemia caliente hepática en ratas⁵², ha demostrado su efecto protector. En un modelo de isquemia intestinal en gatos se observó una disminución de la lesión hepática y un aumento de la permeabilidad vascular con inhibidores de la xantina

oxidasa, comprobándose además que esta enzima es la mayor fuente de radicales libres en el intestino delgado.

Un marcador de la lesión en la célula endotelial por radicales libres es la concentración de la enzima fosforilasa y de los nucleótidos purina, que se encuentran habitualmente en el citoplasma de la célula endotelial y de la célula de Kupffer. Se ha demostrado que su concentración aumenta con la isquemia y disminuye durante la reperfusión.

Lipoperoxidación. Otro papel importante de los radicales libres liberados durante la reperfusión es el de iniciar la lipoperoxidación de las membranas celulares, con la consiguiente liberación de sustancias que atraen, activan y promueven la adherencia de polimorfonucleares al endotelio microvascular, aumentando posteriormente la lesión⁷⁰. Los neutrófilos activados pueden producir a su vez radicales libres, aumentando en sangre los parámetros de lipoperoxidación como el malondialdehído⁷¹. En el hígado también se ha observado que la administración de anticuerpos frente a los receptores de los neutrófilos Mac-1 disminuye la lesión hepática, acompañada de una reducción del número de neutrófilos, así como de su estado oxidante, con inactivación de los mismos al reducirse la producción espontánea de anión superóxido. En estudios experimentales de isquemia fría se ha observado que, en ausencia de las células de Kupffer, se produce una disminución en la producción del anión superóxido y liberación del factor de necrosis tumoral (TNF), con una disminución en la acumulación de polimorfonucleares y menor grado de lesión celular.

Los *scavengers* o eliminadores de los radicales libres no sólo disminuyen la producción de hidrolipoperóxidos, sino también la producción de tromboxano A, no modificándose la producción de prostaciclina. Por tanto, posibilitan un posible papel de las prostaglandinas en la lesión por isquemia-reperfusión. También se ha demostrado que la administración de PGE1, en el líquido de preservación o en el inmediato postoperatorio, disminuye la producción del anión superóxido y mejora la preservación del injerto y la funcionalidad hepática.⁵³ Por otro lado, la administración de sustancias que aumentan la producción de las prostaglandinas puede disminuir la lesión por isquemia reperfusión, ya que aumentan los nucleótidos de alta energía.

Los radicales libres generan la peroxidación de metabolitos, con lo que el estudio de estos metabolitos y de sus derivados se considera una forma indirecta de valorar la función de los radicales libres. El estado antioxidante del organismo se modifica por

multitud de causas, entre ellas la lesión por isquemia-reperusión⁶⁰. Estos productos de la lipoperoxidación desempeñan un papel importante en la lesión oxidativa por generar ella misma reacciones radical libre. Algunos de sus productos de degradación son tóxicos por sí mismos (aldehídos) y generan un aumento de la reducción del sistema de desintoxicación glutatión dependiente y, por tanto, disminuyen las defensas celulares para desintoxicar otras sustancias. Se ha demostrado que la lipoperoxidación de la membrana celular generada por los radicales libres se produce en mayor grado en las células no parenquimatosas que en los hepatocitos.

El óxido nítrico

Un mediador que se ha considerado de suma importancia en la patogenia de la lesión por isquemia reperusión es el óxido nítrico (NO) o factor de relajación endotelial. Se forma a partir de la L-arginina mediante la acción de la enzima NO sintetasa, que es dependiente del NADPH, calcio y calmodulina, inhibiéndose por análogos de la arginina. El NO difunde al espacio muscular liso vascular adyacente, donde se une a la guanilato ciclasa y provoca la relajación del músculo liso. Tiene una vida media muy corta, de segundos, lo que hace que sean difíciles su estudio y determinación analítica¹². En el organismo humano se produce en las arterias y venas, contribuyendo a la modulación del flujo sanguíneo local. En el espacio intravascular inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, lo que le confiere propiedades útiles para su aplicación clínica⁷⁷. Disponemos actualmente de los valores normales plasmáticos para la población adulta. De la enzima óxido nítrico sintetasa se han determinado tres formas diferentes: una de ellas inducible y calcio dependiente, que se expresa en condiciones patológicas, y dos isoformas de la enzima constituyente, que son las encargadas de provocar sus efectos en condiciones fisiológicas. Su inhibición provoca un importante descenso de la microcirculación hepática, mientras que su estímulo induce un aumento del flujo microvascular. Su síntesis se regula por la concentración de glutatión, importante cofactor para gran número de sistemas enzimáticos, entre los que se encuentra la óxido nítrico sintetasa inducible.⁵⁴

Las acciones del óxido nítrico sobre el organismo pueden ser protectoras o deletéreas, según en qué sistema biológico u órgano estudiado nos encontremos. La acción relajante del óxido nítrico se prolonga por la administración de superóxido dismutasa, lo que demuestra que su acción está modulada por los radicales libres derivados del oxígeno; su acción es inhibida por los radicales superóxido e hidróxilo.

En el hígado se ha observado que puede ejercer tanto acciones prooxidantes como antioxidantes, siendo considerado por algunos autores como un parámetro de seguimiento de algunas enfermedades hepáticas⁸¹. En estudios *in vitro* actúa como antioxidante, evitando el efecto oxidativo mediado por el hierro. En la lesión por reperusión se ha observado que posee un efecto favorable sobre la microcirculación y disminuye la extensión de la necrosis hepática⁵⁵. Si se administra antes de la realización de la isquemia hepática, disminuye la lesión por isquemia-reperusión.

Antioxidantes

Los antioxidantes son agentes endógenos o exógenos que pueden prevenir la acción de los radicales libres derivados del oxígeno y, por tanto, disminuir la lesión mediada por estos radicales. Los antioxidantes pueden actuar bien eliminando directamente los radicales libres, en cuyo caso se les denomina scavengers, o bien bloqueando la generación de éstos o sus efectos deletéreos.

Existen diferentes clasificaciones de los antioxidantes en la bibliografía. Los fármacos con capacidad antioxidante se pueden dividir en cinco grupos fundamentales: scavengers o eliminadores de los radicales libres, inhibidores de la producción de radicales libres, inhibidores de los neutrófilos, inhibidores de la peroxidación y los condicionantes de la situación oxidativa y energética preisquémica⁵⁶

En la literatura científica se han descrito numerosas sustancias con efecto antioxidante y eficaces para la prevención de la lesión por isquemia-reperusión. Gran parte de las mismas han demostrado su efecto protector en diferentes estudios experimentales de isquemia-reperusión hepática. A continuación, vamos a analizar en profundidad los mecanismos de acción de diferentes fármacos que han sido reconocidos como antioxidantes bioquímicos y que en nuestro laboratorio hemos investigado su efecto fisiológico o protector sobre la función hepática.

Superóxido dismutasa (SOD)

Es el scavenger o eliminador de los radicales libres superóxido más conocido. De forma fisiológica, su acción, en el metabolismo hepático, es la de formar peróxido de hidrógeno a partir de la xantina y el anión superóxido.

Su administración de forma exógena tiene la limitación de su corta vida media, aunque se dispone de formas comercializadas que alcanzan una vida media de hasta 4-6 h.

La administración de SOD mejora la lesión por isquemia-reperfusión en diferentes modelos experimentales. Se ha descrito un aumento de la producción de bilis y disminución de transaminasas.⁵⁷ Esta mejoría es mayor cuando se administra previa a la isquemia, ya que disminuye el grado de necrosis anatomopatológica.

Durante la isquemia hepática disminuyen las concentraciones de SOD junto al incremento de las concentraciones de hipoxantina y xantina, mientras que en la postisquemia predomina el descenso de las concentraciones de ATP. Esto explica que la administración exógena de SOD antes de la isquemia mejore la funcionalidad hepática. Se ha demostrado que la administración de SOD también disminuye la formación de radicales libres durante la reperfusión y, por tanto, mejora la lesión por reperfusión. Por otro lado, en modelos de hepatectomía parcial en ratas, su administración disminuye la lipoperoxidación y favorece la regeneración hepática.

Alopurinol

Se trata de un inhibidor de la enzima xantina oxidasa, ampliamente usado en la clínica para el tratamiento de la hiperuricemia. Ejerce una acción inhibitoria de la producción de radicales libres al impedir el paso de hipoxantina a xantina y anión superóxido.

En el hígado se ha observado que, durante la isquemia-reperfusión, el alopurinol, además de su acción inhibitoria sobre los radicales libres, produce un aumento en la síntesis de proteínas sin alterar la concentración de los nucleótidos energéticos. Tampoco interfiere con los valores hepáticos de glutatión durante la reperfusión⁵⁸.

Se ha comprobado que el alopurinol disminuye en mayor grado los efectos de la isquemia caliente hepática cuando se administra antes de la isquemia, independientemente de la dosis o vía de administración utilizada, necesitándose al menos dos dosis en un período de 24 h para que pueda ejercer su acción inhibitoria sobre la xantina oxidasa.

Los estudios en modelos de isquemia caliente hepática demuestran que mejora la producción de ATP y de bilis, por medio de un efecto *scavenger* directo, o bien por una resíntesis del ATP, a partir de la hipoxantina acumulada durante la isquemia.

El efecto beneficioso del alopurinol en la isquemia-reperfusión hepática, mediado por los radicales libres, también ha quedado demostrado por técnicas de quimioluminiscencia.⁵⁹

Vitamina E

La vitamina E o tocoferol forma parte del grupo de las vitaminas liposolubles y se la considera la vitamina más antioxidante de las membranas celulares¹.

De las diferentes formas bioquímicas de los tocoferoles, el que presenta mayor número de grupos metilados en su estructura es el más activo y corresponde al alfatocopherol, del que existen siete isómeros. El d-alfatocopherol es el que presenta un 100% de actividad y es transportado en el plasma por las lipoproteínas de bajo peso molecular, alcanzando una concentración en tejido hepático humano de 13 μ g/g de peso en fresco.

Debido a la gran lipofilia de la vitamina E y, por tanto, a la imposibilidad de su administración intravenosa, se han desarrollado análogos de la misma, como el Trolox, con actividad hidrofílica, que pueden administrarse por vía intramuscular o intravenosa. La vitamina E es uno de los primeros compuestos que se utilizó experimentalmente para prevenir la lesión la isquemia-reperfusión hepática¹¹².

En estudios de isquemia caliente hepática se ha demostrado que produce un aumento de la resíntesis de ATP, una disminución en la producción de los lipoperóxidos y un aumento del glutatión reducido durante la reperfusión, aminorando de esta forma la lesión por isquemia-reperfusión.⁶⁰

Captopril

Los inhibidores de la enzima conversiva de la angiotensina (IECA) son fármacos ampliamente estudiados, y utilizados en la práctica clínica diaria. El captopril es un IECA dotado con un grupo sulfhidrilo en su estructura, habiéndose demostrado que aumenta la producción de óxido nítrico por parte de la célula endotelial en situación de estrés¹¹⁵. Además, aumenta las defensas antioxidantes en diferentes tejidos y órganos, como el corazón, la médula renal y el hígado.

El captopril es, de todos los IECA, el que presenta una mayor actividad antioxidante, siendo dosis dependiente¹¹⁹. Además, posee un efecto eliminador o *scavenger* de los radicales libres derivados del oxígeno, por la presencia en su estructura de un radical sulfhidrilo (SH).⁶¹

Los estudios experimentales sobre isquemia-reperfusión hepática han demostrado que el captopril aumenta la actividad de la superóxido dismutasa y de la glutatión peroxidasa hepática. Este aumento de la actividad enzimática podría deberse a un efecto directo sobre la síntesis de estas enzimas, o bien tratarse de un efecto secundario de la acción metabólica de los ECA. Por otra parte, la actividad superóxido

dismutasa humana está regulada por péptidos de bajo peso molecular, considerándose al captopril un análogo de estos.^{62, 63}

Durante la isquemia-reperfusión hepática, produce un aumento de los derivados del ácido araquidónico, la prostaglandina E y la endotelina 1, compuestos que actualmente se sabe que están implicados en la patogenia de la lesión por isquemia-reperfusión hepática. Por tanto, se aprecia que aparte del efecto sobre los radicales libres también tiene implicaciones en otros mecanismos patogénicos de la lesión por isquemia-reperfusión.

Propranolol

El propranolol es un fármaco con efecto bloqueador beta no selectivo, ampliamente utilizado en la práctica clínica diaria², que actúa estabilizando la membrana celular.

El posible efecto antioxidante de los bloqueadores beta ha sido considerado desde hace años, aunque son limitados los estudios sobre el mismo⁶⁴.

No existen trabajos sobre el posible efecto del propranolol sobre la isquemia-reperfusión hepática, pero se ha descrito la mejoría en la función cardiaca.

N-acetilcisteína (NAC)

La N-acetilcisteína es un derivado tiólico, fundamental para la síntesis de glutatión en numerosos tejidos. Se ha demostrado que en altas concentraciones protege a las células del daño oxidativo mediante dos mecanismos: *a)* por su efecto antioxidante directo neutralizando el H₂O₂, y *b)* aumentando las reservas citoplasmáticas de glutatión. También se ha sugerido que puede proteger al ácido nítrico de los procesos de oxidación. Se conoce el efecto protector del NAC en situaciones de fallo hepático fulminante, y se ha sugerido su efecto protector hepático en el modelo de isquemia-reperfusión. Por tanto, se ha postulado su posible uso clínico en cirugía hepática y durante el trasplante hepático, pero los resultados beneficiosos todavía no han podido ser demostrados.

En nuestro laboratorio de cirugía experimental hemos estudiado en profundidad el posible efecto fisiológico potencialmente beneficioso que sobre el hígado, sometido a una isquemia-reperfusión controlada, pueden tener estos scavengers. El efecto protector bioquímico está demostrado desde hace tiempo. Queda por demostrar, de cara a la aplicabilidad clínica, la mejoría en la función, ya que no siempre existe una correlación entre el efecto bioquímico y la mejoría funcional. Nuestros resultados apoyan que, a pesar de que todos estos *scavengers* tienen efectos bioquímicos, sólo

parte de ellos mejoran la microcirculación hepática lo suficiente para encontrar un claro efecto beneficioso fisiológico. De estos *scavengers*, sólo demostramos un efecto beneficioso sobre la microcirculación hepática durante la reperfusión, cuando se administró SOD o tocoferol. La función hepática sólo mejoró significativamente con la SOD. Estos resultados ponen a debate el efecto beneficioso funcional de estos *scavengers* y constituyen un ejemplo de la necesidad de estos estudios experimentales antes de plantear los ensayos clínicos.

MEMBRANAS CELULARES Y LIPOPEROXIDACIÓN

Una función celular normal comienza con la presencia de membranas celulares normales, las alteraciones en la estructura de la membrana pueden afectar el equilibrio hídrico y el flujo de iones y por tanto a todos los procesos celulares.^{10,65}

Las membranas celulares son estructuras complejas compuestas de lípidos, proteínas y carbohidratos. Estas pueden ser diferentes entre el interior y el exterior de la célula, tienen distintas composiciones (cociente proteína-lípido) esta diferencia es debida a la diversidad de papeles biológicos y funciones de las membranas.

Las membranas son estructuras cerradas semejantes a láminas asimétricas con una superficie interior y otra exterior. Estas estructuras laminares ensambladas en forma no covalente, son estables desde el punto de vista termodinámico y metabólicamente activas. Proteínas específicas están ancladas en las membranas donde realizan funciones específicas del organelo, célula o del organismo⁶⁶

Los lípidos principales en membranas de mamíferos son: fosfolípidos, glucoesfingolípidos y esteroides. De los fosfolípidos los dos grupos presentes en las membranas celulares son los fosfoglicéridos y las esfingomielinas, de estos los más comunes son los fosfoglicéridos. Los glucoesfingolípidos son lípidos que contienen azúcares tales como cerebrósidos y gangliósidos. Esteroides, el esteroide más común en las membranas celulares es el colesterol el cual existe casi en forma exclusiva en las membranas plasmáticas de los mamíferos pero también puede encontrarse en menor cantidad en las mitocondrias, aparato de golgi y membranas nucleares

Las membranas son anfipáticas, los lípidos principales de las membranas contienen tanto regiones hidrofílicas (soluble en agua) como hidrofóbicas (soluble en aceite), de

aquí que las membranas también lo sean. Los lípidos anfipáticos de la membrana tienen una cabeza polar y colas no polares.

Cada tipo de membrana presenta una composición de proteínas y lípidos característica, lo que refleja la diversidad de funciones

La especialización funcional de cada tipo de membrana se refleja en su composición lipídica única. El colesterol es notable en membranas plasmáticas pero apenas detectable en membranas mitocondriales, la cardiolipina es un componente mayoritario de la membrana mitocondrial interna pero no de la membrana plasmática, los esfingolípidos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina están presentes en la mayoría de membranas pero en proporciones variables.⁶⁷

Las membranas son estructuras asimétricas, una asimetría entre el interior y el exterior es producto de la localización externa de los carbohidratos unidos a las proteínas de la membrana, además enzimas específicas están localizadas de forma exclusiva en el interior o exterior de las membranas como sucede en las mitocondrias y plasmáticas. Hay también asimetría entre el interior y exterior de los fosfolípidos, los fosfolípidos que contienen colina (fosfatidilcolina y esfingomielina) se ubican principalmente en la capa molecular exterior, los aminofosfolípidos se localizan de preferencia en la capa interior por lo general el colesterol abunda mas en el exterior que en el interior

Las mitocondrias, organelos indispensables en la producción de energía celular, son organelos esféricos o alargados su distribución en la célula varia tendiendo a acumularse en las zonas del citoplasma donde la actividad metabólica es mas intensa. Algunas células pueden contener muchas mitocondrias, se calcula, por ejemplo que en una célula de hígado de ratón existen un promedio de 1000 a 2000 mitocondrias. Las mitocondrias están constituidas principalmente por proteínas y en un segundo lugar de lípidos, existen también una pequeña cantidad de DNA y RNA. Las mitocondrias muestran una ultra estructura característica. Están constituidas por dos membranas la externa es lisa mientras que la interna presenta invaginaciones que puede adoptar la forma de crestas o tubos.^{66,67}

Debido a la gran cantidad de lípidos que se encuentran en las membranas celulares hepáticas, la composición de estas contribuye de manera importante en la

fisiopatogenia de la lesión por Isquemia-Reperfusion hepática y la lipoperoxidación, como se describe a continuación:

En la isquemia-reperfusion se desarrollan una serie de fenómenos fisiopatológicos complejos en los que se implican todos los componentes celulares del parénquima hepático, así como del endotelio vascular. Durante la isquemia, la hipoxia y otras situaciones de déficit energéticos, algunas proteasas citosólicas se activan por el aumento del calcio intracelular y catalizan la conversión de xantina deshidrogenasa (XD) a xantina oxidasa (XO). La xantina oxidasa, utilizando la hipoxantina por un lado y por otro el oxígeno molecular, aportado en la reperfusion, cataliza la formación del radical superóxido. Los radicales libres formados, durante el período de reperfusion, atacan los enlaces insaturados de los ácidos grasos libres en la bicapa fosfolipídica de la membrana celular. Esta reacción, denominada lipoperoxidación, se propaga en cadena y provoca la fragmentación de la membrana celular y, con ello, severas alteraciones estructurales y funcionales de la membrana, finalizando en un daño celular irreversible. En esta reacción se generan aldehídos, que se utilizan como indicadores del grado de peroxidación.

Así pues, la isquemia-reperfusion va a generar una reacción de lipoperoxidación más o menos intensa, dependiendo del tiempo de isquemia, asociada a una disminución del flujo sanguíneo y oxigenación tisular. Como consecuencia de estos fenómenos, aparecerá una alteración en la función hepática. En este sentido, por tanto, es de gran importancia disponer de pruebas de funcionamiento hepático rápidas y sencillas que traduzcan lo que ocurre durante la reperfusion. Existen numerosas pruebas de funcionamiento hepático (transaminasas) pero son poco sensibles, lo que hace indispensable la utilización de indicadores químicos indirectos. Normalmente se determinan los productos de reacción de las ERO con los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares (lipoperoxidación) como el malondialdehído (MDA) y las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés).

El estrés oxidativo, lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el deterioro y muerte celular. Se puede medir este tipo de daño mediante métodos directos e indirectos. Entre los primeros tenemos la medición de la concentración de agentes oxidantes, que es muy difícil por su corta vida media y lo costoso que resultan los equipos, lo que hace imprescindible medirlos indirectamente mediante determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre

biomoléculas. Los métodos para medir peróxidos lipídicos son el patrón de oro, cuando se trata de probar el papel de los oxidantes en algún tipo de daño celular.

La peroxidación lipídica es un proceso complejo, en el cual los ácidos grasos no saturados en los fosfolípidos de las membranas celulares son atacados por radicales que provocan la **abstracción** de un hidrógeno, formándose hidroperóxidos que son de difícil medición por degradarse rápidamente. No obstante, la lipoperoxidación constituye el patrón de oro cuando se trata de probar la función de los radicales libres en algún tipo de **daño celular**, y existen varias formas de medirla:

- **Medición de compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico:** se basa en la reacción del tiobarbitúrico con el malondialdehído (MDA), producto este del desdoblamiento de los hidro-peróxidos, formándose así un color susceptible de ser medido directamente. Su análisis es usado por su buena practicabilidad y sencillez, pero le falta sensibilidad, por lo que se recomienda, para aumentarla, utilizar procedimientos fluorométricos o cromatográficos.
- **Medición de otros aldehídos procedentes también de la lipoperoxidación:** el 4 hidroxinonal, susceptible de ser medido por HPLC con detección ultravioleta.
- **Medición de hidrocarburos volátiles en el aire expirado:** principalmente etano y pentano, respectivamente derivados de los hidroperóxidos de los ácidos grasos insaturados de las series omega-3 y omega-6. No es un método invasivo, pero por lo complicado resulta muy molesto a los pacientes.
- **Medición de compuestos fluorescentes de la lipoperoxidación:** mide la lipofuscina, producto final de la destrucción oxidativa de los lípidos, pero sólo es útil para etapas tardías de la peroxidación.

Otro papel importante de los radicales libres liberados durante la reperusión es el de iniciar la lipoperoxidación de las membranas celulares, con la consiguiente liberación de sustancias que atraen, activan y promueven la adherencia de polimorfonucleares al endotelio microvascular, aumentando posteriormente la lesión. Los neutrófilos activados pueden producir a su vez radicales libres, aumentando en sangre los parámetros de lipoperoxidación como el malondialdehído. En el hígado también se ha observado que la administración de anticuerpos frente a los receptores de los neutrófilos Mac-1 disminuye la lesión hepática, acompañada de una reducción del número de neutrófilos, así como de su estado oxidante, con inactivación de los mismos al reducirse la producción espontánea de anión su peróxido.

En estudios experimentales de isquemia fría se ha observado que, en ausencia de las células de Kupffer, se produce una disminución en la producción del anión superóxido y liberación del factor de necrosis tumoral (TNF), con una disminución en la acumulación de polimorfonucleares y menor grado de lesión celular.

PROTECCIÓN DEL HÍGADO A LA LESIÓN POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

La búsqueda de técnicas para proteger a un órgano de las lesiones secundarias a la interrupción del aporte sanguíneo ha sido motivo de intensa investigación en distintas ramas de la medicina. En la actualidad, se sabe que el daño no es secundario únicamente al periodo de isquemia, sino también a las consecuencias de la reperfusión, y existen un gran número de situaciones clínicas en las que se presentan estos fenómenos en la práctica de la medicina. Las más representativas, y que continuamente perpetúan el interés de los investigadores en sus respectivas áreas, incluyen la enfermedad coronaria y los infartos del miocardio, la enfermedad vascular cerebral y las apoplejías, las tromboembolias periféricas y pulmonares, y principalmente, los órganos destinados para trasplante.⁶⁸ Con estos conceptos, se han ideado múltiples estrategias que buscan el mismo objetivo: disminuir el daño por IR y mejorar tanto la viabilidad del órgano en cuestión como la supervivencia del sujeto que sufre estas alteraciones, en un fenómeno conocido como "precondicionamiento". El preconditionamiento hepático (PH), se refiere al aumento de la resistencia del tejido hepático a la lesión por IR, y puede lograrse por distintos medios, entre los que sobresalen los agentes farmacológicos, la terapia génica, y a través de intervenciones quirúrgicas.¹⁰⁸

Agentes farmacológicos

Probablemente el rubro más estudiado, la administración exógena de sustancias con diferentes efectos puede interferir con algunos de los mecanismos implicados en la IR o potenciar los efectos de otros mecanismos que confieren cierta actividad protectora contra la IR. Para lograr una adecuada terapia farmacológica, es imprescindible el conocimiento de las múltiples vías y los distintos niveles a los que los agentes farmacológicos que pueden emplearse para producir un cambio significativo en la evolución del daño por IR. A continuación se exponen brevemente los principales mecanismos de acción de los mecanismos más reportados en la literatura mundial.

• Antioxidantes.

Como se mencionó antes (vide supra), la isquemia activa a las CK, y son estas células las responsables de la producción de la mayor parte de las ERO en la reperfusión,⁶⁹ seguidas por los leucocitos y otros macrófagos reclutados al sitio de lesión.⁴¹ Las citocinas proinflamatorias (como el FNT- α , IL-1) estimulan a su vez la producción de ERO, y la intensidad de estos fenómenos se incrementa con la reperfusión.⁷⁰ De todas las ERO, el radical hidroxilo (OH \cdot) es el más lesivo,¹⁰⁸ produciendo el desacoplamiento de ácidos nucleicos y el posterior desdoblamiento de las cadenas de ADN mitocondrial, volviéndolas inservibles para su transcripción.⁷¹ La hipótesis más convincente¹⁰⁸ sobre el mecanismo de lesión por las ERO es la peroxidación de los lípidos con la subsiguiente destrucción de las membranas celulares,⁷² incluyendo la membrana mitocondrial.⁷³ Así mismo, las ERO se han implicado en la inducción de la apoptosis, posiblemente por las alteraciones ya comentadas en la membrana mitocondrial^{120, 74} o por la activación de caspasas.⁷⁵ La utilización de agentes que inhiban la peroxidación de las membranas celulares, así como la disminución de la producción de las ERA y su liberación son los mecanismos por los cuales los antioxidantes confieren protección contra el daño por IR. En la tabla 1 se enumeran algunos de los agentes antioxidantes reportados con mayor frecuencia en la literatura mundial.

Tabla 1. Agentes empleados en la isquemia-reperfusión que interactúan con el estrés oxidativo.¹⁰⁸

Agente farmacológico	Mecanismo de acción	Autor
Albúmina	Antioxidante	Strubelt y colaboradores. ⁷⁶
Alopurinol	Rastreador; oxidativo	estrés Karwinski y colaboradores. ⁷⁷
Bucilamina	Antioxidante	Amersi y colaboradores. ⁷⁸
Ebselen	Peroxidación de lípidos	Ozaki y colaboradores. ⁷⁹
Melatonina	Estrés oxidativo	Sewerynek y colaboradores. ⁸⁰
Nicaravan	Estrés oxidativo	Yolota y colaboradores. ⁸¹
Picroliv	Antioxidante	Singh y colaboradores. ⁸²
Propil galeato	Antioxidante	Wu y colaboradores. ⁸³
Tocoferol	Peroxidación de lípidos	Giakoustidis y colaboradores. ⁸⁴
Trimetazidina	Rastreador de ERO*	Tsimoyiannis y colaboradores. ⁸⁵

Trolox	Rastreador del radical peroxil	Wu y colaboradores. ⁸⁶
--------	--------------------------------	-----------------------------------

* ERO: especies reactivas de oxígeno.

- Donadores de óxido nítrico y agonistas de adenosina.

La adenosina está íntimamente ligada a la producción de ON,^{97,87} y el ON en las concentraciones específicas previene el daño por IR en los hepatocitos y las CE.⁸⁸ Peralta y colaboradores han demostrado que la adenosina ejerce sus efectos protectores por la respuesta en la microcirculación al ON sintetizado de novo a partir de la inducción de la ONSi en el tejido isquémico. Ante estos hallazgos, se ha propuesto la utilización de agentes con actividad agonista del receptor A2 de adenosina, y la administración de precursores del ON. Algunos de estos ejemplos se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Agentes que interactúan con la adenosina y la producción de óxido nítrico en la isquemia-reperfusión.¹⁰⁸

Agente farmacológico	Mecanismo de acción	Autor
2-aminoetil-isotiourea	Inhibidor de la ONSi*	Wang y colaboradores. ⁸⁹
CGS-21680	Agonista del receptor A2 de adenosina	Arai y colaboradores. ⁹⁰ Nakayama y colaboradores. ⁹¹
FK409	Donador de ON [†]	Dhar y colaboradores. ⁹²
L-arginina	Donador de ON [†]	Cottart y colaboradores. ¹³⁶
NONOato	Donador de ON [†]	Peralta y colaboradores. ¹³⁵

* ONSi: Óxido nítrico sintasa inducible; [†] ON: Óxido nítrico.

- Pentoxifilina.

Empleada durante largo tiempo en el tratamiento de enfermedades en la circulación periférica, la pentoxifilina es una metilxantina derivada de la teobromina.¹⁰⁸ Entre sus efectos que pueden dirigirse a la modificación de la lesión por IR se encuentran la inhibición de la cAMP fosfodiesterasa, aumentando los niveles intracelulares de AMP cíclico,⁹³ y la reducción de la síntesis de FNT- α ,¹⁴¹ disminuyendo significativamente la lesión por IR y mejorando la supervivencia.¹⁰⁷ Otras acciones de la pentoxifilina que pueden participar como protectores de la IR incluyen la disminución en la agregación

plaquetaria y aumento en la flexibilidad de los eritrocitos disminuyendo la viscosidad de la sangre.^{108,94}

- Moléculas antiapoptóticas e inhibidores de las proteasas.

Como ya se ha comentado, la apoptosis es un mecanismo fundamental en el daño por IR, y los efectores de la cascada de la apoptosis son las proteasas llamadas caspasas. Dos isoformas son particularmente importantes: la caspasa 8 y la caspasa 3, participando respectivamente, en las etapas temprana y tardía de la cascada de la apoptosis,¹⁰⁸ y se ha documentado su expresión de manera significativa en la reperfusión. Se han identificado otras proteasas que también participan en la modulación de la apoptosis y la necrosis, como las calpainas, enzimas responsables de la lisis de ciertas proteínas estructurales y de membrana.⁹⁵ La administración de inhibidores de las caspasas y de las calpainas han disminuido significativamente la magnitud de la lesión en la IR, y en la tabla 3 se resumen algunos agentes farmacológicos dirigidos a la modulación de estas proteasas.

Tabla 3. Agentes que interactúan con proteasas y la apoptosis en la isquemia-reperfusión.¹⁰⁸

Agente farmacológico	Mecanismo de acción	Autor
Cbz-Leu-Leu-Tyr-CHN2	Inhibidor de calpainas	Kohli y colaboradores. ⁹⁶
Mesilato de Gabaexate	Inhibidor de proteasas	Kim y colaboradores. ⁹⁷
Z-Asp-cmk	Inhibidor de caspasas	Cursio y colaboradores. ⁹⁸
ZVAD-fmk	Inhibidor de caspasas	Kobayashi y colaboradores. ⁹⁹

- Prostaglandinas.

Las CK son prácticamente las únicas responsables de la liberación de PG durante la reperfusión.¹⁰⁰ Las PG reducen tanto la liberación de proteasas como la producción de ERO, interfieren con la adhesión de los leucocitos, inhiben la agregación plaquetaria y aumentan la perfusión hepática, con resultados evidentes en la citoprotección del hígado sometido a IR.^{101,102,103,104} Incluso se ha planteado el uso de las prostaglandinas en hígados trasplantados que progresan de manera no satisfactoria, mejorando la función hepática.¹⁰⁵ La tabla 4 muestra dos de los análogos de prostaglandinas empleados en la literatura con buenos resultados en la protección hepática a la IR.

Tabla 4. Análogos de prostaglandinas que interactúan con la isquemia-reperusión.¹⁰⁸

Agente farmacológico	Mecanismo de acción	Autor
Misoprostol	Análogo de PG* E1	Totsuka y colaboradores. ¹⁰⁶
OP-41483	Análogo de PG* I2	Totsuka y colaboradores. ¹²⁴ Abe y colaboradores. ¹⁰⁷

*PG: Prostaglandina

- Inhibidores de las metaloproteinasas.

Las metaloproteinasas (MP) secretadas por las CK y CE en la IR¹⁰⁸ participan en la degradación de componentes de la matriz extracelular.¹⁰⁸ Las MP participan directamente en cambios morfológicos durante la reperusión, por lo que la utilización de inhibidores de las MP, como el ácido lactobiónico presente en la solución de preservación de la Universidad de Wisconsin (UW), disminuye las alteraciones morfológicas secundarias a la IR, particularmente en los sinusoides hepáticos.¹⁰⁹

- Preservación en frío y soluciones preservadoras.

Desde 1988, Belzer y Southard asentaron las bases de la preservación en frío de los órganos destinados para trasplante, haciendo hincapié en los efectos del frío en la reducción de las demandas metabólicas del órgano en cuestión, permitiendo prolongar el tiempo de isquemia.¹¹⁰ La creación por estos autores de la solución preservadora de la UW, tiene sustancias dirigidas a contrarrestar las principales alteraciones provocadas por la hipotermia: ¹⁰⁸ el edema celular por inhibición de la bomba de Na⁺/K⁺ dependiente de ATP, acidosis láctica por el metabolismo anaeróbico,¹¹¹ alteraciones en la homeostasis del Ca⁺⁺,¹¹² y producción de ERO. Como ya mencionamos, parte de los resultados de la solución UW se deben a la inhibición de las MP por el ácido lactobiónico, y otra parte importante la constituye la capacidad de amortiguamiento de dicha solución. Sin embargo, muchos de los mecanismos protectores se desconocen,¹⁰⁸ siendo motivo de múltiples trabajos de investigación, y es de esperarse que en un futuro no muy lejano se presenten nuevas soluciones preservadoras que rebasen las ventajas de la solución de la UW.

Terapia génica.

Los múltiples avances en la medicina genómica la acercan cada vez mas a ser un pilar fundamental en el tratamiento de múltiples situaciones clínicas, dejando de ser un método experimental para pasar a ser una estrategia terapéutica. Las intervenciones

prácticas de la medicina genómica se logran al introducir genes específicos en una célula específica, utilizando virus o vectores determinados, controlando el sitio en donde actúan.

- Terapia antiapoptótica.

El oncogen Bcl-2 codifica para una serie de proteínas que regulan la apoptosis tanto de manera inhibitoria como de manera promotora.¹¹³ El aumento de la expresión de una de estas últimas, la proteína mitocondrial Bcl-2, confiere gran resistencia al daño por IR, con una importante reducción en la cantidad de células en apoptosis, mejorando la supervivencia ante periodos prolongados de isquemia.¹¹⁴ La utilización de adenovirus para modificar la expresión de esta línea de proteínas, así como de otras líneas que aún se encuentran en investigación, promete ofrecer un mecanismo seguro con dramáticos resultados en la disminución de las lesiones por IR.

- Terapia antioxidante.

La terapia génica se ha empleado de manera experimental para interrumpir las secuencias que dan lugar a la formación de ERO y a la activación del FN-κB. Zwacka y colaboradores¹¹⁵ lograron disminuir la lesión por IR al transferir los genes que codifican para la enzima SOD mitocondrial en ratones. Wheeler y colaboradores¹¹⁶ ampliaron este rubro al transferir genes para la forma mitocondrial y la forma citoplásmica de la SOD, también con buenos resultados. Coito y colaboradores lograron mejorar la supervivencia y disminuir la necrosis, edema e infiltración por macrófagos en hígados trasplantados en ratas, en las cuales se habían transferido genes que codifican para la expresión de la proteína de choque de calor 32 (hemo-oxigenasa 1, o Hsp32, por sus siglas en inglés). La Hsp32 se induce en condiciones como la hipoxia y la hipertermia,¹¹⁷ y se le atribuyen ciertas propiedades citoprotectoras en la IR.

Intervenciones quirúrgicas y acondicionamiento hepático.

Uno de los principales problemas asociados a la cirugía hepática es la pérdida de sangre en el periodo transoperatorio, con una clara relación entre la cantidad de sangre perdida y la morbilidad y mortalidad posoperatorias.¹¹⁸ Son múltiples los procedimientos quirúrgicos en los que nos vemos en la necesidad de interrumpir temporalmente el flujo de sangre al hígado, siendo los más representativos los casos de traumatismos severos, resección de lesiones benignas y malignas, hepatectomías parciales, reconstrucciones vasculares, y trasplantes. Pringle en 1908 observó que la

hemorragia en lesiones hepáticas podía controlarse temporalmente ocluyendo de manera digital al ligamento hepatoduodenal, que contiene a la arteria hepática (AH), la vena porta (VP) y el conducto biliar, interrumpiendo por completo el flujo sanguíneo al hígado. La oclusión de la triada portal, conocida como la maniobra de Pringle, continúa siendo empleada casi un siglo después con eficacia comprobada.¹¹⁹ En la actualidad, la oclusión de la triada portal puede hacerse por disección y oclusión aislada de la VP y la AH (con el riesgo de no ocluir las arterias colaterales presentes en algunos pacientes), con una pinza vascular sobre un drenaje de látex directamente sobre la triada portal, o utilizando un torniquete de tela (torniquete de Rummel). Esta última técnica tiene la ventaja de ser menos traumática sobre los elementos de la triada portal, además de que no obstaculiza el campo quirúrgico.

Sin importar la técnica empleada, la isquemia a la que se somete el hígado desde que el flujo se interrumpe provoca alteraciones que, según la duración del periodo isquémico y la presencia de condiciones patológicas preexistentes, pueden comprometer la viabilidad del órgano y por ende, poner en riesgo la vida del paciente. Sin embargo, los riesgos relacionados a la pérdida de sangre perpetúan la necesidad de controlar por completo la hemorragia hepática. Una hemorragia mortal puede presentarse al disecar las estructuras de la triada portal, al movilizar al hígado o al seccionar el parénquima hepático, y dicha hemorragia puede continuar una vez terminado el procedimiento. Cuando la cantidad de sangre perdida es significativa, la morbimortalidad aumenta por la hipotensión, los cambios en la distribución de los líquidos corporales, la isquemia y el estado de choque, aumentando la necesidad de requerir transfusiones sanguíneas para contrarrestar estas alteraciones. Aunado a estos riesgos, las transfusiones sanguíneas aumentan el riesgo de complicaciones postoperatorias¹²⁰ y ponen al paciente en un mayor riesgo de infecciones por los efectos inmunodepresivos de la sangre alogénica.^{121,122}

Con estos conceptos en mente, se han desarrollado múltiples técnicas que buscan disminuir la cantidad de sangre perdida durante el procedimiento quirúrgico y simultáneamente, contrarrestar los efectos de la IR en el tejido hepático. A continuación se enumeran las principales técnicas reportadas en la literatura y que aparentemente, tienen la mayor capacidad de citoprotección ante la IR mediante el fenómeno de PH.

- Oclusión vascular continua e intermitente.

Desde las observaciones de Pringle hace casi un siglo, la oclusión vascular continua de la triada portal (OVC) se ha demostrado eficaz para disminuir la hemorragia proveniente del hígado¹⁴⁵ disminuyendo el riesgo de transfusiones, pero acarreado consigo todas las alteraciones ya expuestas por efecto de la IR. Para contrarrestar estas alteraciones, se planteó la posibilidad de reducir el tiempo que el hígado es privado del aporte sanguíneo por medio de la oclusión vascular intermitente de la triada portal (OVI),¹²³ la cual consiste en periodos de isquemia de entre 15 y 30 minutos, seguidos de breves periodos de reperfusión de 5 a 10 minutos. A partir de esta teoría, estudios experimentales y clínicos han demostrado la efectividad de la OVI para disminuir las alteraciones de la IR al compararse con la OVC, traducándose en mejor función del hígado con menor elevación de transaminasas, y con mayor sobrevida, además de permitir tiempos de isquemia mas prolongados.¹⁵² Sin embargo, la OVI no esta exenta de complicaciones, ya que se asocia a un aumento en la cantidad de sangre perdida durante los periodos de reperfusión y al aumento en el tiempo operatorio.¹²⁴ Los mecanismos por los que la OVI reducen la intensidad de la lesión por IR aún no se identifican por completo, pero parece que la reducción de la apoptosis¹²⁵ es la vía principal para la protección a la IR, particularmente para procedimientos que requieran de tiempos muy prolongados de isquemia (mayores a 75 minutos). Muchas de los cambios observados en la citoprotección a la IR por la OVI son similares a los que se observa en el preconditionamiento isquémico, como se verá con detalle mas adelante.

- Sistemas de perfusión extracorpórea.

Las máquinas de perfusión extracorpórea (MPE) son complicados dispositivos que permiten la perfusión de un órgano destinado para trasplante mientras se encuentra sin flujo sanguíneo. Las MPE proveen al órgano los sustratos esenciales (glucosa, aminoácidos, nucleótidos, oxígeno) y desecha los metabolitos potencialmente tóxicos de manera constante.¹²⁶ Sus posibles aplicaciones clínicas en este rubro, son para la preservación del órgano procurado para trasplante, y para la resucitación del mismo antes del trasplante.¹²⁷ Sin embargo, aunque los resultados preliminares son alentadores, la utilidad práctica de estos dispositivos es muy limitada, en gran parte, a lo complicado de su funcionamiento, y al elevado costo de su utilización.¹⁰⁸

- Precondicionamiento hipertérmico.

La respuesta al estrés térmico está asociado a la síntesis de proteínas de choque de calor (Hsp), las cuales producen cierto grado de tolerancia a la IR en modelos experimentales de isquemia hepática.¹²⁸ Las Hsp previenen la activación de caspasas al fijarse al citocromo c, factor inductor de apoptosis (FIA) y al factor activador de proteasas apoptóticas (APAF)-1,¹²⁹ además de aumentar la resistencia estructural del citoesqueleto ante el estrés oxidativo. De estas proteínas, posiblemente las dos mas involucradas sean la Hsp32 (o hemo-oxigenasa 1) y la Hsp70.¹³⁰ La Hsp32 desdobra al grupo hemo en monóxido de carbono (CO) y en biliverdina, precursor de las bilirrubinas, también capaces de funcionar como antioxidantes.¹³¹ El aumento en la expresión de la Hsp32 participa con efectos antiinflamatorios y antiapoptóticos, posiblemente relacionados con el CO,^{108,132} aunque por mecanismos aún desconocidos. La Hsp70 se fija a ciertas proteínas que inhiben la actividad del FN- κ B, traduciéndose en una disminución en la expresión del FNT- α y otras proteínas proinflamatorias. Aunque no es práctico exponer a un paciente a la hipertermia para la inducción de estas proteínas, se plantean como alternativas que, de encontrarse una manera eficaz y segura de promover su expresión, podrán emplearse en modelos clínicos de IR.

- Precondicionamiento isquémico.

El precondicionamiento isquémico (PCI) se refiere a la breve interrupción del flujo sanguíneo a un órgano seguido por un breve periodo de reperfusión, tras el cual el órgano será sometido a un segundo periodo isquémico de mayor duración. En la práctica, esto se logra ocluyendo la triada portal con un torniquete o con una pinza vascular, interrumpiendo el flujo proveniente de la AH y la VP. Después de un periodo de tiempo determinado (10 a 15 minutos), el hígado se reperfunde durante un tiempo determinado (nuevamente, 10 a 15 minutos), tras el cual vuelve a ocluirse la triada portal para el procedimiento correspondiente. Se cree que el tiempo inicial de isquemia es lo suficientemente breve como para no lesionar el tejido, y lo suficientemente largo para inducir la producción de diferentes sistemas de protección contra un estímulo similar aunque de mayor intensidad.^{108,133}

Este fenómeno se identificó inicialmente en el miocardio, por Murry y colaboradores en 1986, y desde entonces se ha aplicado en modelos experimentales en tejido cerebral (1994), músculo esquelético (1995), intestino (1996), pulmón (1996), riñón (1997), médula espinal (1998), retina (1998), y en el hígado.

En los últimos años, el PCI ha sido motivo de un gran número de protocolos de investigación, siendo la gran mayoría de esos trabajos realizados en animales, particularmente, roedores. Los mecanismos por los que el PCI confiere protección al hígado ante la agresión causada por la IR se desconocen por completo, pero por la gran cantidad de mediadores y vías implicadas en la lesión por IR, se han propuesto una gran cantidad de factores que de una manera u otra, intervienen directamente con la citoprotección conferida por el PCI. Dentro de los mecanismos más estudiados se encuentran la preservación del nivel de ATP por activación de la quinasa dependiente de AMP,¹³⁴ la inducción de sistemas antioxidantes, el aumento moderado en los niveles de FNT- α , la liberación de ON y el aumento en los niveles de adenosina. A primera instancia, el PCI es fácilmente reproducible y potencialmente aplicable en múltiples situaciones clínicas, por lo que la búsqueda para identificar y comprender los mecanismos por los que el PCI protege al hígado de la IR es tarea cotidiana de múltiples investigadores a nivel mundial.

Tipos de Isquemia.

En la práctica cotidiana, el hígado se puede someter a tres tipos de isquemia: isquemia fría o hipotérmica, isquemia caliente o normotérmica, e isquemia por recalentamiento.¹³⁵ La isquemia fría ocurre casi exclusivamente en los órganos destinados para trasplante, en donde se aplica de manera dirigida para disminuir la actividad metabólica del órgano durante su procuración. La isquemia caliente en la cirugía hepática o en trasplantes ocurre cuando el flujo de sangre se ocluye por completo (maniobra de Pringle) o cuando la sangre aferente se canaliza de manera directa a las vías aferentes (exclusión vascular total). La isquemia por recalentamiento ocurre cuando se manipula el hígado procurado para trasplante, ya sea durante la preparación ex situ del hígado o cuando el órgano es reimplantado.⁷⁸ La importancia de distinguir entre los tres tipos de isquemia radica en que cada tipo de isquemia se caracteriza por alteraciones específicas y distinguibles. En la isquemia fría, las CE sufren alteraciones morfológicas que provocan su desprendimiento hacia la luz sinusoidal.^{136, 137} La disrupción de la pared endotelial induce la migración de leucocitos¹³⁸ y la agregación plaquetaria,⁶¹ y en conjunto con las CE libres en la luz capilar, altera de manera significativa a la microcirculación.¹³⁹ En la isquemia caliente, la pobre tolerancia de los hepatocitos se traduce en una rápida muerte de los mismos. Con la reperusión las CK se activan e inician la síntesis de una gran cantidad de sustancias proinflamatorias, ERO y FNT- α , y se acompañan de una rápida infiltración

por leucocitos y activación del sistema del complemento (vide supra). La isquemia por recalentamiento es una combinación de la isquemia fría y caliente, y los mecanismos de su participación en la IR son poco conocidos.¹⁰⁸

Mecanismos de lesión por isquemia-reperusión implicados con el preconditionamiento hepático.

Como se ha comentado extensamente, los principales mecanismos involucrados en la lesión por IR pueden resumirse en activación celular y liberación de citocinas, expresión de moléculas de adhesión, y alteraciones en la microcirculación, con la subsiguiente muerte celular.

- A) Activación celular y liberación de citocinas. En las primeras horas de la reperusión, las CK se activan¹⁴⁰ e inician la producción y liberación de ERO⁴¹ y citocinas proinflamatorias, particularmente el FNT- α y la IL-1.¹⁴¹ Estas citocinas a su vez favorecen la expresión de las ICAM por las CE,¹⁴² potenciando la segunda fase de la IR que involucra la activación, reclutamiento y adherencia de neutrófilos.¹⁴³
- B) Expresión de moléculas de adhesión. Dentro de las moléculas de adhesión implicadas en la IR, las mas estudiadas son el ICAM-1 de las CE, y la integrina β 2 Mac-1 de los neutrófilos,¹¹⁷ aunque no son las únicas. Las selectinas favorecen la interacción entre las CE y los neutrófilos,¹⁴⁴ pero para que se adhieran firmemente se requiere la interacción entre ICAM-1 y Mac-1.¹⁴⁵ Ya adheridos, los neutrófilos abandonan el espacio intravascular y migran al espacio intersticial, en donde participan en la intensidad de la lesión por la fagocitosis y por la producción y liberación de ERO y proteasas.¹⁴⁶
- C) Alteraciones en la microcirculación. La disfunción de la microcirculación se debe sobretodo a la disminución de la luz sinusoidal, lo que da lugar a la disminución del flujo sanguíneo favoreciendo la acumulación de leucocitos,⁵⁶ y comprometiendo la perfusión en zonas distales al sitio de obstrucción. Dos sustancias participan en el tono de la microcirculación, la ET-1 como vasoconstrictor,¹⁴⁷ y el ON como vasodilatador.¹⁴⁸ Con la IR, se rompe el equilibrio que existe entre ambas sustancias, sobretodo por el aumento en la ET-1.¹⁴⁹ Las células estelares también responden a las concentraciones de ET-1 y ON, participando así en el control del flujo en la microcirculación.
- D) Lesión y muerte celular. Las CE y los hepatocitos son los principales blancos de la lesión por IR. Uno de los mecanismos por los que las lesión por IR produce

muerte celular es a través de la apoptosis,^{107,150} y requiere de la expresión de las caspasas para llevarse a cabo. Sin embargo, la necrosis también parece jugar un papel importante, por lo que se ha planteado la imbricación de ambas vías, la necrosis y la apoptosis, para condicionar la muerte celular bajo el concepto de necroapoptosis.

Evidencia de que el preconditionamiento isquémico ocurre en el hígado.

- A) Isquemia caliente. Los primeros en demostrar la presencia del PCI en el hígado fueron Lloris-Carsi y colaboradores en 1993.¹⁵¹ Demostraron que la oclusión de la triada portal por 5 minutos, seguidos de 10 minutos de reperfusión mejoraba la sobrevida y función hepática tras 90 minutos de isquemia en ratas. Dichos hallazgos se repitieron de manera satisfactoria en modelos similares,^{152,153} modificando tanto los tiempos de isquemia total como los de PCI. Los hallazgos relativamente uniformes, se caracterizan por una disminución en el intensidad de la lesión hepatocelular, aumento en los niveles tisulares de ATP, disminución de la liberación del FNT- α e IL-6,¹⁵⁴ disminución en la interacción entre leucocitos y CE, disminución de la lesión a las CE,¹⁵⁵ aumento en el flujo sanguíneo global del hígado, aumento en la microcirculación, disminución en la apoptosis hepatocelular, conservación del metabolismo energético,¹⁵⁶ aumento en la oxigenación hepática intracelular, y protección a otros órganos.¹⁵⁷ En humanos, el trabajo de Clavien y colaboradores de las Universidades de Duke y de Zurich demuestra una disminución en la apoptosis de las CE en pacientes sometidos a hepatectomías parciales con PCI. En ese mismo estudio, sobresale además el beneficio del PCI en el hígado esteatótico,¹⁵⁴ lo cual se ha corroborado en otros estudios en animales.¹⁵⁸
- B) Isquemia fría. Los efectos del PCI no son exclusivos de la isquemia caliente. Estudios de Arai y colaboradores¹⁵⁹ demuestran que el PCI en hígados almacenados por 30 horas en solución UW reduce la activación de las CK y el daño a las CE. El PCI también participa al disminuir las alteraciones morfológicas de la CE que favorecen su desprendimiento, aparentemente al reducir la actividad de las MP. Un hallazgo interesante atribuible al PCI es el realizado por Arai y colaboradores de la Universidad de Carolina del Norte,¹⁶⁰ al que ellos llamaron "preconditionamiento heterólogo"(PCH). En dicho estudio, realizaron PCI únicamente en una de las dos mitades del hígado en ratas, para posteriormente ser procurados, almacenados y trasplantados. Los hallazgos relacionados al PCI en la porción del hígado preacondicionado se extrapolaron al hígado contralateral, traducándose en mayor

sobrevida del injerto. Los autores sugieren que el PCH es una nueva técnica para proteger al tejido hepático contra la IR, sin que la porción de tejido que sea el objetivo de la cirugía sea sometido a la isquemia.

Tipos de acondicionamiento isquémico.

El PCI se manifiesta en dos tipos de protección sobre el órgano en cuestión.¹⁶¹ El primer tipo se conoce como "acondicionamiento agudo" (PCa), y confiere sus cualidades protectoras desde los primeros minutos de la reperfusión, y se mantiene por 1 o 2 horas.¹⁶² Se cree que el PCa emplea las sustancias preexistentes sin que se sinteticen proteínas de novo. Existe una segunda ventana en la que los efectos del PCI inicial se manifiestan a las 24 horas de la reperfusión, estando presentes incluso hasta 3 días después. Se cree que este tipo de PCI, conocido como "acondicionamiento tardío" (PCt), se basa en la síntesis de nuevas proteínas por la alteración de la expresión de genes en el tejido involucrado. La liberación de estas sustancias en la circulación sistémica permite que otros órganos se beneficien de las mismas, como probablemente en el PCH, comentado arriba, así como en otros órganos a distancia,^{163, 164} en un término conocido como "acondicionamiento remoto" (PCR).

Mecanismos moleculares y celulares del acondicionamiento isquémico.

Debido al gran número de vías por las cuales la IR lesiona al tejido hepático (vide supra), para que el PCI atenúe de manera significativa la intensidad de la lesión por IR, este debe de contrarrestar por completo los mecanismos principales sobre los que se han implicado alteraciones causales. Las sustancias principales demostradas en el PCI con actividad protectora contra la IR son la adenosina y el ON, junto con algunas cinasas intracelulares. Estas vías principales activan a su vez otras sustancias, las cuales a su vez actúan sobre otras para multiplicar progresivamente la intensidad y el alcance del PCI.

- A) Células de Kupffer y citocinas. El PCI suprime la producción de ERO por las CK²¹⁰ e induce cierto grado de resistencia celular a las ERO.¹⁶⁵ También disminuye de manera significativa las concentraciones de FNT- α ,¹⁶⁶ y este efecto puede ser responsable hasta cierto punto del PCR.
- B) Expresión de las moléculas de adhesión. Posiblemente por la disminución del FNT- α , el PCI disminuye la expresión de la P-selectina a nivel hepático,¹⁶⁷ reduciendo la adhesión, migración y activación de los leucocitos disminuyendo el daño hepatocelular.

- C) Adenosina y óxido nítrico. La producción y liberación de adenosina inducida por el PCI activa al receptor de adenosina A₂,¹ aumentando la producción de ON y protegiendo a las CE.¹³⁵ La adenosina inhibe la adhesión de leucocitos, disminuye la expresión de moléculas de adhesión, inhibe la función de los leucocitos y plaquetas,¹⁶⁸ e inhibe la producción de ERO, además de ser un potente vasodilatador. El ON tiene un papel central en el PCa, actuando como iniciador,¹⁶⁹ y también en el PCT, fungiendo tanto como iniciador como mediador.¹⁷⁰ La ONS endotelial (ONSe) presente en las CE hepáticas es la responsable de la producción de ON en el PCa, mientras que en el PCT, la producción de ON necesita de la ONSi. El ON participa en la citoprotección del PCI por varios mecanismos, entre los que destacan la apertura de canales de K⁺ dependientes de ATP¹⁷¹ y el aumento en las concentraciones de cGMP, reduciendo el consumo de oxígeno y energía a nivel celular.¹⁷² También ejerce efectos antiinflamatorios, inhibiendo la activación de las células estelares,¹⁷³ la adhesión de los neutrófilos¹⁷⁴ y la agregación plaquetaria.¹⁷⁵ El ON activa cinasas intracelulares que aumentan la transcripción de ONSi,¹⁷⁶ y es un importante modulador de la apoptosis al inhibir la actividad de las caspasas,¹⁷⁷ prevenir la liberación del citocromo c, aumentar el cGMP y favorecer la expresión de Bcl-2 y Hsps.¹⁷⁸ Algunos de estos efectos citoprotectores del ON en el PCI pueden reproducirse con la administración de donadores de ON.
- D) Alteraciones en la microcirculación. La disminución de la producción de ERO y de la lesión mediada por neutrófilos por el PCI confiere cierto grado de protección estructural en la microcirculación, y en conjunto con la producción de ON por el PCI, ambas favorecen la perfusión hepática.¹⁷⁹
- E) Cinasas intracelulares. La activación de los receptores a adenosina y otras sustancias como la bradicinina, estimulan la activación de varias cinasas a nivel intracelular, como la proteín-cinasa C y la proteín-cinasa activada por el mitógeno p38,¹⁸⁰ así como la proteín-cinasa B¹⁸¹ (PKC, p38 MAPK y Akt/PKB, por sus siglas en inglés, respectivamente). Aunque se desconoce el verdadero mecanismo de acción de estas cinasas, se sabe que su inhibición farmacológica elimina los efectos del PCI, posiblemente por la participación de PKC y p38 MAPK en la homeostasis del Na⁺ intracelular.¹⁸² Los receptores A₂ de adenosina activa a la Akt/PKB en los hepatocitos, la cual tiene funciones antiapoptóticas,¹⁸³ y estimula a la ONSe para producir ON.¹⁸⁴
- F) Conservación de ATP. La conservación de la energía reportada en el PCI resulta por una disminución en el metabolismo celular. Este fenómeno provee los sustratos

JUSTIFICACIÓN:

La morbi-mortalidad asociada al trauma hepático, trasplante de hígado y las resecciones hepáticas mayores es en gran parte resultado de los fenómenos involucrados en el fenómeno de IR. Es así que el determinar la manera en la que el PCH modifica la intensidad de la lesión por IR a través de las pruebas de funcionamiento hepático y la cuantificación indirecta de la lipoperoxidación, resultaría en una herramienta útil para evaluar la respuesta del hígado al PCH, y valorar la aplicación del PCH del ámbito experimental al contexto clínico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Conocer las características bioquímicas del PCH en la modulación de la lesión por IR. Enfocados en la evaluación de los cambios en los niveles de los marcadores de lesión hepática (AST, ALT, DHL), así como de indicadores indirectos de lipoperoxidación como es el MDA, en las primeras 24 horas posteriores a la reperfusión que nos permitirá valorar su potencial beneficio aplicado a la cirugía hepática.

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el papel del PCH en la modulación de la lesión hepática en el fenómeno de I-R, al comparar la elevación de las enzimas hepáticas (AST, ALT y DHL) y a los indicadores indirectos de lipoperoxidación (MDA) en un modelo experimental de isquemia hepática total vs PCH.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Analizar los cambios que se generan en la IR sobre la AST, ALT y DHL en un modelo experimental de isquemia hepática total en las primeras 24 horas posteriores al evento isquémico.
2. Analizar los cambios que se generan por acción de las ERO en los lípidos de las membranas celulares mediante la determinación de MDA en un modelo experimental de isquemia hepática total en las primeras 24 horas posteriores al evento isquémico.

3. Analizar los cambios que se generan en la IR sobre la AST, ALT y DHL en un modelo experimental de PCH en las primeras 24 horas posteriores al evento isquémico.
4. Analizar los cambios que se generan por acción de las ERO en los lípidos de las membranas celulares mediante la determinación de MDA en un modelo experimental de PCH en las primeras 24 horas posteriores al evento isquémico.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Tipo de estudio: Experimental, comparativo, prospectivo, longitudinal.

Se utilizaron ratas Wistar machos entre 250 y 350 gramos de peso, distribuidas aleatoriamente en un grupo simulado o SHAM, y dos grupos problema, uno con isquemia hepática total, y otro con preconditionamiento hepático. El manejo de los animales de experimentación fue de acuerdo a los lineamientos internacionales del cuidado y estudio de pequeñas especies de laboratorio.

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina y xilacina intramuscular. Se realizó tricotomía abdominal anterior y posteriormente incisión media por planos hasta cavidad abdominal

Grupo SHAM:

Se realizó la incisión abdominal previa anestesia general y se tomaron las muestras hepáticas y séricas de la vena cava inferior con jeringa de insulina. Tras lo cual se irrigó la cavidad con 1 cc de solución de NaCl al 0.9% estéril, y se cerró la laparotomía en un solo plano con material sintético no absorbible, trasladándose a las ratas a una cuna térmica. Al cabo de unos minutos cada rata fue sometida con una dosis letal de pentobarbital.

- A) Grupo experimental: En la cavidad abdominal se identificó la triada portal y se colocó un clamp vascular sobre la misma por un lapso de 5 minutos para producir el período de isquemia total hepática, al concluir este tiempo se retira el clamp por 10 minutos, iniciando la fase de reperfusión y se irrigó la cavidad

con 1 cc de solución de NaCl al 0.9% estéril, y se cerró la laparotomía en un solo plano con material sintético no absorbible, trasladándose a una cuna térmica. Al cabo de pocos minutos, fueron sometidas a una nueva laparotomía aún bajo los efectos de la anestesia, en la cual se coloca nuevamente el clamp vascular al termino de los 10 minutos de reperfusión, para iniciar un período de isquemia total de 30 minutos, se cerró la cavidad siguiendo la misma secuencia de pasos.

Se tomaron las muestra hepáticas 0.5 gr. de tejido hepático del lóbulo mediano con bisturí convencional, para la determinación de MDA y muestra sanguínea como se realizó en el grupo SHAM, para el estudio de la enzima hepáticas.

Tabla 1. Tiempo de obtención de muestra en ratas con preconditionamiento.

Tiempo	Grupo Experimental
1, 2, 4, 12, 24 hr.	n=20 por grupo

Las muestras obtenidas de sangre y tejido hepático de cada rata fueron destinadas para la determinación de enzimas e indicadores de lipoperoxidación, respectivamente, como a continuación se enumera:

a) AST, ALT y DHL. Las muestras de sangre fueron centrifugadas inmediatamente posterior a su extracción a 10,000 rpm por un lapso de 10 minutos. El plasma sobrenadante fue extraído y congelado a -70°C. Una vez reunidas la totalidad de las muestras, el plasma fue descongelado a temperatura ambiente y procesado en el laboratorio utilizando un espectrofotómetro marca Siemens con reactivos específicos para AST, ALT y DHL (Bayer, México). Los resultados fueron reportados en UI/mL.

b) MDA. Las muestras de 0.5 g de tejido hepático fueron enfriadas inmediatamente posterior a su obtención con agua helada a 4°C, para posteriormente ser lavadas con suero fisiológico y homogenizado en un buffer de fosfatos. Para el patrón de la curva de calibración se empleó un análogo químico del MDA, el ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma Chemical. USA). La reacción de calor se desarrolló durante 45 minutos en baño maría a temperatura de ebullición. A continuación se añaden 4 mL

de N-butanol y piridina para extraer el complejo con el TBA y, tras agitar, centrifugar y lavar, se lee la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro a 532 nm. Los resultados se expresan en nM/mg de proteína.

Cabe señalar que se realizó un grupo simulado o SHAM (n=20) que fue sometido a la anestesia, laparotomía, irrigación, cierre de la cavidad, relaparotomía y obtención de muestras según las técnicas ya descritas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se compararon el grupo control contra el grupo experimental, analizando en cada grupo la elevación de las enzimas AST, ALT y DHL así como del MDA con promedios y error estándar. Además, en el grupo experimental, se compararon los valores de estas sustancias según el tiempo de obtención de la muestra. De acuerdo a los hallazgos, se utilizó la prueba χ^2 para establecer diferencias, considerando un valor de p menor a 0.5 como estadísticamente significativo.

RESULTADOS:

Tabla 1. Valores de AST, ALT, DHL y MDA obtenidos en el grupo de isquemia total a la 1, 2, 4, 12 y 24 horas

Grupo	AST	ALT	DHL	MDA
IRHT 1 hr	1866 (±416)	2041 (±254)	5198 (±673)	1.13 (±0.09)
IRHT 2 hr	2338 (±297)	3271 (±199)	6731 (±488)	1.36 (±0.11)
IRHT 4 hr	2241 (±316)	3681 (±323)	6208 (±366)	1.02 (±0.07)
IRHT 12 hr	1952 (±178)	2435 (±201)	4626 (±291)	0.91 (±0.05)
IRHT 24 hr	1679 (±163)	1998 (±191)	4001 (±215)	0.84 (±0.04)

(**IRHT**) ISQUEMIA REPERFUSION HEPATICA TOTAL, (**AST**) AMINOTRANSFERASA DE ASPARTATO UI/mL, (**ALT**) AMONITRANSFERASA DE ALANINA UI/mL, (**DHL**) DESHIDROGENASA LACTICA UI/mL, (**MDA**) MALONDEALDEHIDO mM/mg prot.

La elevación significativa de las enzimas AST, ALT y DHL. Muestra el grado de lesión hepática inducida por I-R.

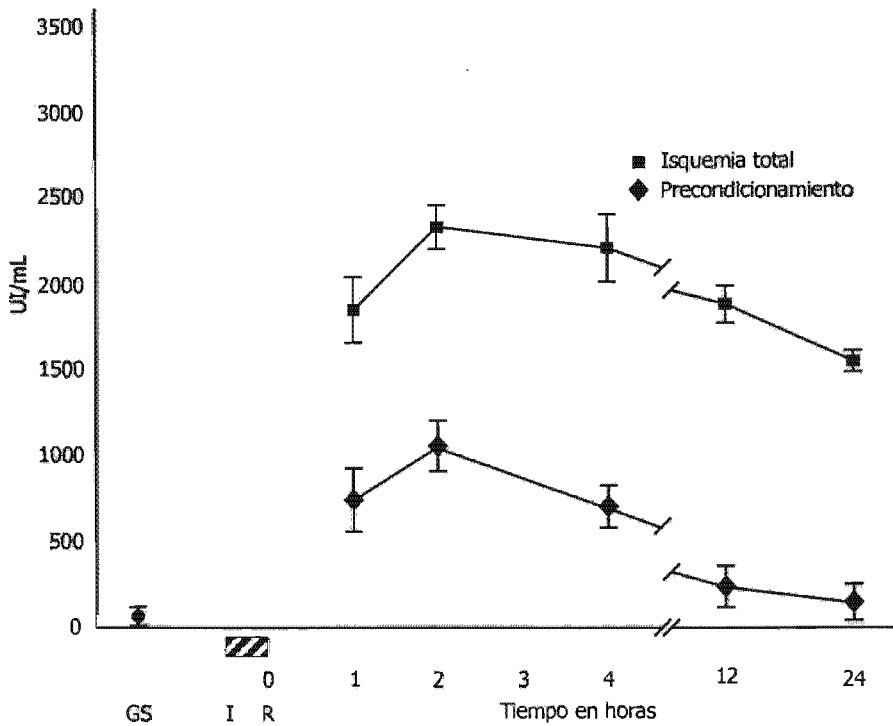
Tabla 2. Valores de AST, ALT, DHL y MDA obtenidos en el grupo experimental (PHC) a las 1, 2, 4, 12 y 24 horas.

Grupo	AST	ALT	DHL	MDA
PCH 1 hr	681 (±170)	866 (±150)	1466 (±333)	0.64 (±0.10)
PCH 2 hr	960 (±139)	1033 (±166)	2000 (±266)	0.72 (±0.07)
PCH 4 hr	619 (±108)	966 (±116)	1600 (±300)	0.64 (±0.04)
PCH 12 hr	185 (±108)	400 (±133)	733 (±233)	0.57 (±0.04)
PCH 24 hr	123 (±92)	233 (±83)	466 (±200)	0.52 (±0.03)

(**PCH**) PRECONDICIONAMIENTO HEPATICO, (**AST**) AMINOTRANSFERASA DE ASPARTATO UI/mL, (**ALT**) AMONITRANSFERASA DE ALANINA UI/mL, (**DHL**) DESHIDROGENASA LACTICA UI/mL, (**MDA**) MALONDEALDEHIDO mM/mg prot.

Los niveles séricos de AST, ALT, Y DHL son significativamente menores en contraste con los del grupo control. Fenómeno que podemos atribuir al efecto hepatoprotector del PCH.

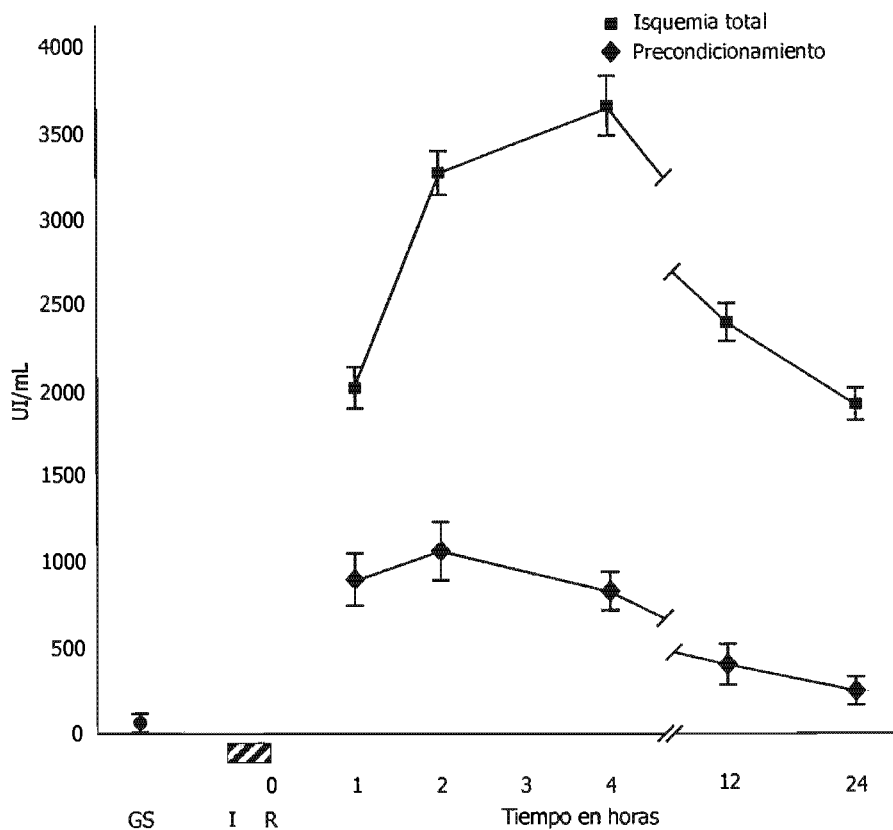
Gráfica 1.



Comparación de los valores de transaminasa de aspartato (AST) obtenidos del grupo control (isquemia total IT) vs los valores obtenidos en el grupo experimental (precondicionamiento hepático PCH) a las 1, 2, 4, 12, 24 hr.

GS grupo simulado SHAM, **I** Inicio de isquemia, **R** inicio reperusión minuto 0.

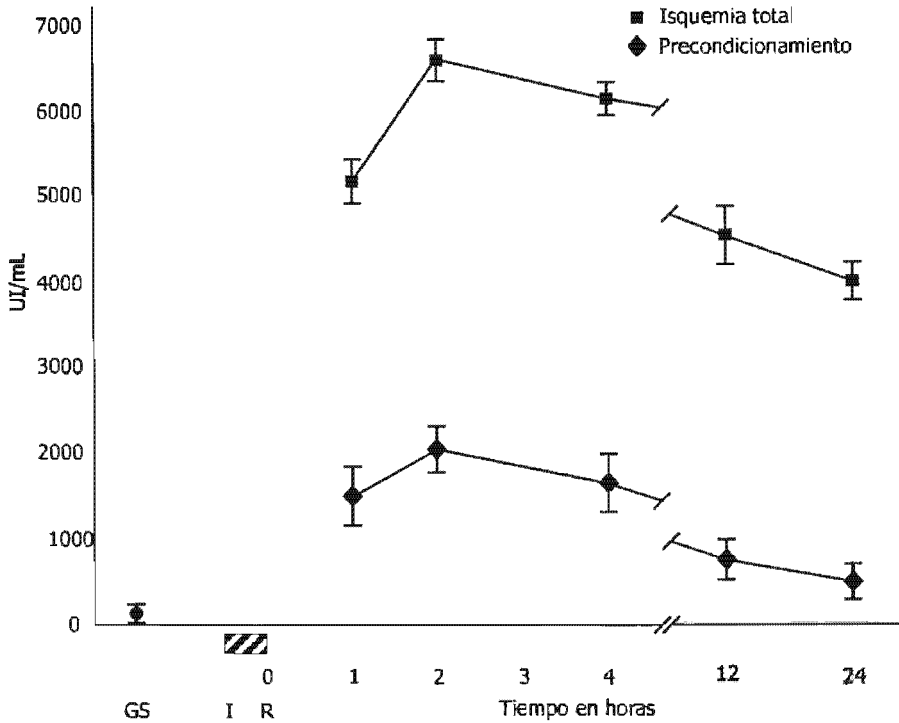
Gráfica 2.



Comparación los valores de transaminasa de alanina (ALT) obtenidos del grupo control vs los valores obtenidos en el grupo experimental a las 1, 2, 4, 12, 24 hr.

GS grupo simulado SHAM, **I** Inicio de isquemia, **R** inicio reperfusion minuto 0.

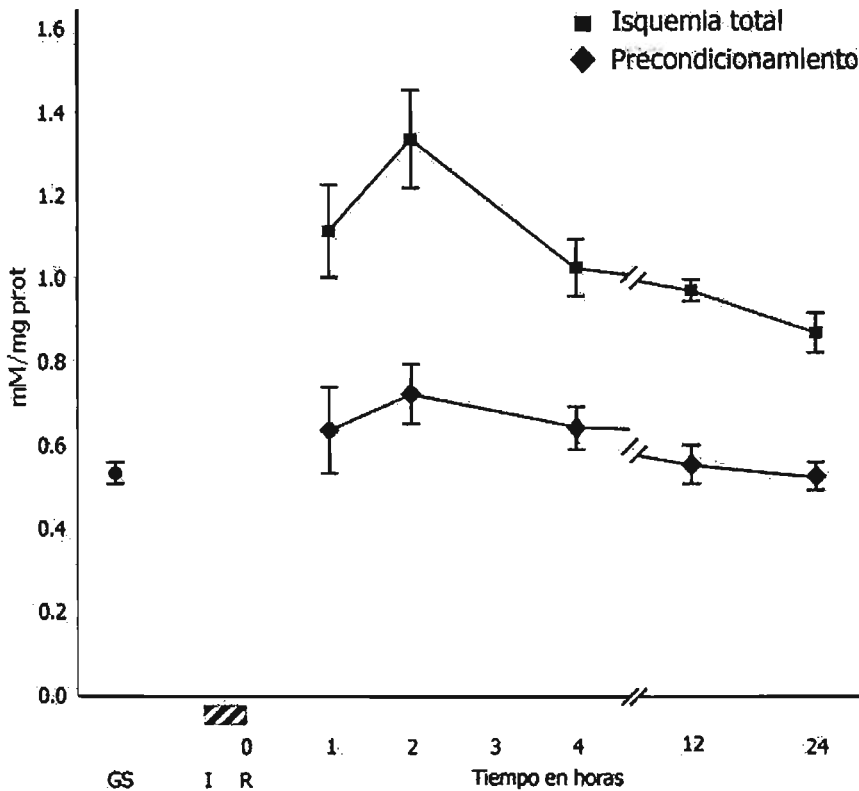
Gráfica 3.



Comparación de los valores de Deshidrogenada Láctica (DHL) obtenidos del grupo control vs los valores obtenidos en el grupo experimental a las 1, 2, 4, 12, 24 hr.

GS grupo simulado SHAM, **I** Inicio de isquemia, **R** inicio reperfusion minuto 0.

Gráfica 4.



Comparación de los valores de Malondialdehído (MDA) obtenidos del grupo control vs los valores obtenidos en el grupo experimental a las 1, 2, 4, 12, 24 hrs.

GS grupo simulado SHAM, **I** Inicio de isquemia, **R** inicio reperfusion minuto 0.

Al analizar las graficas de 1-3 se aprecia que existe una disminución estadísticamente significativa en los niveles séricos de AST, ALT y DHL en el grupo de PHC, en contraste con los del grupo control. Fenómeno que se atribuye al efecto benéfico de adaptación del hígado ante el preconditionamiento. (p=0.001)

En la grafica 4. (Malondialdehído) observamos también una disminución ES de los niveles de concentración en el grupo de PHC con respecto al grupo control.

DISCUSIÓN

EL preconditionamiento hepático isquémico ofrece al hígado mayor resistencia a los efectos deletéreos de lesión por isquemia reperusión al activar diferentes mecanismos de autoprotección endógenos. En nuestro trabajo los niveles séricos de AST, ALT y DHL, así como los niveles de MDA, resultaron significativamente menores en comparación con los de nuestro grupo control. Mismo, que se relaciona con el trabajo realizado por Zhang y Chen¹⁸⁶, donde se mostró que los niveles de ALT, AST y FNT- α , eran significativamente menores en los grupos de ratas que se sometieron a preconditionamiento hepático.

El PCH no solo disminuye la lesión por I-R sino que también aumenta la sobrevida de los hígados transplantados, como lo señala el trabajo realizado por Yin, Sankary y Chong¹⁸⁷. Estas observaciones sugieren la potencial aplicación del PCH isquémico en la cirugía hepática del día de mañana.

La formación de ERO durante el periodo isquémico y la liberación de estos durante la reperusión, produce además de otros efectos deletéreos daño a las membranas celulares mediante lipoperoxidación de los lípidos que forman su estructura, provocando así lesión celular que en algunos casos conlleva hasta la muerte de la célula.

La lesión oxidativa producida por ERO puede ser cuantificada mediante la medición de indicadores indirectos de lipoperoxidación como lo es el MDA. En nuestro trabajo se demostró que el preconditionamiento hepático PCH interfiere de manera significativa en la disminución de la lipoperoxidación, al demostrar que el grupo de ratas sometidas a PCH, las cifras de MDA fueron significativamente menores con respecto al grupo control. Con lo anterior corroboramos el efecto hepatoprotector del PCH al disminuir la lipoperoxidación tal como se señala en el trabajo de Peralta y Serafín¹⁸⁸

En nuestro estudio se demuestra que el realizar 5 min de isquemia total hepática seguidos de 10 minutos de reperusión previo el clampeo vascular final, fue suficiente para la inducción del preconditionamiento en la célula hepática. evidenciando este beneficio al comparar los resultados de enzimas hepáticas e indicadores indirectos de lipoperoxidación del grupo experimental con los del grupo control.

Cuando el hígado se somete a un periodo isquémico, las alteraciones inducidas por el estrés oxidativo, pueden no verse iniciadas dada la participación del factor nuclear κ B (FN- κ B), participa, hasta cierto punto, en la inducción de ONS, citocinas como el FNT- α ,

quimiocinas y moléculas de adhesión como el ICAM-1.^{189,190} El FN- κ B normalmente se encuentra en el citoplasma fijo a la proteína inhibidora I κ B.¹⁹¹ Durante el estrés oxidativo, la I κ B se degrada permitiendo la traslocación del FN- κ B al núcleo. Entre los diversos mecanismos descritos por los que se activa el FN- κ B resaltan sobretodo las ERO, particularmente el H₂O₂,¹⁹² y se ha documentado la disminución de su activación con la administración de antioxidantes.

Por lo anteriormente citado resultaría interesante para trabajos posteriores, cuantificar los niveles de factores nucleares de transcripción como lo es el FN κ B (factor nuclear κ B), para demostrar su participación en la inducción de respuesta inflamatoria secundaria al estrés oxidativo y así como para evidenciar su atenuación o disminución de su expresión al utilizar el PCH.

Todos estos resultados poseen gran importancia por su potencial aplicación en un futuro en el campo clínico. Sería de gran utilidad generar estudios clínicos controlados en pacientes que se someten a cirugía hepática (p. ej. trauma hepático, hepatectomías parciales, trasplante hepático, etc.) para poder identificar en el ser humano los efectos benéficos del PCH al atenuar la lesión por I-R.

CONCLUSIÓN

La lesión por isquemia y reperfusión es un factor importante en la morbimortalidad de los pacientes sometidos a cirugía hepática de diversos tipos, particularmente en el trasplante de hígado. La IR favorece la producción de ERO, las cuales, junto con muchos otros mecanismos, lesionan directamente a los hepatocitos y las células endoteliales, traducándose en alteraciones en la funcionalidad del órgano, comprometiendo así su viabilidad. Una manera de limitar el daño producido por las ERO y por lo tanto, mejorar el pronóstico del órgano en cuestión, es precisamente el disminuir la producción de esas ERO. En los últimos años, se han planteado mecanismos farmacológicos y genómicos que intentan reducir la expresión de esas ERO y con ello atenuar el daño a nivel hepático. Sin embargo, esas técnicas no están libres de efectos secundarios, y debido a la gran cantidad de elementos que participan en la IR, en muchas ocasiones son insuficientes. En los últimos años, el preconditionamiento isquémico ha sido objeto de múltiples estudios por los drásticos cambios en la respuesta a la IR en diversos modelos experimentales, incluyendo, a nivel hepático. Sin embargo, se desconoce la totalidad de los mecanismos que participan en la modulación de la IR por el PC. Con los resultados obtenidos en este trabajo, se demuestra que el PC disminuye de manera significativa la oxidación de los lípidos de membrana. Esto a su vez procura la integridad del parénquima hepático, reportándose una disminución ES en comparación con el grupo con IRH total.

Se puede entonces asentar que el preconditionamiento hepático es un mecanismo eficaz para disminuir la elevación de las enzimas hepáticas y los indicadores indirectos de lipoperoxidación en los modelos de isquemia y reperfusión, y que deben de realizarse estudios clínicos controlados para determinar su funcionalidad y aplicación clínica.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Bibliografía:

- 1 Fuentes S, De Lara G, Corpus Anatomía Humana General, Vol. II, primera edición, editorial trillas: 939-955
- 2 Gardner, Gray, O´Rahilly, Anatomía, 5 ED, editorial Interamericana Mc Graw Hill:458-468
- 3 Quiroz G, Tratado de Anatomía Humana, Tomo 3, XXII ED, Editorial Porrúa: 181-98
- 4 Junqueira, Carneiro, Histología básica, 3 ED, editorial Salvat: 345-58
- 5 Cormack, Histología de HAM, novena ED, editorial Harla: 641-59
- 6 O´Leary, The Physiologic Basis of Surgery, 3th ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 491-502
- 7 Guyton, A, Hall, J. Tratado de Fisiología médica, 9 ED, Editorial Mc Graw Hill Interamericana, 1999: 962-7
- 8 Finkel, T. and Holbrook, N.J. (2000) Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing. *Nature*. 408:239-247.
- 9 Gamaley, I.A. and Kluybin I.V. (1999) Roles of Reactive Oxygen Species: Signaling and Regulation of Cellular Functions. *Int. Review Cytology*. 188:203-255.
- 10 Gutteridge, J and Halliwell, B. (1999). Antioxidant Protection and Oxygen Radical Signaling: En: *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. D.L. Gilbert and C.A. Colton (eds) Kluwer Academic Press. Plenum Publishers New York. pp 189-218.
- 11 Stadtman, E.R. and Berlett, B.S. (1991) Fenton Chemistry. *Amino Acid Oxidation*. *J. Biol. Chem.* 266(26):17201-17211.
- 12 Dalton, T., Shertzer, H.G. and Puga, A. (1999). Regulation Of Gene Expression By Reactive Oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:67-101.
- 13 Spector, A. 1991. The Lens And Oxidative Stress. En: *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. H. Sies (ed). Academic Press Limited. pp 529-557.
- 14 Long, LH and Halliwell, B. (2000) Coffee Drinking Increases Levels Of Urinary Hydrogen Peroxide Detected In Healthy Human Volunteers. *Free Radic. Res.* 32(5):463-7.
- 15 Stocker, R., and Frei, B. (1991). Endogenous Antioxidant Defences in Human Blood Plasma. En: *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. H. Sies (ed). Academic Press Limited. pp 213-243.
- 16 Hansberg, W. (1999). La biología del dióxígeno en singulete. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2(2):47-55.

- 17 · Halliwell, B and Gutteridge, J. (1998) Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd Ed. Oxford Science Publications. Oxford. 936 pp.
- 18 Taylor, C.G., Nagy., L.E. and Bray, T.M. (1996). Nutritional and Hormonal Regulation of Glutathione Homeostasis. Current. Topics in Cellular Regulation. 34:189-208.
- 19 Halliwell, B., Clement, M.V. and Long, L.H. (2000). Hydrogen Peroxide In Human Body. FEBS Letters. 486:10-13.
- 20 Taylor, C.G., Nagy., L.E. and Bray, T.M. (1996). Nutritional and Hormonal Regulation of Glutathione Homeostasis. Current. Topics in Cellular Regulation. 34:189-208.
- 21 González-Flecha, E. and Dempley, B. (1999). Biochemistry of Redox Signaling. En: Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach. D.L. Gilbert and C.A. Colton (eds) Kluwer Academic Press. Plenum Publishers New York
- 22 Dixon, M. and Webb, E. C. 1958. Enzymes. Longmans
- 23 Cárdenas, Enrique y Davies, Kelvin. J. A. 2000. MITOCHONDRIAL FREE RADICAL GENERATION. OXIDATIVE STRESS AND AGING. Free Radical Biology & Medicine., Vol. 29: 220-230
- 24 Fleschin, S., Fleschin, Mihaela., Nita, Silvia., Pavel, Elena y Margearu, V. 2000. Free Radicals Mediated Protein Oxidation in Biochemistry. Roum Biotechnology Lett., Vol. 5, Nº 6: 479-495.
- 25 Franco, Alexa. A., Odom, Raanan. S., Rando, Thomas. A. 1999. REGULATION OF ANTIOXIDANT ENZYME GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS AND DURING DIFFEERENTATION OF MAOSU SKELETAL MUSCLE. Free Radical biology & Medicine., 27: 1122-1132.
- 26 Fridovich, Irwin. 1998. OXYGEN TOXICITY: A RADICAL EXPLANATION. The Journal of Experimental Biology., 201: 1203-1209.
- 27 Kurata, Masaaki., Suzuki, Masatoshi. 1994. Glutathione regeneration in calcium-loaded erythrocytes: a possible relationship among calcium accumulation, ATP increment and oxidative damage. Comp. Biochem. Physiol., 109B: 305-312
- 28 Sies, Helmut. 1999. GLUTATHIONE AND ITS ROLE IN CELLULAR FUNCIONS. Free Radical & Medicine., Vol, 27: 916-912.

- 29 Regoli, Francesco. 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarket of oxidative stress. *Aquatic Toxicology.*, 50: 351-361.
- 30 Free radicals and inflammation; F Berenbaum; *Annals of the Rheumatic Diseases*, London; May 2001; Vol. 60, Iss. 5; pg. 442, 1 pgs
- 31 Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals; Tilly Pain; *Circulation Research*, Dallas; Sep 15, 2000; Vol. 87, Iss. 6; pg. 460, 7 pgs
- 32 Antioxidants: What role do they play in physical activity and health?; Priscilla M Clarkson; *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda; Aug 2000; Vol. 72, Iss. 2S; pg. S637
- 33 Vitamin E supplementation improves cell-mediated immunity and oxidative stress of Asian men and women; Chung-Yung Jetty Lee; *The Journal of Nutrition*, Bethesda; Dec 2000; Vol. 130, Iss. 12; pg. 2932, 6 pgs
- 34 Modulation of oxidative stress by ascorbic acid and/or (alpha)-tocopherol; Ashwani Koul; *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*, Abingdon; Sep 2000; Vol. 10, Iss. 3; pg. 233, 6 pgs
- 35 Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation; Allison Bloodsworth; *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, Dallas; Jul 2000; Vol. 20, Iss. 7; pg. 1707, 9 pgs
- 36 The evolution of free radicals and oxidative stress; Joe M McCord; *The American Journal of Medicine*, New York; Jun 1, 2000; Vol. 108, Iss. 8; pg. 652
- ³⁷ Díaz J, Serrano E, Acosta F, Carbonell L Lipoperoxides kit evaluated for measuring lipoperoxides in biological samples: reference intervals for human plasma. *Clinical Biochemistry* 1998; 31: 277-279.
- ³⁸ Risby TH, Maley W, Scott RPW, Bulkley GB, Kazui M, Sehnert SS et al Evidence for free radical-mediated lipid peroxidation at reperfusion of human orthotopic liver transplants. *Surgery* 1994; 115: 94-101.
- ³⁹ Rodríguez AA, LaMorte WW, Hanrahan LM, Hopkins SR, O'Keane C, Cachecho R et al Liver viability after ischemia-reperfusion. *Arch Surg* 1991; 126: 767-772.
- ⁴⁰ Pretto JR Reperfusion injury of the liver. *Transpl Proc* 1991; 23: 1912-1914.
21. Kerrigan CL, Stotland MA Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery* 1993; 14: 165-175.
-

- ⁴¹ Clavien PA, Harvey PRC, Sanabria JR, Cywes R, Lavy GA, Strasberg SM Lymphocyte adherence in the reperfused rat liver: mechanisms and effects. *Hepatology* 1993; 17: 131-142.
- ⁴² Homer-Vanniasinkam S, Crinion JN, Gough MJ Post-ischæmic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14: 195-203.
- ⁴³ De-Broin E, Urata K, Giroux L, Lepage R, Huet P-M Effect of calcium antagonists on rat liver during extended cold preservation-reperfusion. *Transplantation* 1997; 63: 1547-1554.
- ⁴⁴ Goto M, Takei Y, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Masuda E et al Endothelin-1 is involved in the pathogenesis of ischemia/reperfusion liver injury by hepatic microcirculatory disturbances. *Hepatology* 1994; 19: 675-681.
- ⁴⁵ Jutila MA, Berg EL, Kishimoto TK, Picker LJ, Bargatzke RF, Bishop DK et al Inflammation-induced endothelial cell adhesion to lymphocytes, neutrophils and monocytes. *Transplantation* 1989; 48: 727-731.
- ⁴⁶ Adams DH, Wang LF, Burnett D, Stockley RA, Neuberger JM Neutrophil activation an important cause of tissue damage during liver allograft rejection? *Transplantation* 1990; 50: 86-91.
- ⁴⁷ Kirschner RE, Fantini GA Role of iron and oxygen-derived free radicals in ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Surg* 1994; 179: 103-117
- ⁴⁸ Dabbagh AJ, Mannion T, Lynch SM, Frei B The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status in vivo. *Biochem J* 1994; 300: 799-803.
- ⁴⁹ Freeman BA, Crapo JD Biology of disease. *Laboratory Investigation* 1992; 47: 412-420.
- ⁵⁰ McKelvey TG, Höllwarth ME, Granger DN, Engerson TD, Landler U, Jones HP Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Gastrointest Liver Physiol* 1988; 17: G753-G760.
- ⁵¹ Shibuya H, Ohkohchi N, Seya K, Satomi S Kupffer cells generate superoxide anions and modulate lipid peroxidation and mitochondrial proton ATP-ASE activity in the perfused rat liver cold preservation. *Transpl Proc* 1997; 29: 1328-1330.
- ⁵² Chávez-Cartaya R, Jamieson NV, Ramírez P, Marín J, Pino-Chávez G Free radical scavengers to prevent reperfusion injury following experimental warm liver ischaemia. Is there a real physiological benefit? *Transpl Int* 1999; 12: 213-221.
- ⁵³ Olthoff KM, Wasef E, Seu P, Imagawa DK, Freischlag JA, Hart J et al PGE1 reduces injury in hepatic allografts following preservation. *J Surg Res* 1991; 50: 595-601.
-

- ⁵⁴ . Harbrecht BG, Di Silvio M, Chough V, Kim Y-M, Simmons RL, Billiar TR Glutathione regulates nitric oxide synthase in cultured hepatocytes. *Surgery* 1997; 225: 76-87.
- ⁵⁵ Pannen BHJ, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998; 27: 755-764.
- ⁵⁶ Grace PA Ischaemia-reperfusion injury. *J Surg* 1994; 81: 637-647.
89. Caraceni P, Gasbarrini A, Van Thiel DH, Borle AB Oxygen free radical formation by rat hepatocytes during postanoxic reoxygenation: scavenging effect of albumin. *Gastrointest Liver Physiol* 1994; 24: G451-G458.
- ⁵⁷ Ontell SJ, Makowka L, Trager J, Mazzaferro V, Ove P, Starzl TE Pharmacologic modulation of experimental posts ischemic hepatic function. *Ann Surg* 1989; 209: 200-210.
- ⁵⁸ Karwinski W, Ulvik R, Farstad M, Svardal A, Berge R, Soreide O Effect of allopurinol on the concentration of endogenous glutathione in hepatocytes after an hour of normothermic liver ischemia. *Eur J Surg* 1993; 159: 355-359.
- ⁵⁹ Cohen PJ Allopurinol administered prior to hepatic ischaemia in the rat prevents chemiluminescence following restoration of circulation. *Can J Anaesth* 1992; 39: 1090-1093.
- ⁶⁰ Matsumoto F, Sakai H, Yamaguchi M, Nakano H, Matsumiya A, Kumada K et al Allopurinol reduces hepatic ischemia-reperfusion injury exacerbated by inhalation of high-concentration oxygen in rats. *Eur Surg Res* 1997; 29: 429-437.
- ⁶¹ . Bagchi D, Prasad R, Das DK Direct scavenging of free radicals by captopril an angiotensin converting enzyme inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158: 52-57.
- ⁶² . De-Cavanagh EM, Inerra F, Ferder L, Romano L, Ercole L, Fraga CG Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities are increased by enalapril and captopril in mouse liver. *FEBS Lett* 1995; 361: 22-24.
- ⁶³ . Kendall MJ Clinical relevance of pharmacokinetic differences between beta blockers. *Am J Cardiol* 1997; 80: 15J-19J
- ⁶⁴ López BL, Christopher TA, Yue TL, Ruffolo R, Feuerstein GZ, Ma XL Carvedilol a new beta-adrenoreceptor bloker antihypertensive drug protects against free-radical-induced endothelial dysfunction. *Pharmacology*
- ⁶⁵ Isselbacher, Braunwald, Wilson, et al, Harrison´s principles of internal medicine, 14 ed, Mc Graw Hill: 1444- 7

-
- ⁶⁶ Murria, Granner, Mayes, et al, Bioquímica de Harper, 13 ED, Editorial Manual Moderno: cap 43
- ⁶⁷ Nelson, Cox, Lehninger, Principios de Bioquímica, 3 ED, ediciones Omega, 2001, cap 11
- ⁶⁸ Bulkley GB. Preconditioning for protection from ischemic injury: discriminating cause from effect from epiphenomenon. *Ann Surg* 2000;232:163-5.
- ⁶⁹ Jaeschke H. Mechanism of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatol* 1998;21:402-408.
- ⁷⁰ Jaeschke H, Mitchell J. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species after hypoxic damage in isolated perfused rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;160:140-7.
- ⁷¹ Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, et al. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochem Biophys Acta* 1995;1271:67-74.
- ⁷² Omar R, Nomitos I, Piccorelli G, et al. Prevention of postischemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. *Gut* 1989;30:510-4.
- ⁷³ Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;47:412-26.
- ⁷⁴ Lemasters J, Nieminen A, Qian T, et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochem Biophys Acta* 1998;1366:177-196.
- ⁷⁵ Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
- ⁷⁶ Strubelt O, Younes M, Li Y. Protection by albumin against ischemia- and hypoxia induced hepatic injury. *Pharmacol Toxicol* 1994;75:280-4.
- ⁷⁷ Karwinski W, Soreide O. Allopurinol improves scavenging ability of the liver after ischemia/reperfusion injury. *Liver* 1997;17:139-43.
- ⁷⁸ Amersi F, Nelson SK, Shen XD, et al. Bucillamine, a thiol antioxidant, prevents transplantation-associated reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8915-20.
- ⁷⁹ Ozaki M, Nakamura M, Teraoka Sm et al. Ebselen, a novel anti-oxidant compound, protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury. *Transpl Intl* 1997;19:96-102.
- ⁸⁰ Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, et al. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatogastroenterology* 1996;43:898-905.
-

- 81 Yolota R, Fukai M, Shimamura T, et al. A novel hydroxyl radical scavenger, nicaraven, protects the liver from warm ischemia and reperfusion injury. *Surgery* 2000;127:661-9.
- 82 Singh AK, Mani H, Seth P, et al. Picroliv preconditioning protects the rat liver against ischemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2000;395:229-39.
- 83 Wu TW, Fung KP, Zeng LH, et al. Propyl gallate as a hepatoprotector in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 1994;48:419-22.
- 84 Giakoustidis D, Papageorgiou G, Illiadis S, et al. Inramuscular administration of very high dose of alpha-tocopherol protects liver from severe ischemia/reperfusion injury. *World J Surg* 2002;26:872-7.
- 85 Tsimoyiannis EC, Moutesidou KJ, Moschos CM, et al. Trimetazidine for prevention of hepatic injury induced by ischaemia and reperfusion in rats. *Eur J Surg* 1993;159:89-93.
- 86 Wu TW, Hashimoto N, Au JX, et al. Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. *Hepatology* 1991;13:575-80.
- 87 Peralta C, Hotter G, Closa D, et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 1999;29:126-32.
- 88 Cottart C, Do L, Blanc M, et al. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999;29:809-13.
- 89 Wang Y, Lawson JA, Jaeschke H. Differential effect of 2-aminoethyl-isothiourea, an inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, on microvascular blood flow and organ injury in models of hepatic ischemia-reperfusion and endotoxemia. *Shock* 1998;10:20-25.
- 90 Arai M, Thurman R, Lemasters J. Contribution of adenosine A(2) receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury in rat livers. *Hepatology* 2000;32:297-302.
- 91 Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M, et al. Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptors supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery* 1999;126:945-54.
- 92 Dhar DK, Yamanoi A, Ohmori H, et al. Modulation of endothelin and nitric oxide: a rational approach to improve canine hepatic microcirculation. *Hepatology*:1998;28:782-8.

- 93 Sinha B, Semmler J, Eisenhut T, et al. Enhanced tumor necrosis factor suppression and cyclic adenosine monophosphate accumulation by combination of phosphodiesterase inhibitors and prostanoids. *Eur J Immunol* 1995;25:147-53.
- 94 Ward A, Clissold S. Pentoxifylline: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* 1987;34:50-97.
- 95 Croall D, DeMartino G. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 1991;71:813.
- 96 Kohli V, Madden JF, Bentley RC, et al. Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 1999;67:1099-105.
- 97 Kim YI, Hwang YJ, Song KE, et al. Hepatocyte protection by a protease inhibitor against ischemia/reperfusion injury of human liver. *J Am Coll Surg* 2002;195:41-50.
- 98 Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, et al. Caspase inhibition protects from liver injury following ischemia and reperfusion in rats. *Transpl Int* 2000;13(suppl 1):S568-72.
- 99 Kobayashi A, Imamura H, Isobe M, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) and intercellular adhesion molecule-1 in ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Am J Physiol* 2001;281:G577-85.
- 100 Decaer K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990;192:245-61.
- 101 Quiroga J, Prieto J. Liver cytoprotection by prostaglandins. *Pharmacol Ther* 1993;58:67.
- 102 Fantone J, Kinnes D. Prostaglandin E1 and prostaglandin I2 modulation of superoxide production by human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;113:506.
- 103 Granger D, Kvietys P, Perry M. Leukocyte endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 1993;71:67.
- 104 Araki H, Lefer A. Cytoprotective actions of prostacyclin during hypoxia in the isolated perfused cat liver. *Am J Physiol* 1980;238:176.
- 105 Grieg P, Wolf G, Abecassis M. Prostaglandin E1 for primary nonfunction following liver transplantation. *Transplant Proc* 1989;21:3360-1.
- 106 Totsuka E, Todo S, Zhu Y. Attenuation of ischemic liver injury by prostaglandin E1 analogue, misoprostol, and prostaglandin I2 analogue, OP-41483. *J Am Coll Surg* 1998;187:276-86.

-
- 107 Abe T, Lynch S, Balderson G, et al. The effects of prostacyclin analog OP-41483 on normothermic liver ischemia and reperfusion injury in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1993;48:417-22.
- 108 Arthur M, Friedman S, Roll F, et al. Lipocytes from normal rat liver release a neutral metalloproteinase that degrades basement membrane (type 4) collagen. *J Clin Invest* 1989;84:1076-85.
- 109 Upadhyya A, Harvey R, Howard T, et al. Evidence of a role for matrix metalloproteinase in cold preservation injury of the liver in humans and in the rat. *Hepatology* 1997;26:922-8.
- 110 Belzer F, Southard J. Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988;45:673.
- 111 Woods H, Krebs H. Lactate production in the perfused rat liver. *Biochem J* 1971;125:129.
- 112 Marsh D, Belzer F, Southard J: Hypothermic preservation of hepatocytes. II. Importance of Ca and amino acids. *Cryobiology* 1990;27:1-8.
- 113 Chao D, Korsmeyer S. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998;16:395-419.
- 114 Selzner M, Rudiger HA, Selzner N, et al. Bcl-2 overexpression in transgenic mice protects against ischemia & reperfusion injury of the liver. *J Hepatol* 2002;36:218-25.
- 115 Zwacka RM, Zhou W, Zhang Y, et al. Redox gene therapy for ischemia/reperfusion injury of the liver reduces AP1 and NF-kappaB activation. *Nat Med* 1998;4:698-704.
- 116 Wheeler M, Katuna M, Smutney O, et al. Comparison of the effect of adenoviral delivery of three superoxide dismutase genes against hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hum Gene Ther* 2001;12:2167-77.
- 117 Raju VS, Maines MD. Coordinated expression and mechanism of induction of HSP32 (heme oxygenase-1) mRNA by hyperthermia in rat organs. *Biochem Biophys Acta* 1994;1217:273-80.
- 118 Nagorney DM, van Heerden JA, Ilstrup DM, et al. Primary hepatic malignancy: surgical management and determinants of survival. *Surgery* 1989;106:740-9.
- 119 Dixon E, Vollmer Jr. CM, Bathe OF, et al. Vascular occlusion to decrease blood loss during hepatic resection. *Am J Surg* 2005;190:75-86.
- 120 Nielsen HJ. Detrimental effects of perioperative blood transfusion. *Br J Surg* 1995;82:582-7.
-

- 121 Ikuta S, Miki C, Hatada T, et al. Allogenic blood transfusion is an independent risk factor for infective complications after less invasive gastrointestinal surgery. *Am J Surg* 2003;185:188-93.
- 122 Taylor RW, Manganaro L, O'Brien J, et al. Impact of allogenic packed red cell blood transfusion on nosocomial infection rates in the critically ill patient. *Crit Care Med* 2002;30:2249-54.
- 123 Makuuchi M, Mori T, Gunven P, et al. Safety of hemihepatic vascular occlusion during resection of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1987;164:155-8.
- 124 Clavien PA, Selzner M, Rüdiger HA, et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003;238:843-50.
- 125 Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, et al. Comparison of ischemic preconditioning, intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002;235:400-7.
- 126 Schon M, Kollmar O, Wolf S, et al. Liver transplantation after organ preservation with normothermic extracorporeal perfusion. *Ann Surg* 2001;233:114-23.
- 127 Butler AJ, Rees MA, Wright DGD, et al. Successful extracorporeal porcine liver perfusion for 72 hr. *Transplantation* 2002;73:1212-8.
- 128 Saad S, Kanai M, Awane M. Protective effect of heat shock pretreatment with heat shock protein induction before hepatic warm ischemia injury caused by Pringle's maneuver. *Surgery* 1995;118:510.
- 129 Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, et al. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:433-42.
- 130 Kume M, Yamamoto Y, Saad S, et al. Ischemic preconditioning of the liver in rats. Implication of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 1996;128:251-8.
- 131 Katori M, Busuttill RW, Kupiec.Weglinski JW. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* 2002;74:905-12.
- 132 Amersi F, Shen XD, Anselmo D, et al. Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway. *Hepatology* 2002;35:815-23.
- 133 Peralta C, Hotter G, Closa D, et al. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997;25:934-7.

- 134 Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology* 2003;125:1480-91.
- 135 Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992;53:957-78.
- 136 McKeown C, Edwards C, Phillips M, et al. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 1988;46:178-91.
- 137 Holloway C, Harwey P, Strasberg S. Viability of sinusoidal cell lining cells in cold-preserved rat liver allografts. *Transplantation* 1990;49:225-9.
- 138 Clavien PA, Harvey PRC, Sanabria JR, et al. Lymphocyte adherence in the reperfused rat liver allograft. Mechanisms and effects. *Hepatology* 1993;17:131-42.
- 139 Marzi I, Knee J, Menger M, et al. Hepatic microcirculatory disturbances due to portal vein clamping in the orthotopic rat liver transplantation model. *Transplantation* 1991;52:432-6.
- 140 Wanner G, Ertel W, Muller P, et al. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 1996;5:34-40.
- 141 Suzuki S, Toledo-Pereyra L. Interleukin-1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischaemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 1994;57:253-8.
- 142 Colletti L, Cortis A, Lukacs N, et al. 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* 1998;10:182-91.
- 143 Vollmar B, Menger MD, Glasz J, et al. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury, *Am J Physiol* 1994;26:G786-93.
- 144 Zibari GB, Brown MF, Burney DL, et al. Role of P-selectin in the recruitment of leukocytes in mouse liver exposed to ischemia and reperfusion. *Transplant Proc* 1998;30:2327-30.
- 145 Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994;55:662-75.
- 146 Jaeschke H, Smith CW. Cell adhesion and migration. III. Leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature. *Am J Physiol*;273:G1169-73.
- 147 Zhang JX, Pegoli W Jr, Clemens MG. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1994;266:G624-32.
-

- 148 Mittal MK, Gupta TK, Lee FY, et al. Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver. *Am J Physiol* 1994;267:G416-22.
- 149 Kuwamura E, Yamanaka N, Okamoto E, et al. Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implications in ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 1995;21:1138-43.
- 150 Sasaki H, Matsuno T, Tanaka N, et al. Activation of apoptosis during the reperfusion phase after rat liver ischemia. *Transplant Proc* 1996;28:1908-9.
- 151 Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, et al. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* 1993;25:3303-4.
- 152 Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, et al. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg* 1998;85:1636-40.
- 153 Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003;20:383-96.
- 154 Tsuyama H, Shimizu K, Yoshimoto K, et al. Protective effect of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Transplant Proc* 2000;32:2310-3.
- 155 Ishii S, Abe T, Saito T, et al. Effects of preconditioning on ischemia/reperfusion injury of hepatocytes determined by immediate early gene transcription. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:461-468.
- 156 Peralta C, Bartrons R, Riera L, et al. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G163-71.
- 157 Peralta C, Fernandez L, Panes J, et al. 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* 2001;33:100-13.
- 158 Serafin A, Rosello-Catafau J, Prats N, et al. Ischemic preconditioning increases the tolerance of fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am J Pathol* 2002;161:587-601.
- 159 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* 1999;31:425-7.

-
- 160 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* 2001;7:292-9.
- 161 Banga NR, Homer-Vanniasinkam S, Graham A, et al. Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br J Surg* 2005;92:528-38.
- 162 Jenkins DP, Baxter GF, Yellon DM. The pathophysiology of ischaemic preconditioning. *Pharmacol Res* 1995;31:219-24.
- 163 Ates E, Genc E, Erkasap N, et al. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation* 2002;74:1247-51.
- 164 Verdouw PD, Gho BC, Koning MM, et al. Cardioprotection by ischemic and nonischemic myocardial stress and ischemia in remote organs. Implications for the concept of ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci* 1996;793:27-42.
- 165 Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, et al. Induction of cellular resistance against Kupffer cell-derived oxidant stress: a novel concept of hepatoprotection by ischemic preconditioning. *Hepatology* 2003;37:286-95.
- 166 Peralta C, Perales JC, Bartrons R, et al. The combination of ischemic preconditioning and liver Bcl-2 overexpression is a suitable strategy to prevent liver and lung damage after hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 2002;160:2111-22.
- 167 Sawaya DE Jr, Brown M, Minardi A, et al. The role of ischemic preconditioning in the recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 1999;85:163-70.
- 168 Bouma MG, van den Wildenberg FA, Buurman WA. The anti-inflammatory potential of adenosine in ischemia-reperfusion injury: established and putative beneficial actions of a retaliatory metabolite. *Shock* 1997;8:313-20.
- 169 Lochner A, Marais E, Du Toit E, et al. Nitric oxide triggers classic ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci* 2002;962:402-14.
- 170 Rakhit RD, Edwards RJ, Marber MS. Nitric oxide, nitrates and ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1999;43:621-7.
- 171 Liu Y, Sato T, O'Rourke B, et al. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 1998;97:2463-9.
- 172 Korthius R, Gute D, Cepinskas G, et al. Cellular mechanisms of acute versus delayed preconditioning. *Pathophysiology* 1998;5:35-48.
- 173 Rockey DC, Chung JJ. Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. *J Clin Invest* 1995;95:1199-1206.
-

174 Harbrecht BG, Wu B, Watkins SC, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis during severe shock but not after resuscitation increases hepatic injury and neutrophil accumulation in hemorrhaged rats. *Shock* 1997;8:415-21.

175 Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen radical-mediated hepatic injury. *J Leukoc Biol* 1992;52:390-4.

176 Nandagopal K, Dawson TM, Dawson VL. Critical role for nitric oxide signalling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:474-8.

177 Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1997;272:31138-48.

178 Kim Y, de Vera ME, Watkins SC, et al. Nitric oxide preprotects cultured rat hepatocytes from tubular necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem* 1997;272:1402-11.

179 Vajdova K, Heinrich S, Tian Y, et al. Ischemic preconditioning and intermittent clamping improve murine hepatic microcirculation and Kupffer cell function after ischemic injury. *Liver Transpl* 2004;10:520-8.

180 Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, et al. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001;33:131-9.

181 Izuishi K, Fujiwara M, Hossain MA, et al. Significance of phosphoinositide 3-kinase pathway on ischemic preconditioning followed by ischemia reperfusion in mice liver. *Transplant Proc* 2003;35:132-33.

182 Carini R, Grazia de Cesaris M, Splendore R, et al. Signal pathway responsible for hepatocyte preconditioning by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1047-55.

183 Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231-41.

184 Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601-5.

185 Hume M, Yamamoto Y, Saad S, et al. Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1998;66:152-7.

¹⁸⁶ Zhang, Chen S: The role of Ischemic Preconditioning in Rat Liver Graft, *Chin J Hepatol* 8:221, 2004.

- ¹⁸⁷ Yin, Sankary, Chong, et. al,: Protective Effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury rats. *Transplantation* Vol 66, 152-257, No. 2, July 1999.
- ¹⁸⁸ Peralta, Serafin, Fernandez-Zabalegui, et al, : Liver Ischemic Preconditioning: A new strategy for prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplantation Proceedings* 2003.
- ¹⁸⁹ Hur GM, Ryu YS, Yun HY, et al. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation on NF- κ B. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:917-22.
- ¹⁹⁰ Ghosh S, May MJ, COP EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionary conserved medaitors of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-60.
- ¹⁹¹ Bauerle PA, Baltimore D. NF- κ B: ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
- ¹⁹² Li Y, Zhang W, Mantell LL, et al. Nuclear factor - κ B is activated by hyperoxia but does not protect from cell death. *J Biol Chem* 1997;272:20646-9.