

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**“Papel de la carbonilación de proteínas en las células epiteliales y de Kupffer, como resultado en la disminución del estrés oxidativo promovido por los inhibidores COX-1 y COX-2, en la lesión por isquemia reperusión hepática”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**“DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS”**

**PRESENTA: EDUARDO ESTEBAN MONTALVO JAVE**

**TUTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE PIÑA GARZA**

**México D.F. 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

## **Facultad de Medicina**

**“Papel de la carbonilación de proteínas en las células epiteliales y de Kupffer, como resultado en la disminución del estrés oxidativo promovido por los inhibidores COX-1 y COX-2, en la lesión por isquemia reperfusión hepática”**

**Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Biomédicas presenta:**

**Eduardo Esteban Montalvo Javé**

**Comité tural: Dr. Enrique Piña Garza  
Dr. David Jay Gomez –Farias.  
Dr. Rolando Hernández Muñoz**

**Jurado: Presidente: Dr. David Kershenobich S.  
Secretario: Dr. Enrique Piña Garza**

**Vocal: Dr. Andres Castell Rodriguez  
Vocal: Dra. Mina Konigsberg Fainstein  
Vocal: Dr. Jaime Mas Oliva**

**México D.F 2010**

## **Agradecimientos.**

Dedico este trabajo de tesis a mi querida esposa Julieta, que ha sido la luz en el camino de una nueva faceta en mi vida, a mis adorados hijos Edward y Nathalie que tuve la fortuna de ver nacer durante mis estudios de posgrado. Todos ellos han formado parte de este gran sueño, han sido mi gran motivación durante este tiempo.

A mis padres Elena y César por su brindarme su cariño y comprensión en todo momento, así como a mis hermanos Sofía y Gustavo con quienes comparto nuestras alegrías e ilusiones.

A mi maestro Dr. Enrique Piña, gracias por su confianza, apoyo y enseñanzas otorgadas desde estudiante de medicina a la actualidad, con quien siempre compartí la ilusión de realizar mis estudios de Doctorado.

Agradezco las facilidades otorgadas por el Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina. UNAM, a cargo del Dr. Fernando Villegas Alvarez, en especial al Dr. José Arturo Ortega Salgado, con quién iniciamos y continuamos con este proyecto, a pesar de las limitaciones y adversidades encontradas en el camino.

A los Doctores Rolando Hernández Muñoz y David Jay Gomez-Farias, por sus continuas y oportunas recomendaciones como parte de mi comité tutorial, y por permitirme realizar parte de los experimentos en sus laboratorios en el Departamento de Biología Celular, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM y en la Unidad de Medicina Cardiovascular del Instituto Nacional de Cardiología. México.

Al Dr. Andres Castell, Jefe del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM; por su apoyo y enseñanzas en técnica histológica e inmunohistoquímica.

Al Dr. Daniel Carrasco Daza, experto patólogo del Instituto Nacional de Pediatría, por su trabajo final que llevo tiempo y paciencia. Y a los Doctores Eduardo Muñoz y Roberto Gleason por las facilidades proporcionadas en el Laboratorio de Estado Sólido, del Instituto de Física de la UNAM.

Agradezco a la Dr. Martha Zentella de Piña en el Departamento de Bioquímica, que me brindó la oportunidad de realizar experimentos en su laboratorio, con el apoyo de Héctor, Deyamira, Enrique y Adrián.

Agradezco el apoyo a brillantes colegas en los Estados Unidos con quienes pude trabajar y colaborar durante el doctorado:

- Universidad de Pittsburgh, en Pensilvania al Dr. David A. Geller.
- Clínica Mayo, en Rochester, Minnesota al Dr. Raul Urrutia, Dr. Michael G. Sarr, Dr. David Nagorney, Dr. Mark Stegall y el Dr. Jeffrey Platt.

A los miembros de mi jurado de grado: Dr. David Kershenobich, al Dr. Enrique Piña, al Dr. Andres Castell, a la Dra. Mina Konigsberg y al Dr. Jaime Mas por sus valiosos comentarios al presente trabajo de tesis doctoral.

Para la realización de este trabajo de tesis, recibí el apoyo de una beca de estudios otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP). UNAM y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## ÍNDICE

Agradecimientos	1
Índice	3
Resumen en español	5
Resumen en inglés	7
<b>Introducción al trabajo de tesis</b>	<b>9</b>
<b>Marco teórico</b>	<b>12</b>
Breve historia del trasplante de órganos	12
Breve historia del trasplante hepático	12
Evolución del candidato a trasplante hepático. (MELD)	13
Trasplante hepático en México	15
Avances recientes en el trasplante hepático	16
Lesión por isquemia reperfusión	19
Trasplante hepático con donador vivo relacionado	22
Preacondicionamiento hepático	24
Trasplante de hígado y cáncer	26
Trasplante celular de hepatocitos	27
Soporte artificial para pacientes con falla hepática terminal	29
Estrés oxidativo	32
Carbonilación de proteínas	35
AINE´s e inhibidores de la enzima ciclooxigenasa (COX)	37
Isoenzimas de la COX	39
<b>Introducción al trabajo de tesis publicado</b>	<b>42</b>
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>45</b>
<b>Justificación</b>	<b>45</b>
<b>Hipótesis alterna</b>	<b>44</b>
<b>Hipótesis nula</b>	<b>45</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>46</b>
Objetivos específicos	46
<b>Material y métodos</b>	<b>48</b>
Animales y grupos de estudio	48
Procedimientos quirúrgico	49
Estudio de las enzimas séricas hepáticas	50
Estudio histopatológico	51

Técnica de lipoperoxidación (TBARS)	51
Resonancia paramagnética (EPR)	52
Inmunohistoquímica y carbonilación de proteínas	53
Inmunohistoquímica de CD34 y CD68	54
Estudio de Apoptosis por técnica de TUNEL	55
Estadística	56
<b>Resultados</b>	57
Actividad sérica de las enzimas hepáticas	55
Cambios histológicos	57
Presencia de EOR medidos por TBARS y EPR	61
Carbonilación de proteínas por inmunohistoquímica	65
Inmunohistoquímica de CD34 y CD68	71
Apoptosis por técnica de TUNEL	72
<b>Discusión</b>	77
<b>Presentaciones en Congresos Internacionales</b>	88
<b>Perspectivas</b>	89
<b>Bibliografía</b>	90
<b>Anexos</b>	102

**Lista de abreviaturas.**



## RESUMEN

**Introducción.** La lesión por isquemia reperfusión hepática (IRH) es prácticamente inevitable en las cirugías del hígado, especialmente en el trasplante, resecciones hepáticas y trauma. El daño oxidativo generado se caracteriza por la elevación de las especies reactivas del oxígeno (EOR) y la activación de una respuesta inflamatoria que pueden ocasionar una lesión tisular grave. El objetivo del presente estudio fue ampliar la caracterización de la lesión hepática, en un modelo experimental de isquemia caliente y reperfusión hepática, durante el curso temporal en 24 horas, particularmente al estudiar indicadores de daño oxidativo y la carbonilación de proteínas en sus células, y evaluar el efecto de los inhibidores COX-1 (Piroxicam) y COX-2 (Meloxicam) en la evolución de la respuesta hepática a la lesión.

**Métodos.** Se emplearon ratas Wistar machos, distribuidas aleatoriamente en 4 grupos de estudio (n=10 por cada tiempo estudiado): simulado, sometido a IRH sin medicamentos, y dos grupos con IRH tratados con un inhibidor de la COX-1 o de la COX-2. Se realizó isquemia caliente por oclusión vascular total durante 90 min, después se permitió la reperfusión. Se tomaron muestras a los siguientes tiempos postreperfusión: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 12, y 24 hs. En suero se efectuaron las determinaciones de las enzimas alanino aminotransferasa (ALT)/(TGP), aspartato aminotransferasa (AST)/(TGO), deshidrogenasa láctica (DHL) y ornitincarbamiltransferasa (OTC). En muestras hepáticas se estudiaron marcadores de apoptosis por técnica de Túnel, de lipoperoxidación mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS), de carbonilación de proteínas detectada por inmunohistoquímica, y de alteración

celular por un estudio histopatológico. La poza de radicales libres (RL) se evaluó en bilis por resonancia paramagnética (EPR).

**Resultados.** Todos los indicadores de lesión aparecieron desde la primera hora de reperfusión y alcanzaron su máximo a las 2 y 4 h postreperfusión. . En sangre hubo aumentos importantes en la actividad de las 4 enzimas estudiadas. En hígado se elevó la lipoperoxidación, la carbonilación de proteínas, y la apoptosis, lo cual se correlacionó con mayor daño histológico. En bilis se elevó la poza de RL. Con base a los datos de carbonización de proteínas, las células endoteliales (CE) y las células de Kupffer (CK) fueron las primeras en mostrar daño oxidativo por la IRH. La aplicación de los inhibidores de la COX1 y COX2 durante el período preisquémico produjo una disminución significativa en todos los marcadores de lesión estudiados. No hubo diferencias significativas al comparar los resultados obtenidos con el uso de ambos fármacos.

**Conclusiones.** Existe un potencial uso de éste grupo farmacológico inhibidor de las COX, que requerirá estudios clínicos y experimentales para optimizar y obtener el medicamento adecuado en procesos isquémicos, específicamente aquellos programados debido a una intervención quirúrgica.

Proponemos que el estudio de la carbonilación de proteínas y su detección a nivel celular se pueda emplear como herramienta adecuada para precisar la secuencia temporal del daño celular inducido por estrés oxidativo en los diferentes eventos fisiopatológicos que ocurren en órganos constituidos por células de distintas estirpes.

## ABSTRACT

**Introduction.** The present study was aimed to increase the knowledge on indication of tissular damage, particularly protein carbonylation, induced by liver ischemia reperfusion injury (LIRI), and to evaluate potential useful effects of inhibitors of cyclooxygenases (COX) 1 and 2, to prevent this tissular damage. LIRI is unavoidable in liver surgeries, especially in transplants, hepatic resections, and trauma.

**Methods.** We used male Wistar rats, randomly distributed in one sham group, and three groups subjected to LIRI, one of these without treatment and two groups treated with a piroxicam or with meloxicam. Warm ischemia was performed by partial vascular occlusion during 90 min, then allowing reperfusion. Samples were taken at the following post-reperfusion times: 0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 4.0; 12, and 24 h. In serum, we determined catalytic activity of the following hepatic enzymes (HEs): alanine aminotransferase (ALT); aspartate aminotransferase (AST); lactate dehydrogenase (LDH), and ornithine carbamoyltransferase (OCT). In liver samples, we studied cellular alterations by means of histological studies, and we measured lipid peroxidation markers by the assaying thiobarbituric reactive substances (TBARS), protein carbonylation (PC) by immunohistochemistry (IHC), and apoptosis by the TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) technique. We also measured reactive oxygen species (ROS) in bile by means of electron paramagnetic resonance (EPR).

**Results.** All indicators of cell injury appeared from the first hour of reperfusion, and reached their maximum expression at 2 and 4 h post-reperfusion. A sharp

increase in serum activity of the four HEs was observed simultaneously with greatest histological damage. An increase in TBARS, PC, and apoptosis was recorded, which correlated with an elevated ROS pool in the bile. Based on PC data, endothelial cells (EC) and Kupffer cells (KC) were the first to exhibit LIRI-associated oxidative damage and prior to parenchymal cells. Administration of piroxicam or meloxicam during the pre-ischemic period produced a highly significant decrease in all studied injury indicators. No significant differences were revealed between the two drugs.

**Conclusions.** The data shown here suggest the potential use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in minimizing ischemic event-caused damage in liver, especially in programmed surgical-intervention-related events. We also propose that PC detected at cellular level may be employed as an adequate tool to assess cells damage temporal evolution, following oxidative stress, in organs like liver formed by cells of different lineage.

## **INTRODUCCION AL TRABAJO DE TESIS.**

El presente trabajo de tesis doctoral tuvo sus inicios en el interés de adquirir nuevos conocimientos en el área de trasplantes de órganos, especialmente en la lesión por isquemia reperusión a nivel hepático.

Pensamos en el estudio de marcadores de daño oxidativo en un modelo experimental en rata, con isquemia caliente por 90 minutos, en un curso temporal de 24 horas. Con los resultados iniciales obtenidos en el laboratorio, nos preguntamos que podíamos ofrecer a la comunidad científica para modular o disminuir la respuesta inflamatoria durante la fase de isquemia y posterior a la reperusión del hígado. En función de los trabajos publicados por nuestro grupo, decidimos trabajar sobre los probables efectos de los antiinflamatorios no esteroideos, como protectores tisulares y como secuestradores de especies reactivas del oxígeno, así modulando la generación con marcadores serológicos, carbonilación de proteínas, y otros indicadores directos e indirectos de daño oxidativo consecutivos a los procesos de isquemia reperusión (IR). Al respecto empleamos los inhibidores de las COX-1 y COX-2. Dentro de las diversas estrategias para demostrar los efectos de la lesión por IR, iniciamos con la medición sérica de las enzimas de escape a nivel citosólico y mitocondrial como son la ALT, AST , DHL y OTC respectivamente, dichas enzimas se pueden monitorizar de manera análoga a nivel clínico en pacientes que así lo requieran.

Hasta el momento, no hay lugar a dudas que las ERO's participan en el fenómeno de IR. Sin embargo, como abordar su estudio ha sido un reto, no solo nos conformamos con demostrar sus efectos químicos de manera

indirecta, por ejemplo a través de la lipoperoxidación por medio de la técnica del ácido tiobarbitúrico (TBARS) en biopsias hepáticas, que es el indicador más usado de presencia de ERO. Además, para tener una información más directa de la producción de estos componentes decidimos evaluar la presencia de RL en bilis mediante un atrapador de radicales libres (PBN), y analizar su presencia por resonancia paramagnética (EPR).

Para poder evaluar los resultados de forma integral, incluimos biopsias hepáticas para su estudio histopatológico, se estudiaron primariamente datos de hemorragia, edema, infiltrado inflamatorio, necrosis y apoptosis, mediante a tinción de eosina y hematoxilina. Para una mayor precisión de los resultados de muerte celular programada o apoptosis, ésta se realizó mediante la técnica de Tunel, la observación de las células involucradas en este proceso.

Un proceso de especial interés en nuestro proyecto fue el análisis de la carbonilación de proteínas, como un indicador de el ataque a las proteínas por las ERO surgidas por la isquemia reperusión. Pensamos en una opción adecuada y novedosa para evaluar la carbonilación de proteínas fuera mediante su identificación inmunohistoquímica, así pudiendo observar directamente la magnitud de las proteínas carboniladas y la afectación que mostraron en las distintas estirpes de células hepáticas involucradas en las diversas etapas de isquemia y reperusión. Previamente habíamos publicado la aparición de los grupos carbonilos en plasma y linfocitos consecutiva a una intoxicación aguda por etanol.<sup>1</sup>

A continuación, para enmarcar y dar una mejor explicación al tema, hemos decidido ofrecer un panorama general de los diversos temas relacionados al trabajo de tesis. Iniciamos con el tema de trasplante de órganos, especialmente

a nivel hepático, con el objetivo de conocer la necesidad de potenciales donadores para pacientes en falla hepática terminal y su estado actual en el mundo y en México. Recientemente publicamos una revisión de la literatura con los avances en el trasplante hepático, por lo que consideramos presentar información en relación a este tema, desde sus indicaciones en cáncer hepático, donador vivo relacionado, trasplantes celular de hepatocitos y soporte artificial temporal.<sup>2</sup>

Así mismo incluimos una descripción del fenómeno de isquemia reperusión hepática y los factores involucrados, dado nuestro gran interés en el tema publicamos un artículo de revisión por lo que presentamos la información relevante en este tema.<sup>3</sup> En este rubro, como una de sus modalidades o estrategias quirúrgicas empleadas en IR en los últimos años, el preacondicionamiento hepático ha despertado un gran interés en la comunidad biomédica, por lo que brindamos un panorama general en este tópico, fue motivo nuevamente de un artículo de reciente publicación.<sup>4</sup>

Para una mejor descripción de los agentes farmacológicos empleados, presentamos una descripción de los AINE's y los inhibidores de la COX; el daño oxidativo es abordado desde su concepto inicial hasta los diversos agentes oxidantes, RL, enzimas antioxidantes y ERO's. Finalmente concluimos la parte del marco teórico con el estrés oxidativo y la carbonilación de proteínas medidas con técnicas de inmunohistoquímica como aporte paralelo al presente trabajo de tesis.

Este trabajo de tesis ha sido producto de un grupo multidisciplinario que involucró varias instituciones y colaboradores.

## MARCO TEÓRICO

### **Breve historia del trasplante de órganos.**

Hace poco mas de medio siglo, en el año 1955, en la ciudad de Boston, Massachussets, EUA, el Dr. Joseph Murray realizó exitosamente el primer trasplante renal en dos mellizos idénticos, suceso que marcó el punto de partida para los grandes avances en el mundo del trasplantes de órganos.<sup>5</sup> Este acontecimiento científico brindó una nueva esperanza a los pacientes con insuficiencia renal, en esos tiempos una de las grandes barreras era la histocompatibilidad, los aspectos técnicos de la cirugía y anestesia, la disponibilidad de órganos, el rechazo y un esquema de inmunosupresión aceptable. Al Dr. Murray, destacado cirujano y científico le fue otorgado el Premio Nobel en Medicina en el año 1990 en reconocimiento a su trabajo e iniciativa que ha permitido que los trasplantes de órganos, tejidos y células sean una realidad en nuestros días.<sup>6</sup>

### **Breve historia del trasplante hepático.**

En el año de 1963 en la ciudad de Denver, Colorado, EUA, el Dr. Thomas E. Starzl, realiza el primer trasplante hepático (TH) a nivel mundial,<sup>7</sup> y en 1967 realiza el primer trasplante con sobrevida mayor a un año.<sup>8</sup> Ha transcurrido el tiempo, prácticamente 4 décadas después podemos observar que la evolución y avances en el área de trasplantes ha permitido considerar al TH en sus diversas modalidades, como la opción terapéutica para insuficiencia hepática terminal.<sup>9</sup> En relación a la falla en las funciones del hígado, éstas han fomentado la inquietud y la necesidad de obtener nuevas alternativas en la



viabilidad de órgano y la disponibilidad de donadores, dado que la lista de espera en todos los países con programas bien establecidos es cada día mayor a la demanda de la población.<sup>10</sup> Otros aspectos a considerar son el estudio de los mecanismos para mejorar la preservación del hígado,<sup>11</sup> disminuyendo los efectos de la lesión por isquemia reperusión,<sup>3, 12</sup> estrategias quirúrgicas como el preacondicionamiento,<sup>4, 13, 14</sup> nuevos y mejores esquemas de medicamentos que disminuyan el rechazo agudo o crónico, manejo de complicaciones posoperatorias; un punto fundamental al respecto es la cultura médica de la población, centros especializados y un marco legal definido.<sup>10</sup>

Un claro ejemplo de lo anterior, que ha permitido marcar una diferencia en el tratamiento médico, es el esquema de inmunosupresión. En la década de los 80's, la inclusión de la ciclosporina en los protocolos clínicos, inicialmente empleada en pacientes con trasplante renal y posteriormente en el trasplante de hígado,<sup>15</sup> permitió notables avances en el manejo multidisciplinario de los pacientes trasplantados. Sin lugar a dudas esta droga modificó favorablemente el tratamiento de los pacientes trasplantados, siendo un avance significativo en el tratamiento de los pacientes con enfermedades terminales hepáticas.<sup>16</sup>

### **Evaluación del candidato a trasplante hepático. Clasificación de MELD.**

Resulta importante en el TH el modelo para clasificar y evaluar al paciente candidato a trasplante, por sus siglas en inglés "Model for end-stage liver disease" (MELD).<sup>17</sup> La clasificación de MELD es una escala numérica que se extendió a partir del 6 (grado de enfermedad menor) a 40 (grado de enfermedad mayor) que se emplea para los candidatos del trasplante del hígado desde los 12 años en adelante. MELD provee a cada persona un

número (“score”) que proporciona una idea clara sobre la urgencia para realizar un trasplante del hígado en el plazo de los 3 próximos meses.<sup>17-19</sup> La ubicación de MELD es calculada por medio de una fórmula que utiliza los resultados de tres pruebas de laboratorio rutinarias: bilirrubina directa, que mide la capacidad funcional del hígado para unir el glucoronato con la bilirrubina para hacerla soluble en agua; INR (tiempo de protrombina), que mide la capacidad del hígado de fabricar factores de coagulación de sangre, y la creatinina, que es un indicador de la función renal. (La función deteriorada del riñón se asocia a menudo a enfermedad del hígado severa.). Dichos valores de MELD se utilizan para los candidatos de 12 años en adelante, mientras que el PELD (modelo pediátrico de la enfermedad del hígado en fase terminal) se utiliza para los pacientes de 11 años y menores.<sup>19</sup> La clasificación de un paciente puede elevarse o caer en un cierto plazo dependiendo del estado de su enfermedad hepática. La mayoría de candidatos tendrá su clasificación de MELD mientras se encuentre en la lista de espera para recibir un trasplante. Esto ayudará en asegurar que, los hígados donados sean recibidos realmente por los pacientes con mayor necesidad en ese momento. La única excepción de la prioridad A de MELD es una categoría conocida como estado 1 ó urgente, que son pacientes con falla hepática aguda (de inicio repentino y severo) y con una esperanza de vida de horas a algunos días, si no reciben un trasplante.<sup>20</sup> Afortunadamente menos del 1% de los hígados trasplantados se encuentran en ésta categoría.<sup>18,</sup>

<sup>21</sup> Debemos hacer notar que este sistema se emplea en Estados Unidos y en Canadá; Europa y Asia con limitaciones y variaciones en los criterios de los donadores y receptores. En México se aplica de manera modificada de acuerdo al registro nacional de trasplantes.<sup>22, 23</sup>

## El trasplante hepático en México.

En México el programa de TH inició en los años ochenta,<sup>24</sup> el primer caso exitoso TH fue reportado en 1991.<sup>25</sup> A la fecha el número de centros de trasplante de órganos, especialmente de riñón son cada vez más frecuentes en nuestro país,<sup>22</sup> y en relación programa de TH, éste ha logrado avances notables en diversos centros hospitalarios.<sup>26-28</sup> Como resultado de un gran esfuerzo y entusiasmo han logrado sacar adelante los centros de trasplantes en México, por lo que se requiere una mayor infraestructura biomédica, incremento en la viabilidad de órganos, personal especializado y el ajuste de los altos costos que un programa de trasplantes implica.<sup>23</sup>

En la figura 1, actualizado al mes de Enero-Febrero del 2009, se muestra la evolución del número de trasplantes hepáticos realizados en México desde 1991 a la fecha.<sup>23</sup>

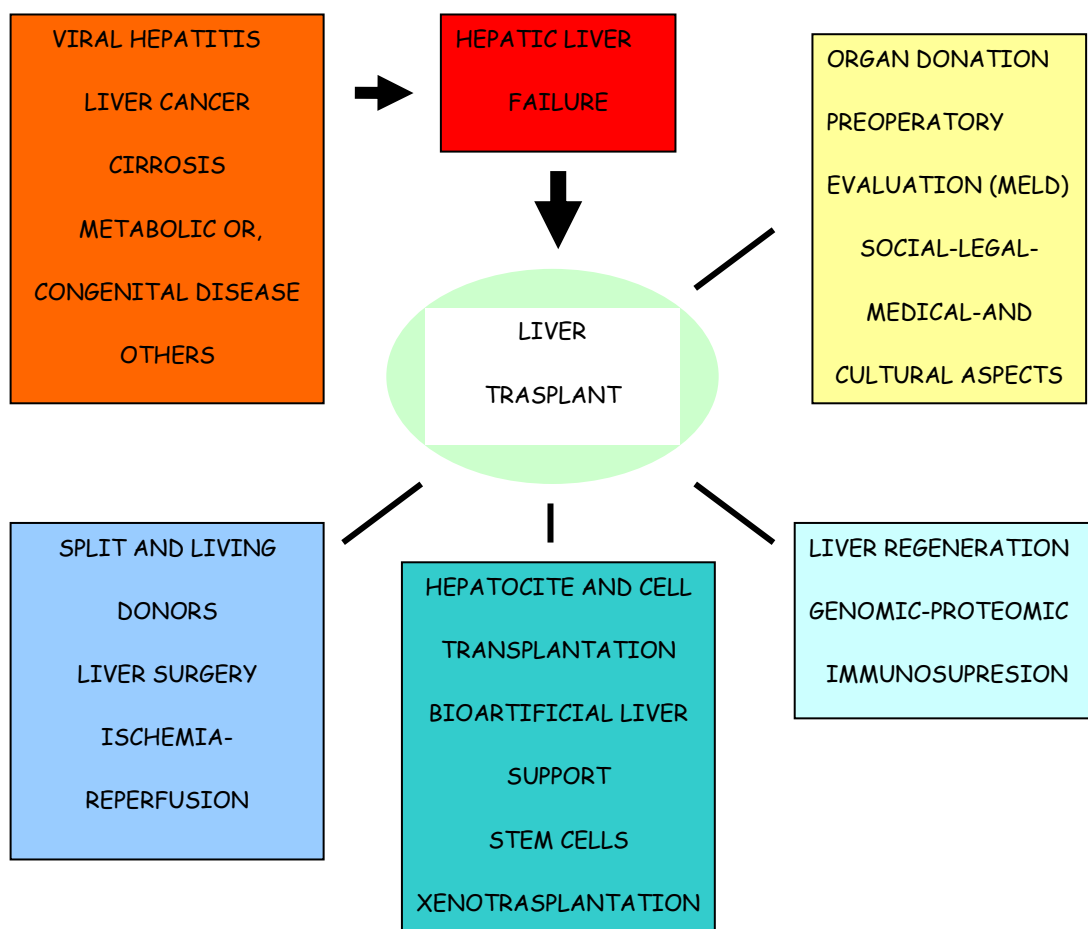


**Figura 1.** Estado actual de los trasplantes de hígado en México.

### **Avances recientes en el trasplante hepático.**

El trabajo multidisciplinario en la medicina y la cirugía de los trasplantes nos ha brindado conocer cada día más de este campo del conocimiento. El objetivo de esta revisión es proporcionar un panorama claro de importantes avances en el TH, siendo imposible como motivo de tesis incluir todos y cada unos de dichos avances que se incluyen de manera general en la figura 2. Hemos considerado algunos de ellos, como son los aspectos quirúrgicos para la obtención de un(os) segmento(s) del órgano de un donador vivo relacionado, indicaciones para pacientes con cáncer hepático (carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma), hasta las expectativas en el trasplante celular de hepatocitos, soporte artificial temporal para pacientes con falla hepática terminal, que implica una íntima relación con la biología molecular, genómica y proteómica.

Otros aspectos que siguen siendo un atractivo clínico potencial pero aun continúan primariamente en fase experimental, son los xenotrasplantes.<sup>29</sup> Surgen como una opción de obtener órganos de otras especies para los pacientes que requieren un trasplante. Se han tenido experiencias clínicas iniciales pero aun no se han establecido como un elemento viable a largo plazo, dado principalmente por las limitaciones inmunológicas, y las diferencias en la genética con los animales donadores,<sup>30</sup> siendo el mas estudiado el cerdo, por su similitud en la morfológica hepática con la del ser humano. Esta opción parece ser la más viable para obtener órganos para trasplante en mayores cantidades y sigue siendo actualmente objeto de extensos estudios.<sup>31, 32</sup>



**Figura 2.** Tomada de la publicación original realizada en relación a los avances en el trasplante hepático.<sup>2</sup>

El número de pacientes que requieren trasplante de algún órgano, en México como en el mundo, es cada día mayor; la lista de espera de los candidatos registrados supera por mucho la disponibilidad y capacidad de los sistemas de salud. Como se puede apreciar en la figura 3, en Mexico (2009),<sup>23</sup> 11,948 pacientes en total se encontraban inscritos oficialmente en el registro nacional de trasplantes; de los cuales el mayor número lo encontramos entre los que requieren córneas, riñones e hígados. Sin embargo el número real de pacientes se encuentra subestimado, dado que muchos fallecen sin llegar a conformar una lista de espera, y otros nunca fueron ingresados o acudieron a un centro del sistema de salud para una valoración por el equipo multidisciplinario de

trasplantes. En lista de espera para obtener una donación de hígado en Agosto de 2009 se encuentran 338 pacientes. Esta problemática no es solo en México, es una prioridad con distribución constante a nivel mundial.<sup>18</sup>



**Figura 3.** Lista de espera de candidatos a trasplantes registrados oficialmente en el registro nacional de trasplantes.

La población es diversa, incluye pacientes de todos los estratos socio-económico y culturales. Tal y como podemos apreciar en la figura 4, es igualmente heterogénea la edad de los pacientes en lista de espera para un órgano, como podemos apreciar en la gráfica por grupos, publicada en la pagina web de Registro Nacional de Trasplantes en el 2007.



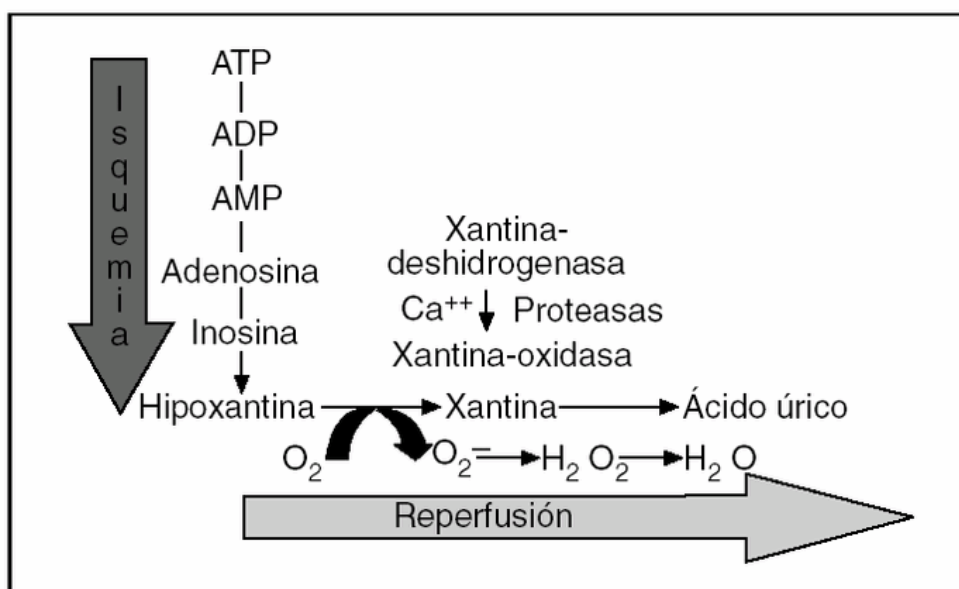
**Figura 4.** Lista de espera nacional; activos por edad.

### **Lesión por isquemia reperfusión. (LIR)**

Despojar de flujo sanguíneo a un órgano (isquemia) y luego restablecerlo (reperfusión) causa un daño que se denomina lesión por isquemia-reperfusión (IR).<sup>33</sup> Los efectos producidos durante la fase de isquemia se relacionan, sobre todo, con la privación de oxígeno que disminuye los fenómenos respiratorios celulares y puede llegar a causar, en pocos minutos, lesiones irreversibles en órganos vitales tales como corazón, cerebro, riñones o hígado. La fase de reperfusión implica el ingreso de oxígeno, que genera paradójicamente una respuesta inflamatoria que no sólo daña el órgano sometido a isquemia (respuesta local), sino también a órganos distantes (respuesta sistémica). En el ámbito de la cirugía hepática, la IR queda establecida en 2 situaciones: A) Temperatura corporal normal (normotermia o denominada también isquemia caliente) se realiza durante las resecciones hepáticas, cuando se lleva a cabo

la oclusión vascular del pedículo hepático, conocida como maniobra de Pringle (oclusión de la vena porta, arteria hepática y conducto biliar principal), y B) Temperatura baja (isquemia fría), durante el proceso de obtención, almacenamiento y posterior implante de un injerto hepático en el ámbito del trasplante. El problema clínico es que la LIR produce una morbimortalidad significativa en ambas situaciones,<sup>12, 34</sup> y se observa en otras entidades clínicas como los padecimientos de urgencia, especialmente en trauma contuso o penetrante en alguna cavidad u órgano.<sup>35</sup>

La fisiopatología de la LIR es compleja, pero hay una serie de hechos bien establecidos; por lo que en condiciones de isquemia prolongada se produce un catabolismo del adenosintrifosfato (ATP) que lleva a la acumulación de hipoxantina y se generan, inmediatamente después de la reperfusión, especies reactivas de oxígeno (ERO) a través del sistema xantina-oxidasa,<sup>36</sup> figura 5.



**Figura 5.** Cascada de reacciones que llevan a la formación de ERO, después de un evento de isquemia reperfusión.



Por otra parte, en esta fase también está bien demostrada una disminución de la fosforilación oxidativa y de la actividad de las bombas de las membranas celulares que son dependientes del ATP, con la consiguiente entrada de calcio, sodio y agua al interior de la célula, situación que hace a las células especialmente vulnerables a cualquier agresión. Además, se ha podido constatar la aparición de moléculas proinflamatorias (moléculas de adhesión de leucocitos, citocinas, endotelina, tromboxano  $A_2$ , etc.) y la supresión o inactivación de moléculas protectoras (óxido nítrico, prostaciclina, etc.),<sup>33</sup> mediadas por las células endoteliales, participación de los macrófagos hepáticos como son las células de Kupffer y el efecto sobre el parénquima hepático conformado principalmente por hepatocitos,<sup>3</sup> figura 6. La isquemia de un órgano, en este caso en el hígado, conduce a un estado proinflamatorio que aumenta la vulnerabilidad del tejido durante la reperfusión y puede llevar a la necrosis celular o la apoptosis.<sup>37, 38</sup> Realizamos una revisión principales factores involucrados en LIR a nivel hepático, por lo que consideramos conveniente reducir aquí la extensión del tema sobre IRH.<sup>3</sup>

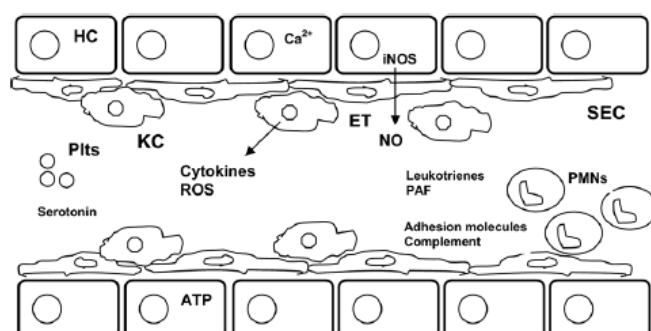


FIG. 1. Mechanisms involved in hepatic ischemia-reperfusion injury. Hepatocyte (HC), sinusoidal endothelial cell (SEC), Kupffer cell (KC), neutrophil (PMN), platelets (Plts), nitric oxide (NO), endothelin (ET), calcium ( $Ca^{2+}$ ), adenosine triphosphate (ATP), platelet activating factor (PAF), reactive oxygen species (ROS).

**Figura 6.** Principales mecanismos relacionados con la lesión hepática por isquemia reperfusión. Tomado directamente de la publicación.<sup>3</sup>

### **Trasplante hepático con donador vivo relacionado. (THDVR)**

Los donadores potenciales y órganos viables han sido y seguirán siendo en el trasplante de hígado total o parcial, una de las mayores limitaciones. Otro factor son las tendencias ideológicas de ciertas regiones del mundo, como en el Japón y países orientales, donde hasta la fecha no es factible el trasplante de donador cadavérico, por estas razones se han buscado nuevas alternativas para los pacientes en lista de espera para TH.<sup>39</sup> EL THDVR es una buena opción quirúrgica con donadores vivos relacionados, semejante a lo que sucede con el trasplante renal, en este caso solo tenemos un órgano que tiene la posibilidad de regenerarse, obteniendo un segmento hepático para el receptor y dejando un remanente de glándula hepática en el donador, suficientes para que ambos individuos sobrevivan y lleven una estilo de vida activo.

En los Estados Unidos se inició la fase clínica del THDVR a finales de los 90's , en la actualidad se realizan bajo esta modalidad alrededor del 5-7% de los TH en adultos.<sup>40</sup> Las complicaciones frecuentemente relacionadas al THDVR están: el tamaño del órgano donador,<sup>41</sup> el empleo de este tipo de trasplantes para los pacientes con carcinoma hepatocelular,<sup>42</sup> neo y reinfección viral por hepatitis C con seguimiento a largo plazo,<sup>43</sup> imposibilidad de evitar la inmunosupresión, problemas de histocompatibilidad, e incluso la muerte del donador o receptor. Todas estas complicaciones limitaron su empleo en los centros de trasplante en sus inicios.<sup>39</sup> Sin embargo recientemente se han publicado series de casos con tasas de éxito por grupos orientales y occidentales, por ejemplo en Canadá, en un estudio con 101 casos reportados, con 0% de mortalidad operatoria, a quienes se les realizó lobectomía derecha,

con seguimiento de hasta 4 años con buena evolución clínica.<sup>44</sup> En un estudio multicéntrico en 9 hospitales especializados se realizaron THDVR en 385 pacientes que presentaron sobrevida de órgano a los 90 días y a un año; con 87 y 81% respectivamente. Se observó que los donadores mayores de 60 años y el tiempo prolongado en la isquemia fría fueron de los factores pronósticos adversos los más frecuentes.<sup>45</sup>

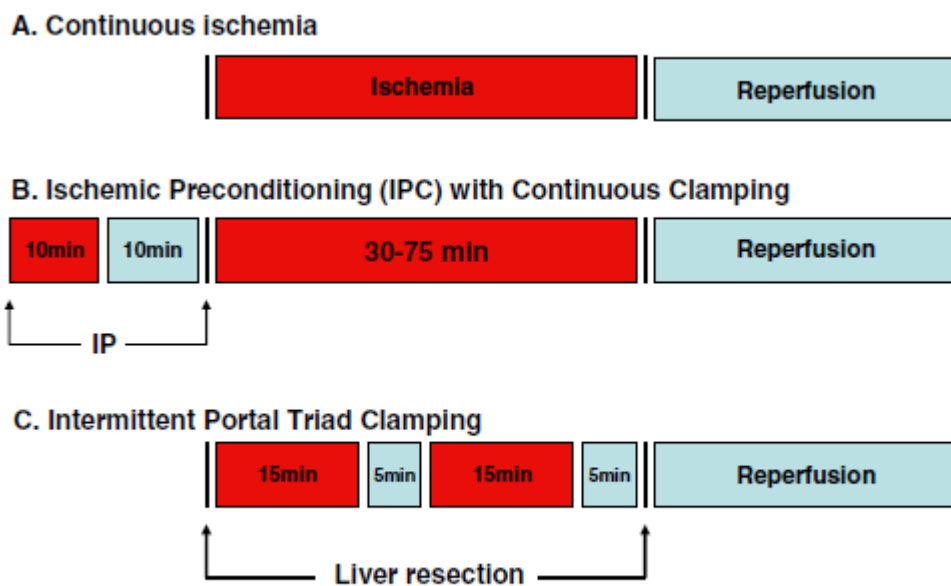
En población pediátrica ésta modalidad de THDVR, y trasplante hepático de tamaño reducido (THTR), tienen gran impacto por que la mortalidad en pacientes en lista de espera es mayor que en adultos; estos datos se incrementan año con año, debemos tomar en cuenta que aproximadamente el 7-10% de los TH se realizan en niños.<sup>46, 47</sup> Con esta técnica quirúrgica se obtienen por lo general dos lóbulos para trasplante, uno para niños y otro para un adulto, requiere de una experta disección y adiestramiento; siendo aún mayor que para el TH convencional. El tiempo de isquemia y los donadores viables son nuevamente una limitante para este grupo de pacientes, el THDVR y THTR son las opciones que han favorecido un mayor número de pacientes trasplantados en población general y pediátrica.<sup>48</sup> En México, el grupo del Hospital Infantil de México publicó una serie de 35 pacientes de TH, incluyendo el primer caso de THDVR en niño, siendo la sobrevida al primer año de 77.1% y 74.2% a los 5 años de seguimiento.<sup>28, 49</sup>

### **Preacondicionamiento hepático.**

El preacondicionamiento hepático (PH) es un fenómeno que fue descrito por primera vez en 1984 por Zager en riñón,<sup>50</sup> y posteriormente por Murry et al en corazón.<sup>51</sup> El PH consiste en la aplicación de episodios de isquemia-reperusión

breves y repetitivos, antes de una isquemia-reperfusión prolongada.<sup>13</sup> Con posterioridad se constató que la protección obtenida contra la LIR con el PH inicialmente en el corazón era aplicable a otros órganos con funcionalidad muy diversa, como el músculo estriado,<sup>52</sup> el cerebro,<sup>53</sup> el intestino,<sup>54</sup> los pulmones,<sup>55</sup> los riñones,<sup>56</sup> la retina<sup>57</sup> y el hígado.<sup>58</sup> En cualquier caso, la tolerancia a la LIR inducida por el PH es específica para cada órgano y en cada especie animal. Es decir, para cada uno de ellos, el número de ciclos de isquemia-reperfusión y su duración varían. Así pues, mientras que en el miocardio se consigue la protección tras varios ciclos de isquemia-reperfusión, en el hígado se obtiene tras aplicar un ciclo único de 10 min de isquemia seguido de 10 min de perfusión, sin que la adición de nuevos períodos de isquemia-reperfusión proporcione más protección.<sup>59</sup> Es de mencionar que el postcondicionamiento se ha estudiado recientemente proporcionando datos alentadores en combinación o no de otra estrategia vascular.

Las diversas modalidades y estrategias que se han desarrollado en el área de isquemia-reperfusión se presentan a continuación en la figura 7. En relación a la estrategia de precondicionamiento hepático realizamos un artículo de revisión con una detallada explicación del tema.<sup>4</sup> Ver anexo 3.



**Figura 7.** Estrategias quirúrgicas y modalidades de preconditionamiento en el área de isquemia reperusión. Tomada directamente de la publicación original.<sup>4</sup>

### Transplante de hígado y cáncer.

La indicación del TH ha sido empleada en casos de neoplasias malignas del hígado desde sus inicios, actualmente alrededor de 400 pacientes en EUA se intervienen anualmente con esta patología, siendo el TH una alternativa terapéutica de primera elección.<sup>42</sup> En cáncer hepático debemos diferenciar la patología que afecta primariamente a los diversos grupos celulares del hígado, por ejemplo los hepatocitos (carcinoma hepatocelular)<sup>60</sup> y las células de los conductos biliares (colangiocarcinoma). Este último ha tenido un mayor incremento en el número de pacientes sometidos a TH,<sup>61</sup> pero no en todos los casos se recomienda el TH, y en la selección de los pacientes se debe tomar

en cuenta que sea un tumor menor a 5 cm o no más de tres lesiones menores de 3 cm., sin invasión vascular.

Con el ajuste en los criterios de inclusión para TH en este grupo de pacientes con diagnóstico de carcinoma hepatocelular, se ha logrado sobrevida similar a la viabilidad del órgano en pacientes trasplantados con patología no maligna.<sup>62</sup>

En la actualidad de acuerdo a estos lineamientos (criterios de Milán y ajustes posteriores) los pacientes con una tumoración  $\leq 5$  cm ó 2-3 lesiones  $\leq 3$  cm., no mayores de 3 cm. en circunferencia, sin invasión vascular y que reciben tratamiento prioritario con TH, los resultados son más alentadores que en sus inicios.<sup>63</sup> Un grupo de investigadores proponen incrementar las dimensiones en los criterios, siendo 6.5 cm. como tamaño máximo del tumor, o 3 tumoraciones no mayores de 4.5cm, obteniendo resultados similarmente buenos a los alcanzados con los criterios anteriores.<sup>64</sup> Sin embargo en los casos de colangiocarcinoma en fases avanzadas, el pronóstico es aún pobre en comparación con el carcinoma hepatocelular. En pacientes con colangiocarcinoma estadio I y II, sin ganglios positivos hiliares, se comparó de manera prospectiva los resultados de los pacientes a quienes se les realizó TH y terapia neoadyuvante (TN) en comparación con el grupo de resección convencional, siendo el TH y TN la mejor opción para este grupo de pacientes.<sup>65</sup> En otros tipos de neoplasias menos agresivas, como el hemangioendotelioma epiteloidal y el hepatoblastoma, el TH presenta aun mejores resultados cuando se tratan tempranamente.

### **Trasplante celular de hepatocitos (TCH).**

Se han realizado estudios en humanos y en diversas especies incluyendo modalidades de trasplante desde el tipo autólogo hasta el xenotrasplante, con resultados progresivamente alentadores; siendo cada vez sea mayor el avance en la vida media y funcionalidad del TCH.<sup>66, 67</sup>

Dentro de las opciones para TCH, una modalidad es su inyección por vía portal o en lugares ectópicos, como la pulpa esplénica, demostrando transitoriamente en animales de experimentación que los valores en las pruebas de funcionamiento hepático tienden a la normalidad por un tiempo determinado de acuerdo al modelo empleado.<sup>67, 68</sup> Un número reducido de pacientes estudiados y una corta viabilidad de los hepatocitos es una de las causas de no viabilidad de los hígados disponibles para TH, en particular en las células con alto contenido de grasa; que hasta la fecha no son recomendadas para TCH.<sup>69</sup> Con estas características un grupo de potenciales donadores puede reducirse si tomamos en cuenta que el hígado graso es una patología frecuentemente asociada y diagnosticada en pacientes con dietas occidentales, con gran ingesta de carbohidratos y grasa de manera desproporcionada. Esta entidad clínica ha provocado gran interés en el grupo de gastroenterólogos, hepatólogos e internistas; así como su relación con obesidad, dislipidemia o síndrome metabólico.<sup>70</sup>

En relación a las células hepáticas, estas pueden proceder del mismo individuo en base a la tecnología de células madre, de otro ser humano, o xenotrasplante.<sup>71</sup> Otra opción viable son las células madre de origen mesenquimatoso que derivan de la médula ósea, proporcionando una nueva opción para el tratamiento de las enfermedades del hígado.<sup>72</sup>

Pero sin duda, hasta el momento la mayor cantidad de estudios realizados en esta área han sido enfocados a los xenotrasplantes, producto de la cooperación entre la investigación básica y clínica, ambas indispensables para el progreso del TH, este tipo de trasplantes se han estudiado como una opción viable en humanos, la obtención de órganos ha sido investigada en diversas especies; siendo las de mayor impacto hasta el momento los cerdos y primates, con trabajos iniciales experimentales con roedores. La limitación al emplear el órgano completo para trasplante o las células hepáticas para su implantación, es la cierta transmisión de agentes patógenos, primariamente virus.<sup>73, 74</sup> Por lo que resulta atractiva la terapia genética previa a la trasplante celular, modificando este potencial inmunológico y genético,<sup>75</sup> como lo demostrado en animales KO o depletados de GAIT KO (alpha1,3-galactosyltransferase knockout).<sup>76, 77</sup>

### **Soporte artificial en pacientes con falla hepática terminal.**

El soporte artificial en pacientes candidatos a TH y con falla hepática fulminante o terminal, tiene diversas fases iniciales como son el purificar la sangre por hemofiltración, plasmaferesis y el dispositivo bioartificial hepático. Este ultimo en sus diversas versiones tecnológicas están integradas por un grupo de hepatocitos colocados en filtros o celdas por donde se procesa la sangre en equipos similares a los empleados para hemodializar a los pacientes con insuficiencia renal, logrando llevar a cabo las funciones del hígado de manera temporal. Estos dispositivos se presentan como una posibilidad que mantiene la función hepática hasta el momento del TH, funciona como apoyo a los



pacientes cuando no se tiene disponibilidad inmediata de órganos; por lo que la función hepática se trata de mejorar, así como los niveles de amonio en los pacientes sometidos temporalmente a este tipo de terapia.<sup>78, 79</sup> A nivel clínico se ha empleado este apoyo artificial hepático externo, empleado hepatocitos de cerdo, en un estudio comparativo multicéntrico con 171 pacientes, demostrando la eficacia relativa en pacientes con falla hepática fulminante.<sup>80</sup> Dados los alentadores datos iniciales, varios grupos se encuentran estudiando la factibilidad de emplearse clínicamente y aun se encuentra pendiente un equipo idóneo para su uso.

En la muy amplia gama de factores que se relacionan en un trasplante de hígado, debemos tomar en cuenta la etiología de la enfermedad hepática, el tratamiento u opciones de mantenimiento previo al procedimiento quirúrgico, el tipo de procedimiento quirúrgico, incluyendo el trasplante celular de hepatocitos y el seguimiento posoperatorio. Consideramos fundamental en trasplantes el seguimiento y la sobrevida a corto, mediano y largo plazo, el potencial riesgo de rechazo agudo y crónico y la apropiada terapia con inmunosupresores, entre otros factores. Recientemente se ha publicado la sobrevida a largo plazo de pacientes trasplantados de riñón sin inmunoterapia y trasplantes de médula ósea, por lo que esta terapia modificada tal vez pronto la veamos en el TH.<sup>81</sup> Hemos tratado de incluir de manera general los principales factores asociados al TH en el esquema 1 para proporcionar nuestro punto de vista en una entidad que afecta a la población mundial y México no escapa de esta realidad.

## **Oxígeno, especies reactivas de oxígeno (ERO) y radicales libres (RL).**

Una de las etapas decisivas de la evolución de las especies en la tierra fue la incorporación del oxígeno a las funciones vitales haciendo más eficiente la obtención de energía de los alimentos. Los organismos aeróbicos manifiestan ventajas sobre los anaeróbicos. En última instancia el oxígeno es en los organismos aeróbicos el “basurero” de los electrones que intervienen en las múltiples reacciones de óxido-reducción del metabolismo celular. A las variadas ventajas de la presencia del oxígeno en la maquinaria celular hubo de aceptarse la toxicidad propia del oxígeno. Todos los organismos presentan manifestaciones de toxicidad cuando se mantienen en concentraciones de oxígeno mayores del 21%. La toxicidad de oxígeno se debe a que dada su elevada reactividad, con facilidad forma radicales libres.

Un radical libre (RL) se define como cualquier especie química capaz de tener existencia independiente y que contiene uno o más electrones no apareados. La toxicidad del oxígeno se debe a la formación de RL de oxígeno, los cuales por su reactividad reaccionan con muchas de las moléculas presentes en las células y alteran su funcionamiento. Entre los RL del oxígeno más frecuentes en la células se encuentran el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el hidroxilo ( $OH\cdot$ ), el peróxido ( $RO_2\cdot$ ), el alcoxilo ( $RO\cdot$ ) y el hidroxiperóxido ( $HO_2\cdot$ ).

En este tema con frecuencia se usa el término especies reactivas de oxígeno (ERO), en el cual se incluyen algunos de los RL del oxígeno, como el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $OH\cdot$ , así como otras moléculas que contienen oxígeno y que no son RL, las más comunes son el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ácido hipocloroso  $HOCl$ , el ozono ( $O_3$ ), el oxígeno singulete y el peroxinitrito ( $ONOO$ ).

También se usa el término oxidante para referirse a las ERO, su uso no es recomendable por que algunos de ellas, como el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $H_2O_2$  tienen propiedades oxidantes y reductoras.

### **Estrés oxidativo.**

Se ha denominado estrés oxidativo a una alteración en el balance entre compuestos prooxidantes – antioxidantes a favor de los primeros, que conduce a un daño potencial.<sup>82</sup>

En el concepto de estrés oxidativo como desequilibrio implica que en condiciones fisiológicas normales existe un equilibrio dinámico entre los compuestos prooxidantes y los antioxidantes. Los prooxidantes son producidos de manera continua por un lado, como productos secundarios de la respiración y del metabolismo oxidativo, por otro lado como compuestos relacionados con la señalización celular por ejemplo el  $H_2O_2$ . Los antioxidantes se encargan de su desaparición continua para mantener el equilibrio. La situación de estrés oxidativo puede presentarse, ya sea por que aumente la formación de pro-oxidantes más allá de la capacidad de los anti-oxidantes para eliminarlos, o bien, por que se mantenga constante la formación de pro-oxidantes y disminuya la cantidad o la capacidad de los sistemas anti-oxidantes para eliminarlos.

En el primer caso, cuando hay un aumento de pro-oxidantes, corresponde a una mayor generación de ERO, por ejemplo al exponerse a elevadas concentraciones de  $O_2$ , a lo observado en el hígado por una intoxicación por etanol, o a la fase de reperfusión en el proceso de isquemia reperfusión. El

segundo caso, el de la disminución de anti-oxidantes se observa en mutaciones que restrinjan la actividad de enzimas antioxidantes, por ejemplo la superóxido dismutasa, o en individuos que mantengan dietas carentes de anti-oxidantes por ejemplo las vitaminas C y E. En condiciones normales existe dos tipos de compuestos – prooxidantes y antioxidantes - , lo que le confiere elasticidad y reversibilidad a la situación.<sup>83</sup>

### Principales oxidantes, prooxidantes y antioxidantes celulares.<sup>83</sup>

#### OXIDANTES

- Peroxinitrito
- Radical Hidroxilo
- Radical alquilo
- Radical peroxilo
- Radical alcoxilo
- Hidroxiperóxidos orgánicos
- Oxígeno singulete

#### PROOXIDANTES

- Radical superóxido
- Peróxido de hidrógeno
- Óxido nítrico
- Ubisemiquinona

## ANTIOXIDANTES

### **Enzimáticos:**

- Superóxido dismutasa (Mn-SOD y Cu, Zn-SOD)
- Catalasas
- Glutación peroxidasas (Se-dependiente y Se-independiente)

### **No Enzimáticos:**

- Glutación reducido
- Alfa tocoferol
- Ácido ascórbico.

Cuando no se establece el equilibrio la situación puede llegar a ser mortal,<sup>84</sup> en este sentido los aumentos en los niveles de ERO dentro de la célula tiene consecuencias directas e indirectas que pueden dar lugar a apoptosis o a necrosis,<sup>85</sup> alteraciones del tipo de la carbonilación de proteínas que dan como resultado una deficiente calidad y funcionalidad de las proteínas, deterioro celular y senescencia.<sup>86</sup>

En general la presencia del estrés oxidativo desempeña un papel significativo en la etiología y/o la progresión de varias enfermedades humanas, tales como enfermedades cardiovasculares (ateroesclerosis, las complicaciones de largo plazo de la diabetes)<sup>87</sup>, enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson e isquemia cerebral) y sepsis.<sup>88-91</sup>

Los sistemas de defensa antioxidantes alterados o no regulados apropiadamente debido a la enfermedad, y/o al resultado del envejecimiento, pueden llevar al estrés oxidativo, lo que ocasiona que los carbohidratos, las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos se oxiden debido a mayor

generación de radicales libres modificando así su estructura y función.<sup>92</sup> En los antioxidantes en los padecimientos previamente descritos, estos se encuentran disminuidos o desaparecen progresivamente.

### **Carbonilación de proteínas.**

La carbonilación de proteínas es una de las consecuencias del estrés oxidativo debido a un exceso en la presencia de RL cuya generación aumenta, por ejemplo, por la ingesta exagerada de etanol o por la isquemia reperusión. En este último caso la producción creciente de RL que reaccionan y que oxidan las cadenas laterales de la lisina, de histidina, y de los residuos de la cisteína, llevando a cabo la carbonilación en las proteínas.<sup>93</sup> Lo anterior da por resultado la modificación extensa de la proteína que lleva a la alteración de la función.<sup>94</sup>

Todas las proteínas poseen grupos carbonilos en su estructura, sin embargo, dichos grupos carbonilos no son de interés en relación al estudio del estrés oxidativo, siendo la formación de carbonilos de los residuos laterales de los aminoácidos presentes en las proteínas es la que resulta de interés por que las inactivan funcionalmente. Mientras mayor se el estrés oxidativo y mayor sea la presencia de RL, será mas extensa la formación de nuevos grupos carbonilo en las proteínas y de mayor magnitud la lesión celular. En los seres vivos en general encontramos mayor cantidad de proteínas en relación a los lípidos, y éstas cuentan con funciones más especializadas, por lo tanto, su carbonilación e inactivación es más grave que la lipoperoxidación de los lípidos y medición mediante TBARS.<sup>95</sup>

Recientemente se ha trabajado para ofrecer un manejo farmacológico a la carbonilación de las proteínas mediante agentes secuestradores de

compuestos generadores de grupos carbonilos y biomarcadores de daño oxidativo<sup>91, 93</sup>

Existen diversos métodos de para identificar los grupos carbonilos en las proteínas. El más sencillo consiste en la determinación colorimétrica haciendo reaccionar la proteína carbonilada con un compuesto que al reaccionar con un grupo carbonilo da origen a un derivado con color y que la intensidad del color sea proporcional a la cantidad de grupos carbonilos de la proteína. El compuesto más usado ha sido la 2,4 dinitrofenil hidrazina.

Más adelante se desarrollaron métodos inmunológicos, de manera que el anticuerpo primario identificará la fenil hidrazina unida al grupo carbonilo perteneciente a cada uno de los radicales de aminoácidos presentes en la proteína. La ventaja de un método así es que puede orientar hacia la identificación de la proteína carbonilada y si se realiza en análisis histológico brinda la imagen del tejido y del grupo celular más afectado por la carbonilación de proteínas, el cual a su vez es el grupo celular con mayor estrés oxidativo y más elevada poza de ERO.

En este sentido se han realizado estudios experimentales y clínicos en enfermedades como el Alzheimer,<sup>96</sup> de donde tomamos la técnica empleada en el presente trabajo de tesis en biopsias hepáticas.

### **AINE's e inhibidors la enzima ciclooxigenasa (COX).**

La ciclooxigenasa (COX) o prostaglandina endoperóxido-sintetasa (PGH-sintetasa) es la enzima que cataliza la transformación del ácido araquidónico (AA) a prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Los productos derivados del metabolismo del AA son denominados de forma colectiva eicosanoides.<sup>97</sup> El primer paso en la producción de eicosanoides es la liberación del AA de la membrana fosfolipídica por la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) en respuesta a diferentes estímulos (bradicinina, angiotensina II, trombina, histamina, leucotrienos, citocinas, factores de crecimiento) y la fosfolipasa C, que cataliza la formación de AA y glicerol a partir de los fosfolípidos liberados de la membrana celular. La actividad de las fosfolipasas es el paso limitante que condiciona la velocidad de síntesis de los eicosanoides. Una vez liberado, el AA puede volver a la membrana para integrar un fosfolípido, difundir al medio extracelular, o ser metabolizado por diferentes sistemas enzimáticos como COX, lipoxigenasa y citocromo P-450, que catalizan la síntesis de prostaglandinas (PG), leucotrienos y productos derivados de la vía de la epoxigenasa, respectivamente.<sup>97, 98</sup> Estos compuestos afectan a múltiples vías de señalización intracelulares que modulan un amplio espectro de funciones fisiológicas como la inflamación, la ovulación, la respuesta inmunitaria y la mitogénesis.<sup>97, 99, 100</sup>

La PGH-sintetasa posee dos actividades catalíticas, la primera denominada ciclooxigenasa, que produce un endoperóxido intermedio denominado PGG<sub>2</sub>, sobre el cual actúa la segunda actividad catalítica que es una peroxidasa y lo transforma en PGH<sub>2</sub><sup>99</sup>.



A partir de la  $PGH_2$ , por acción de diferentes endoperóxido isomerasas se sintetizan la prostaciclina ( $PGI_2$ ),  $PGD_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_2$  y los tromboxanos, dependiendo de los sistemas enzimáticos presentes en los diferentes tipos celulares.<sup>101</sup>

Las PG ejercen su acción a nivel intracelular, a través de receptores nucleares como los de clase PPAR (receptores de activación de la proliferación peroxisomal), que actúan como factores transcripcionales tras la unión al ligando, o como mediador paracrino, donde su acción es consecuencia de la interacción con diversos receptores de las membranas celulares asociados a proteínas G.<sup>101</sup> En la mayoría de los casos, la interacción con su receptor desencadena la activación del sistema adenilil ciclasa, con el aumento de AMPc, o de la fosfolipasa C y el consiguiente incremento de la concentración de calcio intracelular y de diacilgliceroles.<sup>101</sup>

Los eicosanoides se producen en casi todas las células; por tanto, están involucrados en la mayoría de las funciones orgánicas.<sup>102</sup> En el caso de los productos derivados de la acción de la COX, intervienen en las siguientes funciones importantes: el proceso inflamatorio produciendo vasodilatación, aumento del flujo sanguíneo local y de la permeabilidad vascular; la génesis de la fiebre en el sistema nervioso central y de la hiperalgesia localizada al sensibilizar las fibras nociceptivas del sistema nervioso periférico; en la inhibición de la agregación plaquetaria a través de la acción de la prostaciclina; en la respuesta inmunitaria ejercen una acción reguladora con inhibición de la proliferación y función de los linfocitos. En la función renal, con modulación del tono vascular y de la homeostasis del sodio y agua a través de la regulación de

la hemodinámica glomerular, reabsorción de sodio y agua tubular y de la secreción de renina. En el tracto gastrointestinal sus acciones más características a nivel gástrico son el aumento del flujo sanguíneo, de la producción de moco y bicarbonato y efectos protectores frente a agentes lesivos sobre la mucosa. En el intestino tienen un papel en la regulación de la motilidad gastrointestinal y de la secreción.<sup>103</sup> Además ejercen otras importantes funciones en el árbol bronquial, en el metabolismo óseo, en órganos endocrinos y en los sistemas reproductores masculino y femenino.<sup>102</sup>

### **Isoenzimas de la COX.**

En 1989 se identificó una segunda isoforma de la enzima COX con una estructura muy similar pero con una diferencia sustancial en cuanto al patrón de expresión y su biología.<sup>104, 105</sup> La isoforma COX-1 se expresa de forma constitutiva en prácticamente todos los tejidos, lo que indica que su función principal es la producción de PG para la regulación homeostática. En cambio, la isoforma COX-2 es inducible y, en condiciones basales, sus concentraciones son prácticamente indetectables. Sin embargo, en respuesta a diversos estímulos como lipopolisacáridos, interleucina 1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), endotoxina y estrés oxidativo, entre otros, se produce un aumento de su expresión y de la producción de PG y tromboxano.<sup>105, 106</sup> Se ha observado que el cerebro, la mácula densa renal y la placenta expresan COX-2 de forma constitutiva, y por tanto también puede desempeñar en ciertas células un papel importante en procesos fisiológicos.<sup>107</sup>

El gen de la COX-2 está localizado en el cromosoma 1 y el de la COX-1 se halla en el cromosoma 9. El promotor del gen de la COX-2 contiene una caja TATA y sitios de unión para diferentes factores de transcripción, como el factor nuclear B (NF- $\kappa$ B) o el factor nuclear para la expresión de interleucina 6 (NF-IL-6), que están implicados en la inducción de COX-2 en respuesta a diversos estímulos.<sup>104, 107</sup>

La estructura tridimensional obtenida mediante cristalografía por rayos X es idéntica entre ambas isoformas de COX, al igual que su actividad catalítica y su inhibición por parte de los antiinflamatorios no esteroideos. La COX-2 posee un peso molecular de 71 kD y está formada por unos 600 aminoácidos, compartiendo un 63% de su secuencia con la COX-1. Los residuos del canal de unión con el ligando, los sitios catalíticos y residuos inmediatamente próximos son idénticos salvo por dos posiciones (Ile por Val en posiciones 434 y 523);<sup>104, 108</sup> a su vez, existen diferencias en sus terminaciones NH<sub>2</sub> y COOH.<sup>97</sup>

Mientras que la localización celular de la COX-1 se restringe al retículo endoplásmico, la COX-2 se distribuye tanto en la región perinuclear, superficie interna de la membrana nuclear, así como en el retículo endoplásmico, por lo que los eicosanoides producidos se distribuirán preferentemente por el núcleo, respecto a las PG producidas por la COX-1, y por tanto ejercerán acciones moduladoras sobre la transcripción de genes.<sup>97</sup>

La COX-2, como se ha comentado previamente, no es detectable en condiciones basales en la mayor parte de los tejidos de mamíferos, pero su expresión es rápidamente inducible por factores de crecimiento, promotores tumorales, hormonas, endotoxina bacteriana y diversas citocinas. La regulación

de su expresión se produce por diferentes vías, tanto a nivel transcripcional (caja TATA) como postranscripcional, sobre el ARN mensajero (ARNm).<sup>107</sup>

Derivado de lo anteriormente expuesto, se ha planteado que la COX-1 y la COX-2 son sistemas de síntesis de PG parcialmente independientes. La COX-1 produce prostanoïdes con acción extracelular para o autocrina que actúan en la regulación de la homeostasis del medio, mientras que la COX-2 tendría dos funciones; la primera, en relación con su localización en el retículo endoplásmico, sería la de colaborar en el aumento de la función de COX-1, y la segunda, propia de la COX-2 localizada en la superficie interna de la membrana nuclear, sería la de actuar como un sistema de producción de PG con acción nuclear en la replicación y diferenciación celular.<sup>107</sup>

## Introducción al trabajo de tesis publicado.

La lesión por isquemia reperfusión (IR) ocurre cuando un tejido u órgano recibe temporalmente un aporte sanguíneo inapropiado para mantener sus funciones vitales, se asocia a eventos como las cirugías del hígado, especialmente en el trasplante, resecciones hepáticas y en el estado de choque hemorrágico secundario a trauma.<sup>3, 109, 110</sup> El daño oxidativo generado durante estos procedimientos, se caracteriza por un complejo conjunto de reacciones metabólicas las cuales incluyen un incremento en las especies de oxígeno reactivas (EOR),<sup>11, 111</sup> y en los mediadores de la respuesta inflamatoria<sup>112, 113, 114</sup> todo lo cual ocasiona daño celular, apoptosis, necrosis y eventualmente falla orgánica.<sup>12, 38</sup>

Durante la fase de reperfusión se genera un exceso de las EOR, las cuales pueden afectar todas las moléculas esenciales para la homeostasis del organismo, como son proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN.<sup>115-117</sup> Con base en lo anterior se ha demostrado la existencia y operación de varios sistemas celulares, especialmente activos en el hígado, responsables de la generación de un exceso de ERO en la etapa de reperfusión, tal vez el más importante sea la generación de ERO a través de la actividad de la NADPH oxidasa de las membranas de las células de Kupffer (KC) y neutrófilos.<sup>118</sup> Un segundo mecanismo es la conversión de la enzima xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa<sup>119, 120</sup> que genera el radical superóxido<sup>121</sup>, una EOR muy activa. La tercera fuente de ERO podría estar ligada a la actividad mitocondrial en las células afectadas<sup>120</sup>. Desde el punto de vista morfológico, la sobreproducción de ERO afecta el parénquima hepático, hay activación de las CK, se visualiza

alteraciones vasculares, con activación y migración de polimorfonucleares (PMN), con cambios consecuentes en la permeabilidad de las mitocondrias, activando la vía apoptótica, y la necrosis, como estadio final.<sup>122-125</sup>

Entre los mediadores de la inflamación que también aumentan durante la IRH se encuentran las prostaglandinas (PGs), y los tromboxanos (TXs).<sup>97</sup> Ambos son derivados primariamente del ácido araquidónico, las PGs están compuestas por ácidos grasos de 20 carbonos, entre sus características farmacológicas, se ha comprobado que disminuye la migración de polimorfonucleares, mejoran la estabilidad de la membrana celular, y optimizan el metabolismo de la insulina y los lípidos,<sup>126, 127</sup> regulan moléculas de adhesión celular y promueven la proliferación del hepatocito. Por otro lado los TXs tienen un efecto opuesto a nivel celular provocando mayor migración del PMN, estasis vascular y trombosis.<sup>128</sup> Existen inhibidores selectivos de la enzima Ciclooxigenasa de tipo I (COX-1) y tipo II (COX-2),<sup>97</sup> que pueden resultar una alternativa en la disminución del estrés oxidativo, dado su efecto como “secuestrador” de EOR.<sup>129</sup> Recientemente se han estudiado en el tratamiento del cáncer, además de poseer su conocido efecto antiinflamatorio.<sup>97, 103, 130-132</sup>

Las EOR participan en el daño por isquemia reperusión, dichas EOR, en especial las que adicionalmente son RL, se caracterizan por su vida media muy corta, y son elusivas para medir su existencia como tal en los tejidos.<sup>133</sup> Hasta este momento, la única opción es hacerlos reaccionar con otro radical libre y detectar su presencia por la resonancia paramagnética (EPR) que poseen.<sup>103, 131, 134</sup>

Un factor a favor de esta propuesta son nuestros estudios anteriores, en que se demostró una acción beneficiosa de aspirina, naproxen, nimesulide, y

piroxicam en modelos alternativos en la generación hepática del ROS, tales como la intoxicación aguda por etanol: los AINES previenen el aumento en los lípidos, sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS),<sup>1</sup> y una disminución del glutatión después de una ingesta de etanol.<sup>135-138</sup> Así mismo, los AINES usados protegen contra el aumento en el catabolismo de proteínas ocasionado por la ingesta aguda de etanol.<sup>1</sup> Un renglón original de nuestro estudio fue ubicar en el conjunto de distintas estirpes celulares del hígado, cuales son aquellas que inicialmente responden al proceso de isquemia reperfusión con un aumento en sus RL, monitoreado éste por la carbonilación de sus proteínas en el seno celular. Además interesaba saber el curso temporal de dicha alteración y el efecto del piroxicam y meloxicam en la respuesta a la agresión. Para ello era indispensable identificar plenamente las principales células hepáticas, así como precisar en cuales de dichas células se localizaba una mayor carbonilación de proteínas. El abordaje para resolver el reto fue por medio de inmunohistoquímica.<sup>96</sup>

**Planteamiento del Problema.**

La lesión por isquemia-reperfusión es un evento que se presenta cuando un tejido es sometido a isquemia, el cual posteriormente al restablecerse el flujo sanguíneo y ser reoxigenado, promueve la formación de EOR, compuestos que al estar en exceso son nocivos para la célula. Este proceso de IR es inevitable en la procuración de órganos para trasplantes, y además se observa en multitud de situaciones patológicas como son la lesión isquémica, el infarto, la estenosis o bloqueo total del aporte arterial y/o venoso, el trauma hepático, diversos procedimientos quirúrgicos y la intoxicación por etanol.

**Justificación.**

Debido a que la lesión por isquemia-reperfusión es un evento común en una gran cantidad de entidades nosológicas que incide sobre la evolución de los enfermos, es indispensable identificar nuevas alternativas terapéuticas que permitan proteger o disminuir la lesión tisular durante este evento.

**Hipótesis Alterna.**

La administración de Meloxicam ó Piroxicam durante la lesión por IRH, disminuirá la presencia de EOR y sus efectos secundarios a nivel local y sistémico.



**Hipótesis Nula.**

La administración de Meloxicam ó Piroxicam, durante la lesión por IRH, no disminuirá la presencia de EOR, ni sus efectos secundarios a nivel local y sistémico.

**OBJETIVO GENERAL.**

El objetivo del presente estudio fue ampliar la caracterización de las lesiones hepáticas, en particular por medio de la carbonilación de proteínas, y evaluar el efecto de los inhibidores COX-1 (Piroxicam)<sup>139</sup> y COX-2 (Meloxicam)<sup>140</sup> sobre el estrés oxidativo ocasionado en un modelo experimental de isquemia caliente y reperfusión hepática, durante el curso temporal en 24 horas.

**Objetivos específicos.**

1. Determinar el efecto de la IRH en los niveles séricos de las enzimas hepáticas de escape como la ALT, AST, OTC y DHL y el efecto observado con la aplicación de inhibidores de la COX-1 y la COX-2.
2. Precisar mediante la resonancia paramagnética el efecto del piroxicam meloxicam en los RL presentes en bilis de ratas sometidas a un modelo de IRH.
3. Evaluar la participación de los AINE's meloxicam y piroxicam abatiendo la carbonilación de proteínas y el aumento en TBARS, debidos a la generación hepática de EOR en un modelo experimental de IRH.
4. Identificar el grupo celular hepático más propenso a la carbonilación de proteínas de acuerdo a la evolución del fenómeno de IRH.

5. Caracterizar el efecto de la administración de meloxicam y piroxicam en el parénquima hepático por medio de técnica histológica con hemotoxilina y eosina después de someter el hígado a isquemia caliente y reperfusión.
6. Identificar las células en proceso de apoptosis en el modelo de IRH y el efecto observado con la aplicación de inhibidores COX-1 y COX-2.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **Animales y grupos de estudio.**

Posterior a la aprobación del proyecto por las comisiones de ética y del comité para el manejo y cuidado de animales de laboratorio del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, se emplearon ratas Wistar, con un peso entre 250-300 g, alimentadas con dieta comercial estándar (Purina, México) y agua *ad libitum*, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, y un control de temperatura constante de 22 °C. Los procedimientos quirúrgicos se realizaron en un horario inicial de las 08:00 a 16:00, en el laboratorio de cirugía experimental del Departamento de Cirugía, de la Facultad de Medicina de la UNAM

Las ratas fueron asignadas aleatoriamente en cuatro grupos de estudio (n=10) por tiempo estudiado.

**Grupo 1) Sham o simulado (S):** Tratados bajo previa anestesia y laparotomía (procedimiento quirúrgico para abordar la cavidad abdominal) sin pinzamiento vascular portal, ni aplicación de algún medicamento.

**Grupo 2) Isquemia Reperusión Hepática (IRH):** Previa anestesia, laparotomía y sometido a isquemia caliente parcial y reperusión hepática sin aplicación de medicamento.

**Grupo 3) COX-1:** Se aplicó 1 h previa a la cirugía, por vía intraperitoneal, un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), caracterizado por ser un inhibidor de la

enzima ciclooxigenasa tipo I (**COX-1:piroxicam**, Senosiain, México), 13mg/kg, posteriormente se aplica anestesia, laparotomía y el hígado es sometido a isquemia caliente parcial y reperfusión hepática.

**Grupo 4) COX-2:** Se realizó el mismo procedimiento del grupo 3, pero se aplicó un AINE, inhibidor de la enzima ciclooxigenasa tipo II (**COX-2: meloxicam**, Boehringer Ingelheim, Alemania), 0.9mg/kg.

En los grupos 2, 3 y 4 el tiempo de isquemia caliente parcial fue de 90 minutos, con toma de muestras en el periodo de reperfusión a las 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 12, y 24 hs respectivamente.

#### **Procedimiento Quirúrgico.**

Después de 12 horas de ayuno, con agua *ad libitum*, bajo anestesia con xylazina (100 mg/kg) y ketamina (13 mg/kg.), las ratas se colocaron en posición decúbito dorsal, previa tricotomía, se realizó incisión media abdominal, abordando la cavidad peritoneal por planos con tijera, se empleó electrocauterio para la hemostasia (Ethicon-USA). Se movilizaron los intestinos hacia la derecha, y se identificó la tríada portal (arteria hepática, conducto hepático y vena porta), se colocó una pinza o clamp microvascular (Aesculap, Alemania), interrumpiendo el flujo hepático portal de manera parcial, para evitar la congestión esplácnica. El tiempo de isquemia caliente fue de 90 minutos, transcurrido éste período se retiró la pinza vascular y se verificó el período de reperfusión, se realizó hepatectomía parcial de los lóbulos hepático bien perfundidos y se mantuvo a la rata con los lóbulos sometidos a isquemia.

Durante todo el procedimiento, los animales se mantuvieron hidratados con solución salina 0.9% a 36 °C por vía peritoneal a un flujo de 15 ml/kg/h, posteriormente se colocaron un colchón térmico neonatal (Johnson & Johnson, USA.) a 36.5 °C para evitar la hipotermia.

Durante el periodo de reperfusión se tomaron las muestras de biopsias hepáticas del mismo lóbulo en todas las ratas, las muestras sanguíneas se tomaron con una jeringa de insulina a nivel de las venas suprahepáticas, es decir, posterior al paso hepático de la circulación intestinal y las muestras de bilis directamente del conducto hepático común o colédoco. Al término de los tiempos establecidos de estudio se cerró la cavidad por planos con poliglactina 910, vicryl 5-0 (Davis, USA). Se mantuvo en observación a las ratas durante el postoperatorio mediato y posteriormente llevadas al bioterio. Se observaron a 2 ratas por grupo para medir sobrevida por un período de 6 meses, los datos de estas ratas no fueron incluidos en el presente estudio.

### **Estudio de las enzimas séricas hepáticas.**

Se obtuvo sangre de las venas suprahepáticas con una jeringa de 1 ml para aplicación de insulina, al término del período de reperfusión en cada grupo y tiempo seleccionado. Dicha enzimas fueron: alanino aminotransferasa (ALT)/(TGP), aspartato aminotransferasa (AST)/(TGO), deshidrogenasa láctica (DHL) y ornitincarbamiltransferasa (OTC). Cada muestra se colocó en un tubo Eppendorf (Beckton-Dickinson-México), se centrifugó a 5,000 RPM por 5 minutos, se obtuvo el suero con pipeta Pasteur y en nuevos tubos Eppendorf, se procesaron de acuerdo a las técnicas descritas para medir enzimas de

escape hepáticas<sup>37, 141</sup> por medio de un kit y reactivos de Bayer, México. La determinación de OTC se realizó mediante el método de Ceriotti.<sup>141</sup>

### **Estudio histopatológico.**

La estrategia de las tinciones que se utilizó consiste en lo que se ha definido como la rutina de evaluación de daño hepático, como son las tinciones con hematoxilina y eosina (H y E), Masson, PAS (Periodic Acid-Schiff) con y sin diastasa. Para fines del presente estudio se presentan los resultados con H y E. El estudio del daño hepático se evaluó en función de la afección acinar y/o lobulillar que ha sido bien caracterizada para hepatitis de curso agudo, subagudo y crónico y lesión isquémica hepática<sup>142, 143</sup>

Para su conservación y fijación se empleó solución de formol al 10% e inclusión en parafina. Se evaluaron las variables descritas previamente como necrosis hepatocelular, congestión y ectasia vascular, tipo y cantidad de infiltrado inflamatorio, etc. La determinación fue en un mínimo de 10 espacios porta, escogidos aleatoriamente. Utilizamos una escala convencional: mínimo (<25%), moderado (25-50%) y severo (>50%).

### **Técnica de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS).**

Después de la laparotomía se obtuvo mediante sección con bisturí una muestra de hígado de aproximadamente 0.5 g que se colocó en un homogenizador vidrio-silicón. Se realizó un homogenado tisular en una solución de buffer con fosfatos (pH 7.4) a una relación biopsia-buffer 1:3.

Se filtró a través de una gasa y el filtrado se colocó en incubación a 37 °C y agitación por 30 min. Se le agregó ácido acético (Sigma-Aldrich, México) al 20% y ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich, USA) al 0.8%, previamente disuelto en buffer de fosfatos. Se colocó a ebullición por 45 minutos para completar la reacción química cubriendo los tubos de ensayo con canicas para evitar la evaporación. Al término se adicionó KCl al 2%, butanol-piridina (Sigma-Aldrich, México) en una relación 15:1, se agitó y centrifugó a 5,000 RPM por 15 minutos. Se separaron dos fases, la superior de color rosa, se transfirió a una celdilla de espectrofotómetro (Modelo Beckman 650, Alemania), y la muestra se leyó a 432 nm. Se realizó una determinación de proteínas con el método de Bradford para poder expresar los valores de TBARS en hígado por mg de proteína.<sup>135, 144-146</sup>

### **Resonancia Paramagnética (EPR).**

Durante la disección de la tríada portal, se colocó un catéter PE-23 de silicón (Becton Dickinson & Co, Sparks, MD, USA) en el conducto hepático común 5 minutos antes de iniciar la reperfusión mediante microcirugía. Al término del período de reperfusión (90 min), se retiró el clamp vascular de la tríada portal, y en todos los grupos de estudio se colectó la bilis por un lapso de 2 horas. Previamente se inyectó por la vena porta el atrapador de RL, alpha-(4-piridil 1-oxido)- N-t-butilnitrona (PBN), 500 mg/kg., disuelto en dimetil sulfoxido (DMSO). Que formará un complejo paramagnético con los RL generados en las células. La bilis se colectó en tubos de Eppendorf y congeló a -70 °C hasta su análisis mediante EPR (e-Line century Series from Varian, USA), en celdas planas de cuarzo (modelo WG-812, Wilmad-Lab Glass, USA), bajo las

siguientes características físicas: ganancia,  $5 \times 10^4$ ; modulación de amplitud, 2.0 G; modulación de frecuencia, 100 kHz; microondas a 2 mW; constante de tiempo de 0.5 min; tiempo de barrido, de 4 minutos. Se tomaron 10 trazos por muestra analizada, obteniendo un patrón promedio. (No hubo cambios en la intensidad de la señal durante el estudio), se empleó un osciloscopio modelo Agilent 54622A (Agilent, USA) y mediante un procesador de Excel microsoft se recopilaron los datos.

### **Detección de proteínas carboniladas por inmunohistoquímica.**

Se estudió por medio de una reacción de inmunohistoquímica (IHQ), con la técnica del complejo biotina-estreptavidina/peroxidasa. Las muestras de hígado se fijaron en etanol por 2 horas y posterior inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 2 y 3 milímetros, para la inmunotinción, esta se realizó con la técnica del polímero marcado, usando el sistema de detección EnVision HRP+, (Dako Corporation, Carpintería Calif. USA). Se utilizó 2,4 dinitrofenilhidrazina (Sigma Chemical-USA) al 0.1% en HCl 2 N para que reaccionara con los residuos carbonilo de las proteínas, la fenil hidrazona formada constituyó el sitio de unión del anticuerpo. Para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, las muestras fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 0.3% en medio acuoso por 5 minutos, para eliminar los sitios de unión inespecíficos. Las muestras fueron tratadas con albúmina sérica bovina al 1% en PBS por 5 minutos, posteriormente la muestra se incubó por 45 minutos con el anticuerpo monoclonal anti-DNP 1:100 (Zymed, USA), después con el polímero conjugado con peroxidasa y anticuerpo secundario antiratón por 30 minutos.



Para visualizar la reacción se utilizó como sustrato 3,3'-deaminobencidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dako Corporation, Carpintería Calif. USA). Como control negativo se utilizó suero normal de ratón en PBS, que se agregó en lugar del anticuerpo primario. Todo el tejido se analizó por IHQ. La interpretación de positivo y negativo fue de acuerdo a los criterios estándares que incluyen, afinidad tintorial en más del 10% de la población celular con inmunolocalización específica (tinción de membrana), evaluando en cruces la intensidad de la tinción: + débil, ++/+++ moderado, ++++ intenso.<sup>96, 147, 148</sup>

Para el montaje y la estandarización de la técnica se realizó un control positivo reproduciendo la técnica de carbonilación en tejido<sup>96</sup> en una muestra de cerebro humano con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer. Dicha biopsia fue una donación oficial del Dr. Jesús D. Rembao Bojórquez, Jefe del Departamento de Patología, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. "Dr. Manuel Velasco Suárez". México.

### **Immunohistoquímica para determinar la extirpe celular por medio de CD34 (células endoteliales) y CD68 (células de Kupffer).**

Para la identificación del extirpe celular de las biopsias hepáticas, ésta se realizó por medio de la técnica de inmunohistoquímica, específicamente para observar mediante el complejo biotina-estreptavidina/peroxidasa, a las células endoteliales y células de Kupffer mediante CD34 y CD 68 respectivamente. En base a los hallazgos encontrados en la carbonilación de proteínas, y con la inmuno localización de las células hepáticas mediante CD 34 yCD 68, se puede diferenciar el tipo celular afectado.

La técnica consistió en realizar cortes en tejido hepático de 2 milímetros tratadas con citrato de sodio 0.1M (pH 6.0) y Tween 20. Para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, las muestras fueron procesadas con peróxido de hidrógeno al 0.3% en PBS por 5 minutos, con el objeto de eliminar los sitios de unión inespecíficos. En este estudio se emplearon anticuerpos monoclonales contra CD34 (clona QBEnd 10) (DAKO), dilución 1:50), incubados por 45 minutos con anticuerpo primario, al término las muestras se incubaron por 30 minutos con un anticuerpo biotinilado antiratón/anticonejo con el complejo estreptavidina/peroxidasa (LSAB + Labeled streptavidine-Biotin HRP, DAKO). Para visualizar la reacción se utilizó 3,3'-diaminobenzidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y lavados con amortiguador PBS for 4 minutos. Después los cortes se incubaron con anticuerpo CD68 (clone PG-M1, DAKO), dilución 1:150), posteriormente se incubaron con el anticuerpo biotinilado antiratón/antiratón y con el complejo alcalino estreptavidina/fosfatasa por 30 min (LSAB + Labeled streptavidine-Biotin PA, DAKO). Para visualizar los productos de la reacción se empleó como sustrato nueva fucsina (Biogenex, CA, USA). Finalmente los cortes fueron teñidos con solución Gill de hematoxilina. Se emplearon muestras de tejido hepático normal como control positivo; y como control negativo se utilizó amortiguador PBS para sustituir los anticuerpos primarios.

#### **Estudio de Apoptosis mediante microcopio de luz con técnica de TUNEL. (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling).**

Para el estudio de apoptosis en las biopsias hepáticas, se realizó la detección de los fragmentos de ADN por la técnica *in situ* de TUNEL mediante

microscopio de luz. Los cortes histológicos fueron procesados con un kit denominado ApopTag *in situ* apoptosis detection kit (Intergen Co., USA). Se realizó el proceso de acuerdo a las instrucciones del laboratorio fabricante. El tejido hepático fue previamente tratado con proteinasa K y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, posteriormente incubado con la reacción conjunta de deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y la digoxigenina-conjugada dUTP por una 1 h a 37°C. Se observó el ADN marcado mediante el anticuerpo HRP-conjugado anti-digoxigenina con diaminobenzidina como cromógeno. Como control negativo, la enzima TdT se excluyó de la reacción previa. Para el estudio histológico se evaluaron 10 espacios porta de forma aleatoria, por grupo y tiempo de reperfusión de acuerdo a la técnica descrita por Corona-Morales.<sup>149</sup> Se contaron los núcleos teñidos en color café oscuro, considerándose positivos para la técnica de TUNEL.

### **Estadística.**

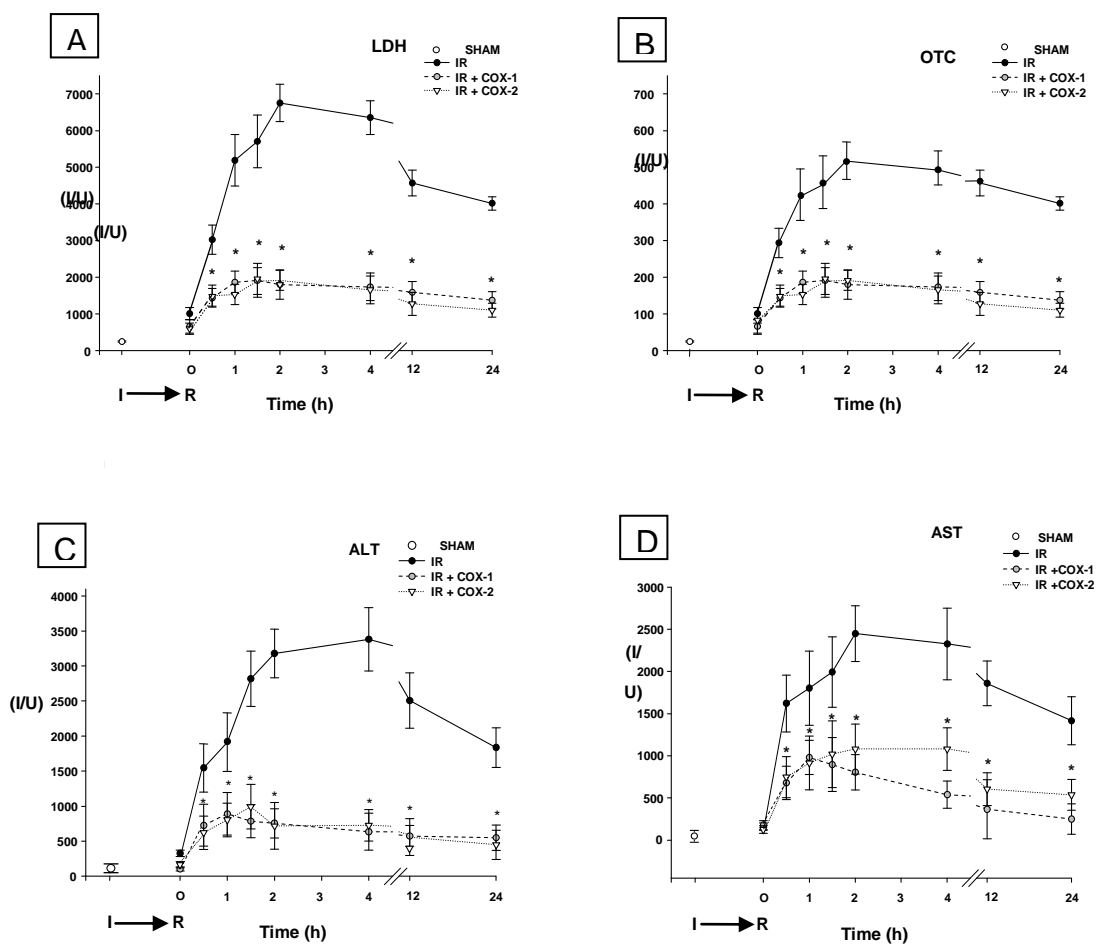
Se empleó la prueba estadística de Kruskal Wallis, para valorar si existen diferencias estadísticas entre los grupos de estudio. Al identificarse que existen diferencias estadísticas (DE) se aplicó la prueba de Mann Whitney para comparar los grupos de estudio. Se consideró estadísticamente significativo cuando se obtuvo un valor de  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS.**

### **Actividad sérica de las enzimas hepáticas.**

En el presente trabajo, estudiamos 6 diferentes indicadores del daño hepático producido por isquemia reperusión, pero de los parámetros estudiados, solamente las determinaciones séricas de las enzimas hepáticas se utilizan de manera rutinaria o comúnmente en la práctica clínica, con excepción de la OTC que requiere por el momento un estudio más especializado no disponible en todos los centros hospitalarios. Por lo tanto, iniciaremos descripción de los resultados con el análisis de las enzimas hepáticas, que monitorizamos desde el inicio de la fase de isquemia hasta las 24 horas posteriores a la reperusión.

En el grupo 1 o sham se observan los valores séricos de las enzimas hepáticas dentro de rangos normales, a diferencia de los resultados obtenidos, en todos los grupos experimentales a partir de los primeros 30 min de iniciada la fase de reperusión, (Figuras 8A-8D). El patrón en los cambios fue muy similar en las enzimas hepáticas localizadas a nivel citosólico en el hepatocito como son la ALT, AST y LDH, en comparación a la enzima localizada a nivel mitocondrial como lo es la OTC. Ambas drogas, piroxicam ó meloxicam, limitan la liberación de dichas enzimas de escape a nivel hepático como se observa todos los tiempos del período de reperusión desde los 30 min hasta las 24 h. (Figura 8).

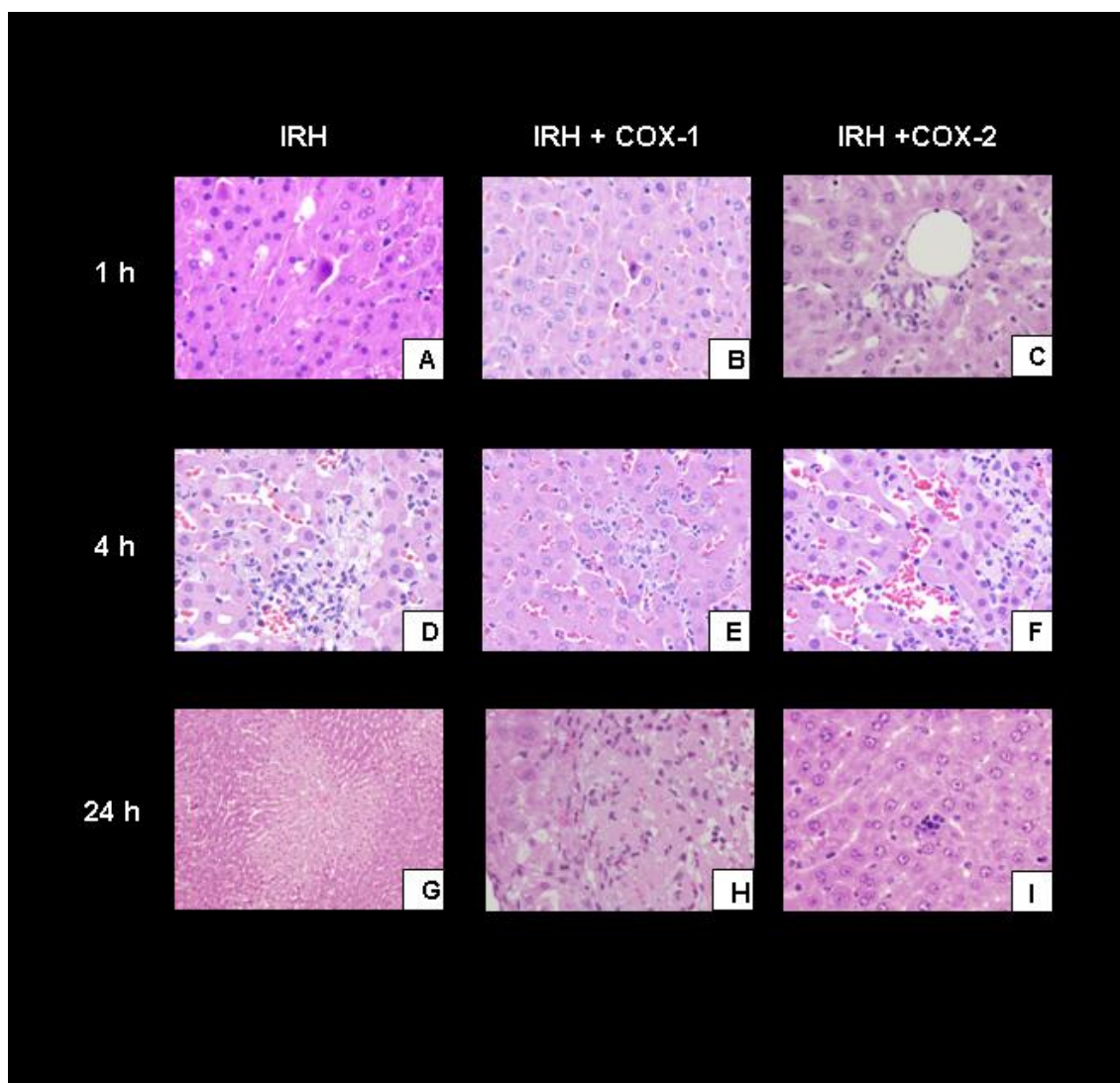


**Figura 8.** Determinación sérica de las enzimas provenientes del hígado.

Se presenta la actividad de las enzimas DHL (**A**), OTC (**B**), ALT/TGP (**C**) y AST/TGO (**D**) en un curso temporal de 24 horas posterior al evento de isquemia hepática. Existen DES entre el grupo sometido a IRH, en comparación a los grupos tratados con inhibidores COX-1 ó COX-2, en los tiempos marcados con un asterisco \* ( $p < 0.05$ ).

### **Cambios histológicos.**

Los hallazgos histológicos en las biopsias hepáticas corresponden a los cambios observados previamente en los tejidos sometidos a IR. Durante el período de isquemia parcial por 90 minutos en los grupos 2, 3 y 4 no se observaron cambios morfológicos en ninguna de las variables estudiadas como pudieran ser la presencia de células inflamatorias, daño en la microcirculación (estasia) o evidencia de necrosis. Estos datos fueron muy similares en los cortes del grupo Sham o simulado a lo largo del estudio morfológico en 24 horas. No se incluyen fotografías en estos casos dado que no se observaron cambios. Sin embargo al final de la primera hora de reperfusión en el grupo 2, sometido a IRH sin aplicación de algún medicamento, se evidenció la presencia focal de cuerpos apoptóticos, edema y congestión (Figura 9A). Estos hallazgos se encontraron en el grupo tratado con piroxicam a los 120 minutos y en grupo tratado con meloxicam a las 4 horas de reperfusión; momento en el que se visualiza la mayor presencia de células inflamatorias, apoptóticas y congestión en los espacios porta revisados. En relación a los datos de necrosis se apreciaron en el grupo 2 a los 120 minutos de reperfusión y en ambos grupos tratados con AINE's a las 4 horas. (Figura 9 E y F). En el grupo 2 se aprecian extensas zonas de necrosis formando puentes en los espacios porta, mientras que en los grupos 3 y 4, la necrosis fue focal o muy localizada. (Figura 9). De manera complementaria y para facilitar el análisis y la comparación de los resultados se elaboró un resumen de los principales hallazgos morfológicos en donde se incluyen todos los grupos estudiados y los diversos tiempos de isquemia reperfusión en los que se tomaron muestras (Cuadro 1).



**Figura 9. Histopatología del Hígado.**

Se muestran los cortes representativos teñidos con hematoxilina y eosina (H y E). Se evidenció a una hora postreperusión que la imagen histológica del hígado en el grupo sometido a IRH presenta 3 cuerpos apoptóticos y escasas células inflamatorias. **(A)** En comparación a dicha imagen, en los animales tratados con piroxicam, se observa un cuerpo apoptótico y ausencia de células inflamatorias **(B)** y en el caso del tratamiento con meloxicam se observa tejido hepático normal **(C)**. Por el contrario, a las 4 horas de iniciada la reperusión,

las muestras de tejido hepático sin tratamiento de AINES muestran áreas de necrosis focal y moderado infiltrado inflamatorio **(D)**; mientras que el uso del piroxicam evidenció escasas zonas de necrosis focal con mínimo infiltrado inflamatorio **(E)**; y en el grupo tratado con meloxicam hay evidencia de menor número de espacios porta con necrosis focal, sin infiltrado inflamatorio **(F)**. A las 24 horas postreperfusión en el grupo de IRH se observan lesiones en sacabocado y necrosis extensa **(G)**. Y en los grupos tratados con inhibidores COX-1 ó COX-2 se muestra escasa necrosis focal y células inflamatorias. **(H e I)**. Amplificación original 10x y 20x.



**Cuadro 1.** Resumen de los principales hallazgos histológicos.

		IRH			COX-1			COX-2	
TIEMPO	INFILT INFLAM	NECROSIS	MICROCIRC	INFILT INFLAM	NECROSIS	MICROCIRC	INFILT INFLAM	NECROSIS	MICROCIRC
30 m (Isquemia)									
Reperfusion	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
30 min	MN	Apoptosis focal	Edema y Congest	SC	SC	SC	SC	SC	SC
60 min	MN	Apoptosis	Edema/ Cong/Hemo	SC	Apoptosis focal	SC	SC	SC	SC
90 min	MN/PMN	Apoptosis	Edema/ Cong/Hemo	SC	Apoptosis focal	Edema y Congestión	SC	SC	Edema y Congestión
2 h	PMN/MN	Necrosis focal	Edema/ Cong/Hemo	MN	Apoptosis focal	Edema y Congestión	MN	Apoptosis focal	Edema y Congestión
4 h	PMN/MN	Necrosis focal	Edema/ Cong/Hemo	MN/PMN	Necrosis focal	Edema y Congestión	MN/PMN	Necrosis focal	Edema y Congestión
12 h	PMN/MN	Apoptosis/ Necro focal	Edema y Congestión	SC	Necrosis focal	Edema y Congestión	SC	Necrosis focal	Edema y Congestión
24 h	PMN/MN	Necrosis en puente	Edema y Congestión	PMN	Necrosis focal	Edema y Congestión	SC	Necrosis focal	Edema y Congestión

**SC:** Sin cambios.

**PMN:** Polimorfonucleares: Neutrófilos

**MN: Mononucleares:** Linfocitos y células plasmáticas

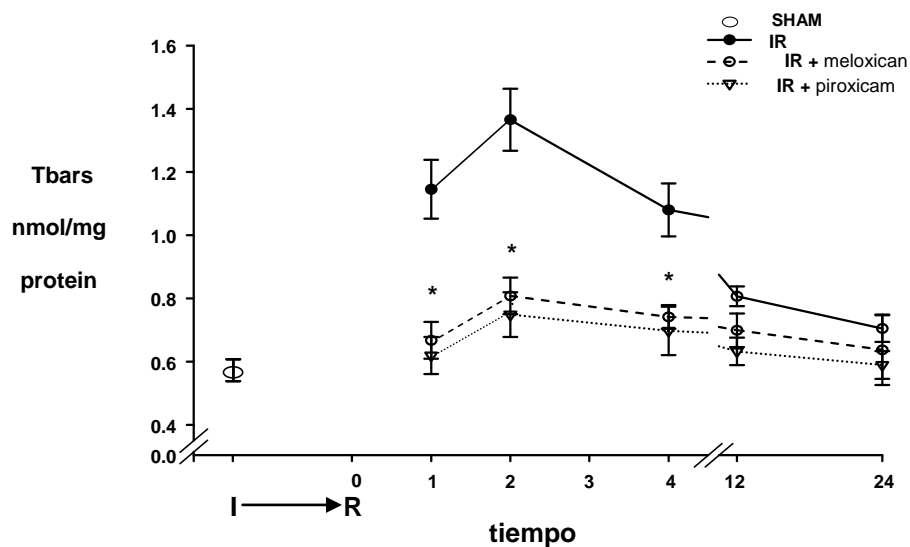
## **Presencia de EOR medidas indirectamente por TBARS y directamente por EPR.**

Los niveles de TBARS son un indicador ampliamente empleado para medir productos de la lipoperoxidación secundarios a la presencia elevada de radicales libres en los tejidos. Posterior a la isquemia hepática (I) se observa una elevación de los TBARS en las primeras horas de reperfusión (R) en todos los grupos experimentales. La elevación fue significativamente mayor, desde la primera hora de reperfusión en el grupo de IR sin medicamentos en comparación con el grupo Sham. (Figura 10). En el Grupo Sham (S) se obtuvo el valor de  $0.58 \pm 0.3$  nmol/mg de proteína, en cambio en el grupo sometido a IRH sin medicamento los niveles de TBARS se encuentran a su máximo nivel a las dos horas de reperfusión, momento en el cual se detecta la mayor diferencia en comparación con los grupos tratados con COX-1 ó COX-2, respectivamente. De manera similar, a como se observó con las enzimas de escape, se encontró DES en los grupos tratados con AINEs al compararlo con el grupo no tratado. Al realizar una comparación con los valores obtenidos únicamente entre los grupos tratados no se encontraron DES.

En relación con el estudio de cuantificación directa los radicales libres por EPR, presentes en la bilis, generados durante el período de reperfusión y colectadas directamente del conducto biliar principal o colédoco, se observó una disminución en la intensidad de la señal, en los grupos tratados con AINE's al compararse con el grupo no tratado. Al analizarse las muestras del grupo sham no se detectó la presencia de la señal paramagnética, lo que corresponde a una baja poza de RL. Debemos mencionar que se realizaron diversas pruebas para estandarizar la técnica en material biológico como la bilis. Al respecto se

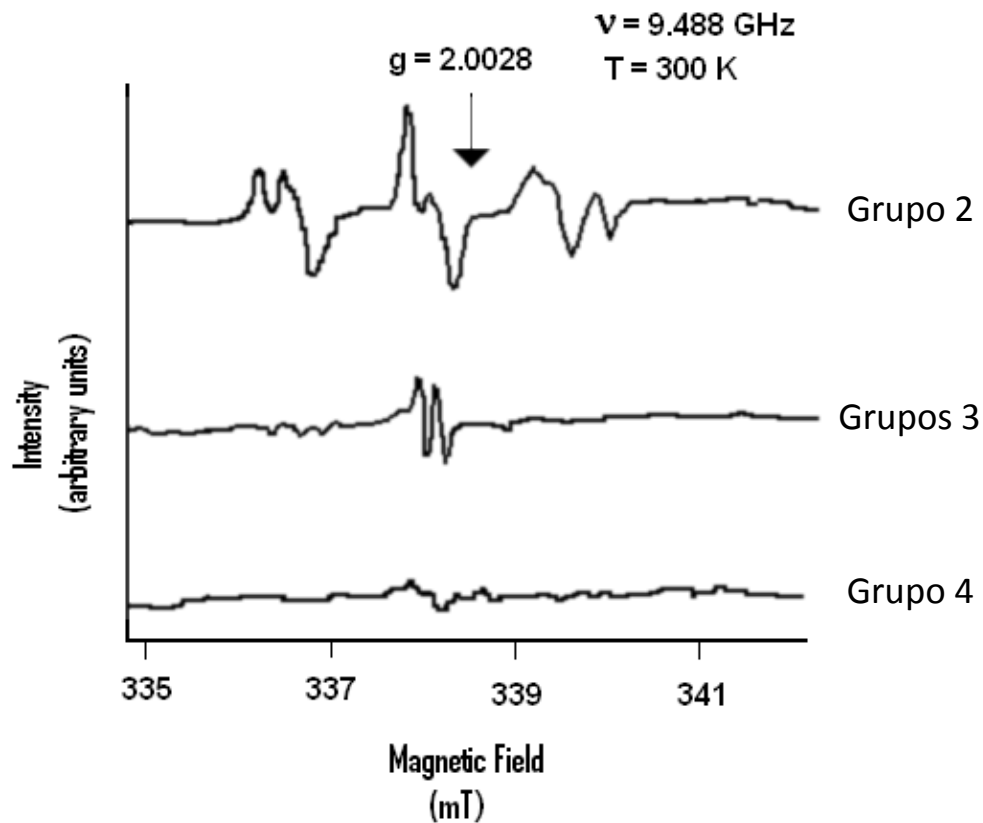
detectó una pequeña señal paramagnética en la mayoría de las muestras analizadas tanto de los grupos tratados como del grupo no tratado (Figura 11). Incluso fue observada en las muestras en ausencia de PBN o atrapador de spin, lo que nos indica que existieron una pequeña cantidad de especies paramagnéticas en las muestras de bilis de todos los grupos estudiados, cuya naturaleza no se pudo determinar; pero sus características fueron: tipo isotrópica, central alrededor de  $g=2.0028$ , y asociada a un radical libre no metálico.

Como se podemos observar en la figura 11, existe una disminución en la intensidad de la señal en los grupos tratados con inhibidores COX-1 **(b)** ó COX-2 **(c)**, en comparación con el grupo sometido a IRH sin medicamento **(a)**. Adicionalmente se analizaron las muestras de bilis del grupo Sham, con y sin PBN, y las muestras de cada uno de los grupos experimentales sin PBN, no se detectaron valores significativos de RL, dichos resultados no se presentan en la figura.



**Figura 10. TBARS.**

Determinación de TBARS en homogenado de hígado, antes de iniciar la isquemia y a varios tiempos de iniciada la reperusión. Para convertir los valores de absorbancia de los aductos, entre el ácido tiobarbitúrico y los productos de oxidación de los ácidos grasos se usó el coeficiente de extinción molar del aducto de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la del aducto entre el malón dialdehído y el propio ácido tiobarbitúrico. Los valores en la gráfica corresponden a los promedios  $\pm$  desviación estándar, con un valor de  $n=10$  en los grupos estudiados. Las DES están marcadas con asteriscos.



**Figura 11. Resonancia Paramagnética (EPR).**

Se muestra la intensidad de señal paramagnética, cuando se utilizó un atrapador de radicales libres, el PBN en las muestras de bilis obtenidas posterior al evento de isquemia por un lapso de tiempo de 2 h durante la fase de reperfusión hepática. Los grupos mostrados en la figura representan al grupo sometido a IR sin aplicación previa de AINES (Grupo 2), y a los tratados con piroxicam (Grupo 3) y meloxicam (Grupo 4).

## **Identificación de proteínas carboniladas por técnica de inmunohistoquímica.**

Durante el período de isquemia de 90 minutos no se observaron datos de carbonilación de proteínas (CP) en los grupos experimentales, con excepción del marcaje positivo en ciertas células de Kupffer (CK) en el grupo 2, sometido a IR sin aplicación previa de algún medicamento, tal como se puede apreciar en la figura 12. Dichas CK son macrófagos localizados en el parénquima hepático y están íntimamente asociados a cualquier tipo de estrés oxidativo. En este grupo 2, observó CP en las CK, así como en células endoteliales (CE), a diferencia de las células del hígado de los animales tratados con piroxicam ó meloxicam, donde no se encontraron proteínas carboniladas a los 30 y 60 minutos postreperusión (Cuadro 2). Este mismo patrón de carbonilación de proteínas se mantuvo durante los primeros 30 min de reperusión (Cuadro 2). Sesenta minutos después de iniciada la reperusión la presencia de PC se mantiene en el grupo 2 en las CE y CK (Cuadro 2 y figura 13-A y aparece en las CE del grupo tratado con piroxicam (Cuadro 2 y figura 13-B y C). A los 90 minutos de reperusión, los tres grupos con IR mostraron CP en las CE, y CP en las CK en los grupos 2 y 3 (Cuadro 2). A las 2 h de reperusión la CP se observó en los HEP de grupo 2 y las CK del grupo 4 (Cuadro 2). Y a las 4 hs hubo CP en todas las estirpes celulares de los 3 grupos sometidos a IR (Cuadro 2 y Fig 13-D, E y F). Al evaluar la CP a las 12 horas posteriores a la reperusión, una disminución en la presencia de CP se observó principalmente en los HEP en los grupos 2, 3 y 4; siendo más evidente en los grupos tratados con ambos AINE's en comparación al grupo sometido únicamente a IR (Cuadro 2).

En las siguientes 12 horas, hasta las 24 horas que se evaluaron los hallazgos histológicos en el presente estudio, la CP estuvo ausente en HEP y CK en los grupos tratados con inhibidores COX-1 ó COX-2; durante éste período, el marcaje de CP por inmunohistoquímica permaneció en las CK y CE en el grupo no tratado. (Cuadro 2 y Figura 13-G, H e I).

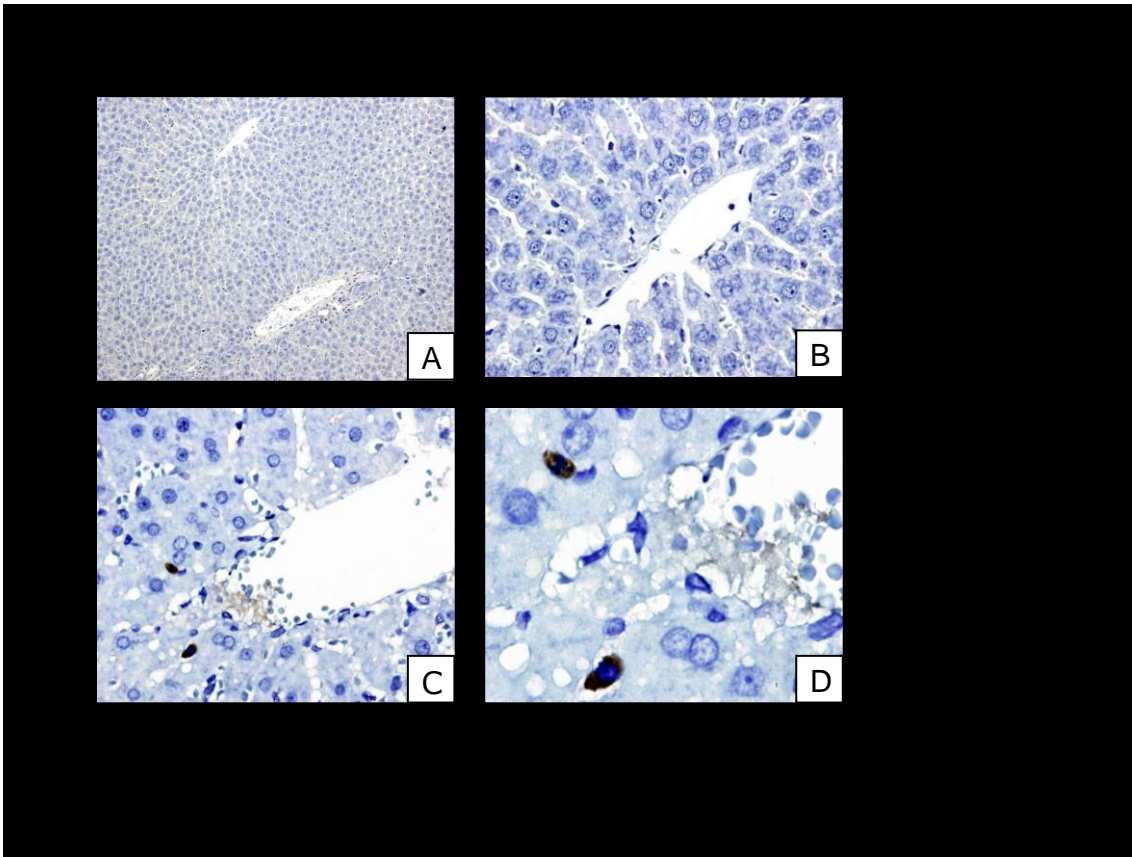
Como podemos observar en la figura 13 y detallado por grupos de células hepáticas en el cuadro 2, durante la primera hora de iniciada la reperfusión las CE y CK manifestaron intensamente la carbonilación de proteínas (+++), hecho que no se apreció en los HEP (-); a las 4 horas, la presencia de los grupos carbonilos fue similar en los grupos estudiados (++/+++) y, a las 24 horas, la intensidad en la carbonilación de proteínas permanceció en las CE y en las CK (++) , siendo negativa para los HEP. Por lo que la célula funcional del hígado se vio afectada por las CP en el curso temporal de 24 horas durante el período intermedio en los grupos estudiados, se observa la inmuno tinción de los HEP posterior a la carbonilación de proteínas de las CE y CK.

Como efecto de la lesión por IR, las EOR pueden ser liberadas a la circulación portal y sistémica, como se pudo apreciar con la CP de las células CE a nivel hepático. Cuando el fenómeno por IR progresa y se hace más intenso, se extiende a las CK que son los sensores y primariamente las células encargadas de mediar el estrés oxidativo, aunque todo el conjunto celular participan en este proceso. En el presente estudio demostramos la CP en las CE y CK a nivel hepático mediante inmunohistoquímica en un modelo in vivo de IR.

**Immunohistoquímica para determinar la extirpe celular por medio de CD34 (células endoteliales) y CD68 (células de Kupffer).**

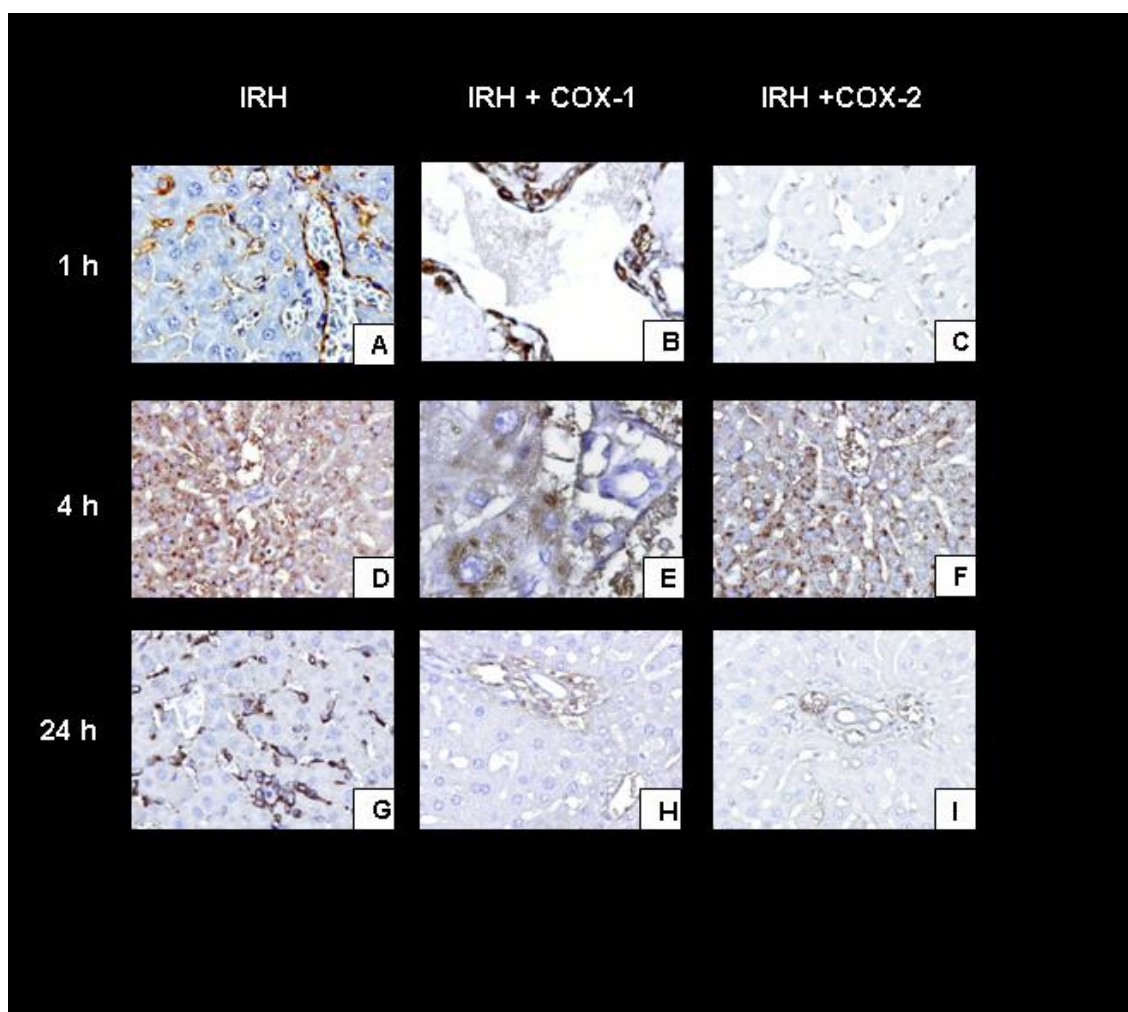
Con la finalidad de poder identificar con certeza el tipo de célula involucrada tanto en la lesión histológica, observada con tinciones de H y E, y correlacionar los hallazgos observados mediante inmunohistoquímica con la carbonilación de proteínas. Se decidió realizar en las biopsias hepáticas, un doble marcaje con CD68 y CD34 que de manera específica nos permite diferenciar las CK y las CE, que como hemos apreciado en las biopsias analizadas son el grupo celular inicialmente carbonilado, seguido por el conjunto de hepatocitos ubicados en el espacio porta. (Figura 14).





**Figura 12. Proteínas carboniladas encontradas al término del período de isquemia.**

Estas muestras fueron tomadas previo a la fase de reperfusión. Se observa un patrón histopatológico normal en el grupo Sham, tanto en un espacio porta **(A)** como en una vena central **(B)**: las células endoteliales (CE), las células de Kupffer (CK) y los hepatocitos (HEP) no muestran presencia de CP. Por el contrario, las muestras del grupo no tratado y sometido a IR manifiesta al minuto noventa de isquemia la presencia de CP en las CK **(C y D)**. No se observaron CP en las células de los hígados de animales incluidos en los grupos 3 y 4, tratados con inhibidores COX-1 ó COX-2, respectivamente. Amplificación 100X (A), 40X(B y C), y 20X(D).



**Figura 13. Presencia de proteínas carboniladas durante el período de reperusión.**

En el grupo sometido a IRH se observó a los 60 minutos postreperusión el marcaje intensamente positivo en las proteínas carboniladas de las células endoteliales (CE) y células de Kupffer (KC) +++ **(A)**. Por el contrario, las muestras de tejido hepático en el grupo previamente tratado con los inhibidores COX-1 ó COX-2 muestran menor carbonilación de proteínas en las CE ++ **(B)**, así como en las CE +, CK + **(C)**. A las 4 horas postreperusión se observa PC en las CE, las CK y en los hepatocitos (HEP) ++ / +++ **(D)**. Comparativamente en los hígados de los grupos tratados con los inhibidores COX se observó un

marcaje moderadamente positivo en los grupos celulares estudiados CE, CK y hepatocitos ++/+ (**E y F**). A las 24 horas de reperfusión hepática, las muestras histológicas se caracterizaron por moderada presencia en la CP en las CE y CK ++ (**G**), así como en las CE++ (**H e I**) (**Cuadro 2**) . Amplificación 100x (F), 40x (B) y 20x (A,C, D,E,G-I).

**Cuadro 2. Resumen de los hallazgos de proteínas carboniladas en las células hepáticas.**

TIEMPO	IRH	COX-1	COX-2
ISQUEMIA	CK		
REPERFUSIÓN	CE/CK	SC	SC
30 min	CE/CK	SC	SC
60 min	CE/CK	CE	SC
90 min	CE/CK	CE/CK	CE
2 h	CE/CK/ HEP	CE/CK	CE/CK
4 h	CE /CK/HEP	C/CK/HEP	CE/CK/HEP
12 h	CE/CK/HEP	CE/CK/HEP	CE/CK
24h	CE/CK	CE	CE

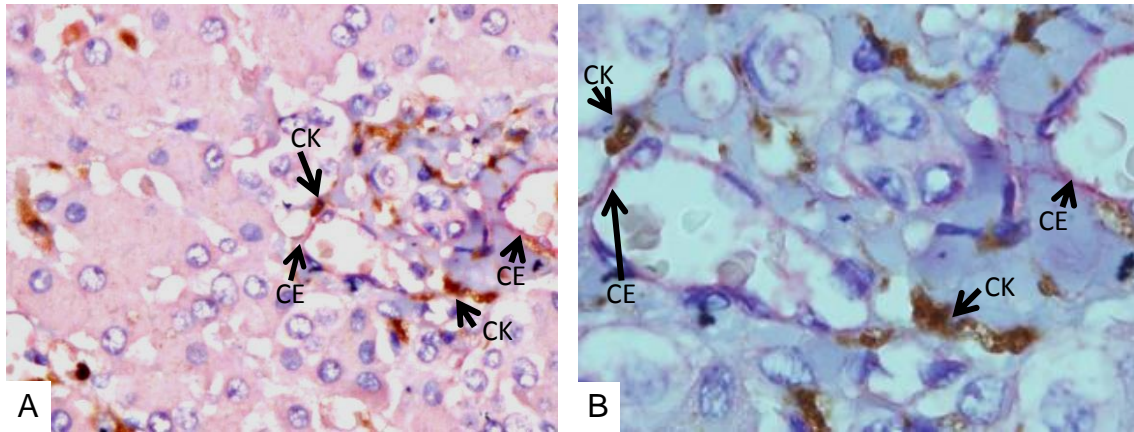
**CE:** Células Endoteliales.

**CK:** Células de Kupffer.

**HEP:** Hepatocitos.

**SC:** Sin cambios.

Immunohistoquímica para determinar la extirpe celular por medio de CD34 (células endoteliales) y CD68 (células de Kupffer).

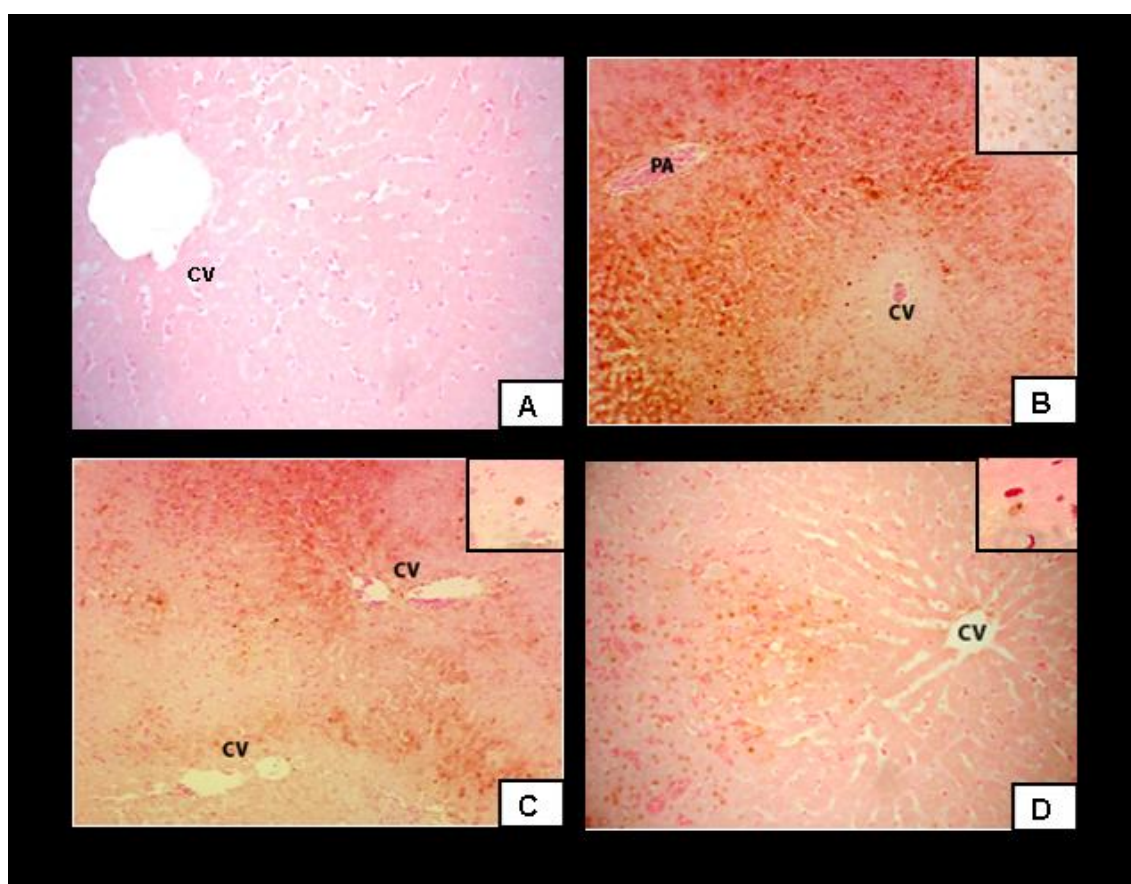


**Figura 14. Inmunohistoquímica con CD34 y CD38.**

En las biopsias hepáticas se muestra un espacio porta con inmuno tinción de color rojo para identificar las células endoteliales (CE) y en color café las células de Kupffer (CK). Amplificación de 40X **(A)** y 100X**(B)**

### Apoptosis por técnica de TUNEL en isquemia reperfusión hepática.

Los datos mas representativos de apoptosis se observaron a las 4 horas de reperfusión, se notan escasos núcleos positivos en los grupos 3 y 4 tratados con piroxicam ó meloxicam, respectivamente, al compararse con los numerosos núcleos café oscuros encontrados en el grupo 2, sometido a IR y sin tratamiento. En el grupo Sham se cuantificaron 1 o 2 núcleos positivos los cuales fueron considerados dentro de parámetros normales. (Figura 15).



**Figura 15. Identificación de células apoptóticas por técnica de TUNEL.**

En 10 espacios porta aleatoriamente seleccionados, y a las 4 postreperfusión. Se observan los núcleos de color café oscuro en las células hepáticas principalmente hepatocitos en fase pre o apoptótica En el grupo sham, se

aprecian 5 +/- 2 células apoptóticas por espacio porta (CAEP) **(A)**. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (DES) cuando se compara el grupo sometido a IRH sin AINES, en el cual se cuantificaron 101 +/- 35 CAEP **(B)** vs. 41 +/-11 CAEP para el grupo tratado con inhibidor COX-1 **(C)** y 37 CAEP +/-6 vs. para el grupo tratado con el inhibidor de COX-2 **(D)**. No existe DES entre los grupos tratados (C) vs. (D). Ampliación a 40x y 10x respectivamente.



## Discusión.

El modelo experimental seleccionado para el presente estudio reproduce los eventos observables durante la práctica clínica en gastroenterología y cirugía al producir la isquemia y reperfusión porto hepática a través de la maniobra de Pringue;<sup>150</sup> que reduce el flujo arterial y/o venoso del hígado con sus modificaciones e indicaciones diversas de acuerdo a cada caso en particular.<sup>13,</sup>  
<sup>151, 152</sup> El modelo es de utilidad para, sin necesidad de recurrir a la situación en seres humanos, se propice una mejor caracterización del proceso, de su evolución y de su manejo. Trabajos previos de numerosos autores,<sup>33, 153-155</sup> igual que nuestro trabajo, han demostrado que durante la fase de reperfusión tisular ocurre un estrés oxidativo debido a un exceso en la generación de ERO. Todo indica que la abundancia y reactividad de las ERO generadas sobrepasa la capacidad para manejarlas y en consecuencia se observa la aparición de distintos indicadores de lesión celular. Esta discusión se centra en el análisis temporal en la aparición de los indicadores de lesión aquí seleccionados, se establece una comparación de la magnitud con que son modificados, y como regresan o tienden a una situación normal. Desde luego se incluye el efecto benéfico obtenido por el piroxicam y el meloxicam y se discutirá su posible mecanismo de acción.

En relación con la totalidad de marcadores de estrés oxidativo evaluados en el presente trabajo, se toma como eje conductor de ésta discusión al tiempo que transcurre desde que se provoca la lesión por isquemia-reperfusión hasta la aparición de una respuesta a la lesión por parte del tejido hepático. Con ello se intenta darle un sentido práctico a éste trabajo de investigación, de manera que



en la actividad clínica cotidiana sea factible para el médico-cirujano, a través de los datos de un indicador de estrés oxidativo aquí estudiado y a su alcance (como lo es la cuantificación de las enzimas en suero) cual puede ser la situación integral de la lesión hepática, que en este trabajo de investigación se evidencia por alteraciones cualitativas y cuantitativas en un conjunto de indicadores de no fácil acceso en las instituciones hospitalarias.

La carbonilación de proteínas fue el único indicador de lesión hepática que pudo detectarse en este trabajo cuya aparición ocurrió durante el período de isquemia. Todos los demás indicadores de lesión tisular debido a la acción de los radicales libres generados en exceso durante el proceso de isquemia reperusión aparecieron una vez iniciada la fase de reperusión.

De lo anterior se colige que la estirpe celular primero alterada por un exceso en la presencia de radicales libres, posiblemente la que tenga mayor capacidad para generar dichos radicales libres sea la célula de Kupffer. (Figura 12). Además se puede comentar que es precisamente la carbonilación de proteínas la que aparentemente enciende la señal de alarma.

Por otra parte, es lógico que el componente sólido más abundante en todas las células, las proteínas, sean las primeras moléculas en las que se manifiesta un deterioro por un exceso en la presencia de radicales libres. Los comentarios previos solo fueron posibles gracias al uso de una metodología como la de la histoquímica, con la especificidad suficiente y la enorme capacidad de amplificar la minúscula lesión inicial como lo es la carbonilación de proteínas mediada por los radicales libres. Hasta donde sabemos, esta es la primera ocasión en que es posible detectar a nivel molecular la lesión que temporalmente aparece primero en el caso del hígado sujeto a un proceso

experimental de isquemia reperfusión. La identificación de células con proteínas carboniladas tal como se realizó en este trabajo es difícil de efectuar en un ambiente clínico convencional. En consecuencia se plantea la posibilidad de repetir el experimento y explorar la presencia de proteínas carboniladas en las células circulantes de fácil acceso. Se tendrá la ventaja de poder monitorear en los pacientes los datos iniciales de las alteraciones moleculares que preceden a alteraciones funcionales y celulares.

El análisis de carbonilación de proteínas en los hígados de ratas, ocurridos en tiempos posteriores al que se acaba de comentar, indica que esta ocurre en tipos celulares como las células endoteliales, células de Kupffer y en los hepatocitos. (Figuras 13, 14 y Cuadro 2)

Por último, la aplicación de piroxicam o meloxicam, previenen la carbonilación de proteínas, y por ende, la lesión ocasionada por los radicales libres sobre las proteínas celulares. Habrá que estudiar en un futuro si los inhibidores de la Cox, aquí usados pueden impedir, disminuir o retardar la aparición de radicales libres en las células respectivas, o si brindan una protección particular a las proteínas ubicadas en el seno celular. Nótese que la carbonilación de proteínas en las células de las ratas que recibieron los inhibidores de la Cox, apareció hasta los 90-120 minutos después de iniciada la reperfusión, fue menos intensa y no afectó, sino hasta los 120 minutos a los hepatocitos. (Figura 13 y Cuadro 2)

La determinación de la actividad de las enzimas en el suero es el indicador de lesión hepática por isquemia reperfusión, que por su amplio uso en la clínica adquiere significado especial en este trabajo. Además, los resultados muestran que es un indicador muy útil de lesión por isquemia reperfusión, dado que los

valores de dichas enzimas en las ratas sometidas a IR sin tratamiento con AINEs, se elevan mas de 10 veces arriba de los valores de las ratas del grupo Sham. (Figura 8). Otra ventaja experimental es que esos valores se elevan desde los 30 minutos después de iniciada la reperfusión, suben las siguientes 4 horas, y a partir de ese momento tienden a la normalidad, sin alcanzarla, en las siguientes 20 horas. (Figura 8). Por ello constituyen un excelente indicador, que puede usarse como patrón de comparación en relación con las alteraciones observadas en otros indicadores de lesión por isquemia reperfusión. Por último el efecto protector observado por el piroxicam y el meloxicam en relación con las lesiones por isquemia reperfusión, es muy importante y estadísticamente significativo para todos los tiempos ensayados. (Figura 8). Así la elevación de 3 veces en la actividad de las enzimas séricas debido a la isquemia reperfusión y detectado a los 30 minutos de iniciada la reperfusión, se puede comparar con el otro indicador de lesión revisado hasta el momento en la discusión y es el caso de la carbonilación de proteínas. Por otra parte al observarse las biopsias hepáticas mediante tinción de hematoxilina y eosina, se identificaron a los 30 minutos posr-reperfusión únicamente 3 cuerpos apoptóticos y algunas células inflamatorias en el grupo no tratado previamente con AINEs, y en las muestras de los grupos tratados con piroxicam o meloxicam, encontramos el parenquima hepática de características normales y solo se encontró aisladamente una célula en proceso de apoptosis en el grupo tratado con piroxicam.

En el período de 1 a 4 horas después de iniciada la reperfusión, es en el cual se pueden efectuar más comparaciones sobre la temporalidad en la aparición de cambios, así como en la magnitud de dichos cambios. Además es el período de estudio en que los valores séricos de las enzimas de escape se encuentran

en sus cifras más altas para el caso de los animales sujetos a isquemia reperusión y sin tratamiento con los inhibidores de la Cox, por lo que es el período en el que también se puede apreciar mejor la acción del piroxicam y del meloxicam protegiendo a los tejidos de la acción nociva de los radicales libres generados por la isquemia reperusión. En dicha ventana temporal la actividad enzimática de las 4 enzimas estudiadas en el suero muestran una tendencia a iniciar la recuperación, en 3 de las enzimas desde las 2 horas después de la reperusión, y en la que ALT a las 4 horas de reperusión, o sea en el período donde ha sucedido la síntesis de mayor número de radicales libres y es el período donde se nota que el organismo hace efectivos los mecanismos para abatir efectivamente su presencia.

Una tendencia similar se observa durante esa ventana de tiempo para el caso de los ensayos de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs): una elevación máxima a las 2 horas post-reperusión, momento en el que posiblemente se desencadena la recuperación, por lo que a las 4 horas de reperusión la cifra de TBARs es menor. (Figura 10). Es claro por los datos de la figura que el tratamiento preventivo de las ratas con los inhibidores de la Cox, efectivamente previenen la aparición de TBARs de manera drástica y semejante a como sucede con la elevación de la actividad de las enzimas de escape en los mismos animales (Figuras 8 y 10). Recuérdese que las enzimas se cuantifican en el suero, mientras que el ensayo de las TBARs ocurre en el hígado, no obstante se nota un paralelismo en el tipo de cambio para ambos indicadores de lesión tisular. Dicho paralelismo tiene particular significado si asentamos que el indicador más usado para apreciar la presencia anormal de radicales libres a nivel tisular, así como las lesiones que ocasiona su presencia

en los tejidos, es precisamente la cuantificación de TBARs.<sup>122, 156-158</sup> Por lo tanto, de acuerdo a la información analizada puede concluirse que un excelente indicador de lesión tisular por la presencia de radicales libres a consecuencia de la isquemia reperusión hepática, lo constituye cualesquiera de las 4 enzimas séricas de escape medidas en este trabajo. Incluso parecería que la medición de la actividad de las enzimas de escape en el suero es un mejor indicador indirecto de la lesión hepática por radicales libres que la cuantificación de la presencia de TBARs en la glándula hepática, puesto que cuantitativamente la magnitud del cambio, y con ello el indicador de lesión, es mayor y más específico al medir las enzimas que los TBARs. En el grupo no tratado con inhibidores de la Cox (GRUPO 2), el pico máximo de las enzimas ALT y DHL fue a las 2 horas de reperusión, siendo 6 a 7 veces su valor del grupo simulado o sham, mientras que a las 2 horas de reperusión los valores de TBARS alcanzan sus valores más elevados, siendo 2 veces mayor en el grupo 2 en comparación con el grupo sham y en los grupos tratados con piroxicam o meloxicam; se observa igualmente una elevación pero menor, siendo de un 20, 33 y 20% a la hora, dos horas y 4 horas respectivamente en comparación con el grupo simulado o sham.

Cabe recordar que las enzimas de escape que se relacionan directamente a daño hepático son la ALT y OTC, ambas enzimas tienen una localización distinta a nivel celular, la ALT se encuentra a nivel citoplasmático y la OTC, se ha demostrado experimentalmente ser más abundante en el hígado comparación con otros tejidos, siendo su localización a nivel mitocondrial.<sup>159-161</sup> Dado que a 2 horas después de iniciada la reperusión se aprecia el mayor aumento de indicadores de lesión tisular, se decidió medir a este tiempo de

reperfusión la presencia directa de la poza existente de radicales libres, así como las consecuencias de la presencia de esos radicales libres en un proceso tan importante para cualquier célula comprometida, como es la apoptosis. Es conveniente enmarcar que el significado de la medición directa de los radicales libres tisulares en este trabajo. La inestabilidad química, la vida media tan corta, y la reactividad de los radicales libres del oxígeno hacen complicada y difícil su cuantificación directa.<sup>153, 162-164</sup> Por ende, es de lo más común que se mida indirectamente la presencia celular de dichos radicales libres por alguno de sus productos de reacción, como son los grupos carbonilo de las proteínas,<sup>95, 165, 166</sup> la lipoperoxidación de ácidos grasos insaturados,<sup>122, 167, 168</sup> el consumo excesivo de glutatión reducido,<sup>169-171</sup> o la presencia de algún compuesto anormal que aparezca como consecuencia de la acción de los radicales libres sobre algún componente celular; por ejemplo, en este trabajo se preconiza la medición de enzimas de escape al suero. La desventaja de éstos métodos indirectos reside en que se mide la consecuencia o el efecto de los radicales libres sobre los componentes tisulares, e incluso en ocasiones se puede medir los cambios debidos a la presencia de componentes anormales sobre estructuras o funciones no ligadas directamente a la poza de los radicales libres, lo cual siempre es inconveniente.

El ensayo directo de la presencia y cuantificación de la poza de radicales libres se puede efectuar por el acoplamiento de dichos radicales libres con otro radical libre, en este caso fue PBN, el cual se añade a la muestra biológica con objeto de integrar un complejo radical-radical, mucho más estable que cada radical independiente.<sup>172, 173</sup> En una etapa posterior se mide en un aparato adecuado la resonancia paramagnética (EPR) del complejo generado, la cual

es proporcional a la poza de radicales libres presente originalmente en muestra biológica. La práctica ha consagrado a la bilis como la muestra biológica más adecuada y de mas fácil acceso, que sin alterar la estructura celular, permite cuantificar la poza de radicales libres en el tejido hepático. Los datos obtenidos indican la presencia inequívoca de una alta poza de radicales libres en la bilis de las ratas sometidas a isquemia reperusión y nos tratadas con AINEs (Figura 11).

La aplicación de ambos AINEs previo al reto de isquemia reperusión, en particular el meloxicam, muestra un abatimiento muy importante en la poza de radicales libres en la bilis (Figura 11). Lo anterior le da solidez a la propuesta de correlacionar los resultados observados con EPR con las modificaciones en la actividad de las enzimas de escape ALT, AST, DHL y OTC; por lo que se puede inferir con mayor confianza que la actividad de las enzimas hepáticas están relacionadas y dependen de la cantidad de radicales libres presentes en el hígado sometido a isquemia reperusión y cuantificados por EPR.

Por otra parte observamos en la fase reperusión desde el punto de vista histológico, que dichos cambios fueron más evidentes a las 4 horas tal como se observa en las biopsias hepáticas con tinción de H y E. (Figura 9 y Cuadro 1). Desde la primera hora se observan los primeros cuerpos apoptóticos en el grupo 2, sin evidencia de apoptosis en los grupos tratados con meloxicam o piroxicam, esta información se puede apreciar claramente al correlacionarse con los hallazgos obtenidos con la técnica de tunel, con un mayor número de núcleos celulares inmunomarcados a las 4 horas de reperusión, a diferencia de los grupos tratados, con un menor número de células en fase de apoptosis. (Figura 15). Se pudo identificar cambios como la presencia de infiltrado

inflamatorio con predominio de células polimorfonucleares, desde los 90 minutos hasta las dos horas posteriores a la fase de reperfusión, dichos cambios se aprecian en todos los grupos de estudio, con un mayor infiltrado inflamatorio en el grupo no tratado con AINEs y comparación con los grupos tratados con los inhibidores de la Cox. (Cuadro 1). Posteriormente, a partir de las 4 horas en la fase de reperfusión, se pueden apreciar datos más severos de hemorragia, edema y congestión en el grupo no tratado sometido a isquemia reperfusión en comparación con los grupos 3 y 4, previamente tratados con los inhibidores de la Cox. En relación a la presencia de necrosis, se aprecia con mayor claridad tanto de tipo focal como en formación de puentes entre los espacios porta en el grupo no tratado en comparación con los grupos tratados, siendo más evidente la necrosis a las 8, 12 y 24 horas respectivamente. (Figura 9 y cuadro 1).

Se observa en todos los grupos la progresión del daño celular de carbonilación de proteínas, pero es mayor la presencia en los espacios porta hepáticos, se observó la intensidad del marcaje y el grupo celular afectado como se describe en el cuadro 2 y se aprecia en la figura 13. Dichos hallazgos se observan con mayor intensidad en el grupo 2 en comparación con los grupos 3 y 4. En estos últimos grupos se observa una tendencia de inmunomarcaje menor a las 24 horas, datos que se correlacionan la regresión de los valores séricos de las enzimas hepáticas y los resultados obtenidos con las biopsias estudiadas.

Al analizar las muestras del parénquima hepático con técnica de H y E (figura 9) apreciamos afectación de las células y las zonas hepáticas localizadas a nivel centrolobulillar y periportal. Con el fin de identificar cuales



eran las células primariamente afectadas efectuamos un doble marcaje de las biopsias hepáticas, obtuvimos resultados por inmunohistoquímica con CD34 y CD68, que son marcadores específicos para células endoteliales y macrófagos respectivamente (Figura 14). Por lo que fue posible apreciar la carbonilación de las proteínas en células hepáticas y diferenciar cuales son el grupo celular afectado.

En esta participación celular, observamos como describimos previamente en el cuadro 1 y 2, que, la presencia del infiltrado inflamatorio con predominio de las células polimorfonucleares, en especial del neutrófilo, que conjuntamente con las CK son los responsables de propagar el estrés oxidativo a nivel hepático. Lo anterior ha sido demostrado por trabajos publicados previamente, donde observaron que, cuando se depletó o se bloquearon en el hígado de dichos componentes celulares, la respuesta a la isquemia reperusión, disminuyó en la severidad del cuadro al compararlo con los animales con su componente celular integro.<sup>174-179</sup>

Por otra parte, también es factible la cuantificación de la carbonilación de proteínas entre otros métodos por medio de un estudio colorimétrico como lo realizamos en eritrocitos ó linfocitos de rata, en un modelo de intoxicación aguda por etanol.<sup>1</sup> La carbonilación de proteínas a nivel celular y no celular se produce por efecto de los radicales libres, ocasionan modificación en la estructura proteica, que finalmente pueden traducir alteraciones funcionales.<sup>95</sup>

El daño oxidativo desencadena las cascadas de reacciones químicas e inflamatorias, así como la señalización intracelular, vía el factor  $\text{NK-}\beta$ <sup>180, 181</sup> activación de complemento,<sup>182</sup> producción de óxido nítrico, participación de proteínas de choque térmico,<sup>183</sup> prostaglandinas e eicosanoides<sup>103</sup> entre

otros.<sup>184</sup> Por lo que el empleo de meloxicam y piroxicam modificaron los efectos ocasionados por la lesión por isquemia reperfusión, modificaron la respuesta inflamatoria y se demostró mediante los resultados de los diversos marcadores de estrés oxidativo evaluados en el presente estudio.

En los inhibidores de la COX-1 y de la COX-2, su mecanismo de acción es la inhibición la síntesis de tromboxanos y prostaglandinas, por lo que representan un campo atractivo de estudio, no solo para evaluar la lesión por isquemia reperfusión y el área trasplante de órganos. Sino para el tratamiento del cáncer como se ha demostrado en colon,<sup>185, 186</sup> próstata,<sup>187</sup> cabeza y cuello,<sup>188</sup> entre otros.<sup>103</sup> En el área oncológica este grupo de medicamentos se han empleado en la remisión de lesiones premalignas como poliposis adenomatosa familiar;<sup>189</sup> recientemente se ha demostrado la combinación de meloxicam con agentes empleados en quimioterapia para combatir el cáncer de pulmón, observando resultados alentadores en su aplicación clínica.<sup>190</sup>

Por otro lado, en relación a la eficacia de las drogas estudiadas, nosotros empleamos piroxicam (peso molecular 331.348 daltons) y meloxicam (peso molecular de 351.403 daltons) a dosis de 13mg/kg y 0.9 mg/kg de peso respectivamente; por lo que la dosis farmacológica de piroxicam en mg/kg de peso para lograr un efecto similar al del meloxicam, también en mg/kg de peso, en realidad indica que al calcular la dosis en función del peso molecular de ambos farmacos, se está usando casi 15 veces más moles de piroxicam que meloxicam. Con base a lo anterior, podemos concluir el el meloxicam es más eficiente que el piroxicam para proteger el hígado de los radicales libres generados por la isquemia reperfusión. En cualquier caso y de acuerdo al

modelo experimental realizado en el estudio, no observamos patrones de toxicidad con el uso de ambos AINE's.

En conclusión, al compararse las variables estudiadas quedó demostrado que hubo producción y progresión de la lesión por isquemia reperusión a nivel hepático y se observó un efecto protector del piroxicam o meloxicam al aplicarse previo al evento isquémico. El uso de protectores tisulares previno y retardó el daño a nivel celular, y se observó menor cantidad de EROS en EPR y de manera indirecta sus efectos en todas las variables estudiadas. El efecto hepato protector ha quedado demostrado en nuestro trabajo por lo menos en las fases iniciales de la lesión, monitoreada por las primeras 24 horas post reperusión.

\* Presentado en parte, durante el Congreso Americano de Enfermedades Digestivas (DDW- AGA), en la ciudad de Los Ángeles, California. Mayo, 2006.<sup>191</sup> y en versión final en el Congreso Mundial de Cirugía (ISS), en la ciudad de Adelaide, Australia en Septiembre del 2009.<sup>192</sup>

## **Perspectivas.**

1. Caracterizar el mecanismo de acción inicial y específico de los inhibidores de COX.
2. Identificar nuevos agentes farmacológicos que modulen de manera rápida y accesible la respuesta local y sistémica a la lesión por isquemia reperusión hepática.
3. Investigar y caracterizar cuáles son específicamente las especies de oxígeno reactivas involucradas en la lesión por isquemia reperusión por medio de EPR en tejido, sangre, bilis y a nivel celular.
4. Identificar los mecanismos o cascadas de señalización celular en el fenómeno de isquemia reperusión, que de manera constante se presenta en los diversos organos con el objetivo de prevenir eventos isquémicos, como infarto agudo al miocardio, eventos vasculares cerebrales, estado de choque hipovólemico y sepsis.
5. Identificar los genes involucrados en la hipoxia celular mediante microarreglos y por estudios de proteómica brindar un avance más preciso en el área.
6. En base a lo anterior incidir en su fisiopatología, ampliando el conocimiento científico en bienestar de la humanidad y ofrecer más y mejores opciones de tratamiento.

**Bibliografía.**

1. Zentella de Pina M, Sandoval-Montiel A, Serrano-Alessandri L, Montalvo-Jave E, Zentella-Dehesa A, Pina E. Ethanol-mediated oxidative changes in blood lipids and proteins are reversed by aspirin-like drugs. *Arch Med Res* 2007;38:269-75.
2. Montalvo-Jave E, Villegas-Alvarez F, Montalvo-Arenas C, Pena-Sanchez J, Gutierrez-Vega R, Pina E. Liver transplantation: Some advances in liver cancer, live liver donation, and cell transplantation. A literature review. *Rev Gastroenterol Mex* 2009;74:341-348.
3. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Pina E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008;147:153-9.
4. Montalvo-Jave EE, Pina E, Montalvo-Arenas C, Urrutia R, Benavente-Chenhalls L, Pena-Sanchez J, Geller DA. Role of Ischemic Preconditioning in Liver Surgery and Hepatic Transplantation. *J Gastrointest Surg* 2009.
5. Murray JE. The first successful organ transplants in man. *J Am Coll Surg* 2005;200:5-9.
6. Harrison JH, Merrill JP, Murray JE. Renal homotransplantation in identical twins. *Surg Forum* 1956;6:432-6.
7. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of the Liver in Humans. *Surg Gynecol Obstet* 1963;117:659-76.
8. Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Penn I, Fulginiti VA, Moon JB, Blanchard H, Martin AJ, Jr., Porter KA. Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg* 1968;168:392-415.
9. Starzl TE. The mystique of organ transplantation. *J Am Coll Surg* 2005;201:160-70.
10. Delmonico FL, Sheehy E, Marks WH, Baliga P, McGowan JJ, Magee JC. Organ donation and utilization in the United States, 2004. *Am J Transplant* 2005;5:862-73.
11. Clavien PA, Emond J, Vauthey JN, Belghiti J, Chari RS, Strasberg SM. Protection of the liver during hepatic surgery. *J Gastrointest Surg* 2004;8:313-27.
12. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003;125:917-36.
13. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 2000;232:155-62.
14. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003;238:843-50; discussion 851-2.
15. Furukawa H, Todo S. Evolution of immunosuppression in liver transplantation: contribution of cyclosporine. *Transplant Proc* 2004;36:274S-284S.

16. Starzl TE. History of clinical transplantation. *World J Surg* 2000;24:759-82.
17. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 2003;124:91-6.
18. [www.unos.org](http://www.unos.org).
19. Freeman RB, Jr., Wiesner RH, Roberts JP, McDiarmid S, Dykstra DM, Merion RM. Improving liver allocation: MELD and PELD. *Am J Transplant* 2004;4 Suppl 9:114-31.
20. Freeman RB, Jr., Wiesner RH, Harper A, McDiarmid SV, Lake J, Edwards E, Merion R, Wolfe R, Turcotte J, Teperman L. The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. *Liver Transpl* 2002;8:851-8.
21. Cholongitas E, Marelli L, Shusang V, Senzolo M, Rolles K, Patch D, Burroughs AK. A systematic review of the performance of the model for end-stage liver disease (MELD) in the setting of liver transplantation. *Liver Transpl* 2006;12:1049-61.
22. Diliz-Perez H, Bordes-Aznar J, Varela-Fascinetto G, Lerma-Alvarado R, De Leo C, Sanchez-Melgarejo S, Kuri AD. Interinstitutional program of cadaveric organ transplantation in Mexico. *Transplant Proc* 1991;23:1797-8.
23. [www.cenatra.salud.gob.mx](http://www.cenatra.salud.gob.mx).
24. Juarez de la Cruz FJ. Trasplante hepático. *Cirujano General* 1998;20:192-197.
25. Diliz H, Orozco H, Kershenobich D, Rodriguez LC, Casillas MA, Hurtado R, Castorena G, Contreras A, Chavez-Peon F. [Liver transplantation in Mexico. Report of the first successful case]. *Rev Gastroenterol Mex* 1991;56:33-8.
26. Mendoza-Sanchez F, Haro-Haro FJ, Sandoval-Alvarado J, Zepeda-Gonzalez A, Herrera-Rodriguez R, Bassols-Ricardez A. [Orthotopic liver transplantation: results at a single center]. *Cir Cir* 2007;75:281-5.
27. Munoz-Espinosa LE, Cordero-Perez P, Escobedo-Villarreal MM. Development of a liver unit in Latin America. *Ann Hepatol* 2002;1:80-4.
28. Varela-Fascinetto G, Davila-Perez R, Nieto-Zermeno J, Bracho-Blanchet E, Fuentes-Garcia V, Castaneda-Martinez P, Abarca-Garcia MA, Olivares-Lopez V, Caltenco-Serrano R, Palafox-Vazquez H, Hernandez-Plata JA, Tovilla-Mercado JM, Lezama-del-Valle P, Valencia-Mayoral P. Experience of a successful pediatric liver transplant program in Mexico. *Transplant Proc* 2005;37:1201-2.
29. Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F. Xenotransplantation: a view to the past and an unrealized promise to the future. *Exp Clin Transplant* 2003;1:1-7.
30. Le Bas-Bernardet S, Anegon I, Blanco G. Progress and prospects: genetic engineering in xenotransplantation. *Gene Ther* 2008;15:1247-56.
31. Petrowsky H, Busuttil RW. Evolving surgical approaches in liver transplantation. *Semin Liver Dis* 2009;29:121-33.
32. Tai HC, Ezzelarab M, Hara H, Ayares D, Cooper DK. Progress in xenotransplantation following the introduction of gene-knockout technology. *Transpl Int* 2007;20:107-17.

33. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G15-26.
34. Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med* 2007;356:1545-59.
35. Montalvo-Jave EE. Lesión por Isquemia Reperusión y trauma hepático. *Trauma* 2008;11:92-100.
36. Arai S, Teramoto K, Kawamura T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10:189-94.
37. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;43:S31-44.
38. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2003;125:1246-57.
39. Shimada M, Fujii M, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Ishibashi H. Living-donor liver transplantation: present status and future perspective. *J Med Invest* 2005;52:22-32.
40. Russo MW, Brown RS, Jr. Adult living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2004;4:458-65.
41. Fruhauf NR, Malago M, Frilling A, Beckebaum S, Broelsch CE. Latest development in split liver transplantation. *Surg Technol Int* 2004;13:183-9.
42. Nissen NN, Cavazzoni E, Tran TT, Poordad FP. Emerging role of transplantation for primary liver cancers. *Cancer J* 2004;10:88-96.
43. Brown RS. Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* 2005;436:973-8.
44. Shah SA, Grant DR, Greig PD, McGilvray ID, Adcock LD, Girgrah N, Wong P, Kim RD, Smith R, Lilly LB, Levy GA, Cattral MS. Analysis and outcomes of right lobe hepatectomy in 101 consecutive living donors. *Am J Transplant* 2005;5:2764-9.
45. Olthoff KM, Merion RM, Ghobrial RM, Abecassis MM, Fair JH, Fisher RA, Freise CE, Kam I, Pruett TL, Everhart JE, Hulbert-Shearon TE, Gillespie BW, Emond JC. Outcomes of 385 adult-to-adult living donor liver transplant recipients: a report from the A2ALL Consortium. *Ann Surg* 2005;242:314-23, discussion 323-5.
46. Magee JC, Bucuvalas JC, Farmer DG, Harmon WE, Hulbert-Shearon TE, Mendeloff EN. Pediatric transplantation. *Am J Transplant* 2004;4 Suppl 9:54-71.
47. Hendrickson RJ, Karrer FM, Wachs ME, Slater K, Bak TE, Kam I. Pediatric liver transplantation. *Curr Opin Pediatr* 2004;16:309-13.
48. Kim JS, Broering DC, Tustas RY, Fischer L, Ganschow R, Burdelski M, Rogiers X. Split liver transplantation: past, present and future. *Pediatr Transplant* 2004;8:644-8.
49. Varela-Fascinetto G, Davila-Perez R, Hernandez-Plata A, Castaneda-Martinez P, Fuentes-Garcia V, Nieto-Zermeno J. [Pediatric liver transplantation]. *Rev Invest Clin* 2005;57:273-82.
50. Zager RA, Baltés LA, Sharma HM, Jurkowitz MS. Responses of the ischemic acute renal failure kidney to additional ischemic events. *Kidney Int* 1984;26:689-700.

51. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
52. Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 1995;29:782-8.
53. Glazier SS, O'Rourke DM, Graham DI, Welsh FA. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994;14:545-53.
54. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222:27-32.
55. Du ZY, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, Macdonald P. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant* 1996;15:1258-67.
56. Turman MA, Bates CM. Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Ren Fail* 1997;19:47-60.
57. Roth S, Li B, Rosenbaum PS, Gupta H, Goldstein IM, Maxwell KM, Gidday JM. Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:777-85.
58. Hardy KJ, McClure DN, Subwongcharoen S. Ischaemic preconditioning of the liver: a preliminary study. *Aust N Z J Surg* 1996;66:707-10.
59. Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology* 2003;125:1480-91.
60. Schwartz M. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:S268-76.
61. Rea DJ, Heimbach JK, Rosen CB, Haddock MG, Alberts SR, Kremers WK, Gores GJ, Nagorney DM. Liver transplantation with neoadjuvant chemoradiation is more effective than resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 2005;242:451-8; discussion 458-61.
62. Sotiropoulos GC, Molmenti EP, Losch C, Beckebaum S, Broelsch CE, Lang H. Meta-analysis of tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma based on 1,198 cases. *Eur J Med Res* 2007;12:527-34.
63. Koller FL, Geevarghese SK, Gorden DL. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: current role and future opportunities. *Curr Pharm Des* 2007;13:3265-73.
64. Duffy JP, Vardanian A, Benjamin E, Watson M, Farmer DG, Ghobrial RM, Lipshutz G, Yersiz H, Lu DS, Lassman C, Tong MJ, Hiatt JR, Busuttil RW. Liver transplantation criteria for hepatocellular carcinoma should be expanded: a 22-year experience with 467 patients at UCLA. *Ann Surg* 2007;246:502-9; discussion 509-11.
65. Rea DJ, Rosen CB, Nagorney DM, Heimbach JK, Gores GJ. Transplantation for cholangiocarcinoma: when and for whom? *Surg Oncol Clin N Am* 2009;18:325-37.
66. Horslen SP, Fox IJ. Hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2004;77:1481-6.
67. Nagata H, Nishitai R, Shiota C, Zhang JL, Koch CA, Cai J, Awwad M, Schuurman HJ, Christians U, Abe M, Baranowska-Kortylewicz J, Platt



- JL, Fox IJ. Prolonged survival of porcine hepatocytes in cynomolgus monkeys. *Gastroenterology* 2007;132:321-9.
68. Nishitai R, Koch CA, Ogata K, Knudsen BE, Plummer TB, Butters KA, Platt JL. Toward the survival and function of xenogeneic hepatocyte grafts. *Liver Transpl* 2005;11:39-50.
69. Baccarani U, Sanna A, Cariani A, Sainz-Barriga M, Adani GL, Zambito AM, Piccolo G, Risaliti A, Nanni-Costa A, Ridolfi L, Scalamogna M, Bresadola F, Donini A. Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience. *Liver Transpl* 2003;9:506-12.
70. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation. *Liver Transpl* 2006;12:523-34.
71. Masson S, Harrison DJ, Plevris JN, Newsome PN. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: a critical review. *Stem Cells* 2004;22:897-907.
72. Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, Walldorf J, Hengstler JG, Fleig WE, Christ B. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007;56:405-15.
73. Schuurman HJ, Pierson RN, 3rd. Progress towards clinical xenotransplantation. *Front Biosci* 2008;13:204-20.
74. Weiss MJ, Ng CY, Madsen JC. Tolerance, xenotransplantation: future therapies. *Surg Clin North Am* 2006;86:1277-96, viii.
75. Nguyen TH, Ferry N. Liver gene therapy: advances and hurdles. *Gene Ther* 2004;11 Suppl 1:S76-84.
76. Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, Lancos CJ, Prabharasuth DD, Cheng J, Moran K, Hisashi Y, Mueller N, Yamada K, Greenstein JL, Hawley RJ, Patience C, Awwad M, Fishman JA, Robson SC, Schuurman HJ, Sachs DH, Cooper DK. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med* 2005;11:29-31.
77. Chen G, Qian H, Starzl T, Sun H, Garcia B, Wang X, Wise Y, Liu Y, Xiang Y, Copeman L, Liu W, Jevnikar A, Wall W, Cooper DK, Murase N, Dai Y, Wang W, Xiong Y, White DJ, Zhong R. Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat Med* 2005;11:1295-8.
78. Naruse K, Tang W, Makuuch M. Artificial and bioartificial liver support: a review of perfusion treatment for hepatic failure patients. *World J Gastroenterol* 2007;13:1516-21.
79. Selden C, Hodgson H. Cellular therapies for liver replacement. *Transpl Immunol* 2004;12:273-88.
80. Demetriou AA, Brown RS, Jr., Busuttil RW, Fair J, McGuire BM, Rosenthal P, Am Esch JS, 2nd, Lerut J, Nyberg SL, Salizzoni M, Fagan EA, de Hemptinne B, Broelsch CE, Muraca M, Salmeron JM, Rabkin JM, Metselaar HJ, Pratt D, De La Mata M, McChesney LP, Everson GT, Lavin PT, Stevens AC, Pitkin Z, Solomon BA. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg* 2004;239:660-7; discussion 667-70.
81. Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, Tolkoff-Rubin N, Suthanthiran M, Saidman SL, Shaffer J, Preffer FI, Ding R, Sharma V, Fishman JA, Dey

- B, Ko DS, Hertl M, Goes NB, Wong W, Williams WW, Jr., Colvin RB, Sykes M, Sachs DH. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 2008;358:353-61.
82. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991;91:31S-38S.
83. Boveris A, Repetto M A., Boveris A D., Valdéz L B. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. In: Konigsberg Fainstein M, ed. Determinación del estrés oxidativo en seres humanos en situaciones clínicas. Volume 1era Edición Mexico D.F.: Manual Moderno, 2008:319-328.
84. England K, Cotter TG. Direct oxidative modifications of signalling proteins in mammalian cells and their effects on apoptosis. *Redox Rep* 2005;10:237-45.
85. Matsuzawa A, Ichijo H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:472-81.
86. Nystrom T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* 2005;24:1311-7.
87. Wei W, Liu Q, Tan Y, Liu L, Li X, Cai L. Oxidative stress, diabetes, and diabetic complications. *Hemoglobin* 2009;33:370-7.
88. Di Napoli M. New molecular avenues in Parkinson's disease therapy. *Curr Top Med Chem* 2009;9:913-48.
89. Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature* 2009;461:916-22.
90. Rinaldi S, Landucci F, De Gaudio AR. Antioxidant therapy in critically septic patients. *Curr Drug Targets* 2009;10:872-80.
91. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003;9:169-76.
92. Khatami M. Inflammation, aging, and cancer: tumoricidal versus tumorigenesis of immunity: a common denominator mapping chronic diseases. *Cell Biochem Biophys* 2009;55:55-79.
93. Aldini G, Dalle-Donne I, Facino RM, Milzani A, Carini M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Med Res Rev* 2007;27:817-68.
94. Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ, Bernlohr DA. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J Biol Chem* 2008;283:21837-41.
95. Zentella de Pina M, Piña E. Daño a proteínas. In: Konigsberg Fainstein M, ed. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. . 1era Edición ed. Mexico D.F.: Manual Moderno, 2008:97-118.
96. Smith MA, Sayre LM, Anderson VE, Harris PL, Beal MF, Kowall N, Perry G. Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J Histochem Cytochem* 1998;46:731-5.
97. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J* 1998;12:1063-73.
98. Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 1996;270:G393-400.

99. Nunez Martinez O, Clemente Ricote G, Garcia Monzon C. [Role of cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of chronic liver diseases]. *Med Clin (Barc)* 2003;121:743-8.
100. DuBois RN. The COX-2 story: is any drug completely "safe?". *Gastroenterology* 2006;130:6.
101. Rao P, Knaus EE. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci* 2008;11:81s-110s.
102. James MJ, Cook-Johnson RJ, Cleland LG. Selective COX-2 inhibitors, eicosanoid synthesis and clinical outcomes: a case study of system failure. *Lipids* 2007;42:779-85.
103. Wang D, Mann JR, DuBois RN. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2005;128:1445-61.
104. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004;56:387-437.
105. Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erikson RL. Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:1178-82.
106. Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 1995;95:1669-75.
107. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996;271:33157-60.
108. Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2--10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:367-75.
109. Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1083-8.
110. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002;105:248-58.
111. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C227-41.
112. Li Y, Zhang W, Mantell LL, Kazzaz JA, Fein AM, Horowitz S. Nuclear factor-kappaB is activated by hyperoxia but does not protect from cell death. *J Biol Chem* 1997;272:20646-9.
113. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298 ( Pt 2):249-58.
114. Kobayashi A, Imamura H, Isobe M, Matsuyama Y, Soeda J, Matsunaga K, Kawasaki S. Mac-1 (CD11b/CD18) and intercellular adhesion molecule-1 in ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G577-85.
115. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990;68:989-98.
116. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Exp Mol Pathol* 2003;74:86-93.

117. Reilly PM, Bulkley GB. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *Br J Surg* 1990;77:1323-4.
118. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *Faseb J* 1990;4:3355-9.
119. Southard JH, Marsh DC, McAnulty JF, Belzer FO. Oxygen-derived free radical damage in organ preservation: activity of superoxide dismutase and xanthine oxidase. *Surgery* 1987;101:566-70.
120. Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, Lopez-Neblina F. Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. *Exp Clin Transplant* 2004;2:174-7.
121. Komatsu H, Koo A, Ghadishah E, Zeng H, Kuhlenkamp JF, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N. Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver: evidence for a role for superoxide free radicals. *Am J Physiol* 1992;262:G669-76.
122. Lee SM, Park MJ, Cho TS, Clemens MG. Hepatic injury and lipid peroxidation during ischemia and reperfusion. *Shock* 2000;13:279-84.
123. Singh KK. Mitochondria damage checkpoint, aging, and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:182-90.
124. Lemasters JJ. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 1999;276:G1-6.
125. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:177-96.
126. Hossain MA, Wakabayashi H, Izuishi K, Okano K, Yachida S, Maeta H. The role of prostaglandins in liver ischemia-reperfusion injury. *Curr Pharm Des* 2006;12:2935-51.
127. Musiek ES, Yin H, Milne GL, Morrow JD. Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. *Lipids* 2005;40:987-94.
128. Turnage RH, Kadesky KM, Bartula L, Myers SI. Pulmonary thromboxane release following intestinal reperfusion. *J Surg Res* 1995;58:552-7.
129. Simchowitz L, Mehta J, Spilberg I. Chemotactic factor-induced generation of superoxide radicals by human neutrophils: effect of metabolic inhibitors and antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum* 1979;22:755-63.
130. Hull MA. Cyclooxygenase-2: how good is it as a target for cancer chemoprevention? *Eur J Cancer* 2005;41:1854-63.
131. Krotz F, Schiele TM, Klauss V, Sohn HY. Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction. *J Vasc Res* 2005;42:312-24.
132. Claria J, Romano M. Pharmacological intervention of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. Impact on inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* 2005;11:3431-47.
133. McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc* 1987;46:2402-6.
134. Mason RP, Hanna PM, Burkitt MJ, Kadiiska MB. Detection of oxygen-derived radicals in biological systems using electron spin resonance. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 10:33-6.

135. Saldana-Balmori Y, Zentella de Pina M, Guinzberg R, Rocha-Hernandez A, Pina E. Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 1996;317:225-9.
136. Zentella de Pina M, Corona S, Rocha-Hernandez AE, Saldana Balmori Y, Cabrera G, Pina E. Restoration by piroxicam of liver glutathione levels decreased by acute ethanol intoxication. *Life Sci* 1994;54:1433-9.
137. Zentella de Pina M, Hernandez-Tobias A, Saldana-Balmori Y, Diaz-Belmont A, Pina E. Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *FEBS Lett* 1992;298:123-5.
138. Zentella de Pina M, Saldana-Balmori Y, Hernandez-Tobias A, Pina E. Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17:1228-32.
139. Smith WL, Meade EA, DeWitt DL. Interactions of PGH synthase isozymes-1 and -2 with NSAIDs. *Ann N Y Acad Sci* 1994;744:50-7.
140. Pairet M, van Ryn J, Schierok H, Mauz A, Trummlitz G, Engelhardt G. Differential inhibition of cyclooxygenases-1 and -2 by meloxicam and its 4'-isomer. *Inflamm Res* 1998;47:270-6.
141. Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M, Suarez J, Chagoya de Sanchez V. Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Hepatology* 1990;12:242-8.
142. Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K. Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 1992;16:454-61.
143. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-9.
144. Wilbur KM, Bernheim F, Shapiro OW. The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. *Arch Biochem* 1949;24:305-13.
145. Poli G, Albano E, Dianzani MU. The role of lipid peroxidation in liver damage. *Chem Phys Lipids* 1987;45:117-42.
146. Poli G, Cutrin JC, Biasi F. Lipid peroxidation in the reperfusion injury of the liver. *Free Radic Res* 1998;28:547-51.
147. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994;233:346-57.
148. Nakamura A, Goto S. Analysis of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis. *J Biochem (Tokyo)* 1996;119:768-74.
149. Corona-Morales AA, Castell A, Zhang L. L-DOPA-induced neurotoxic and apoptotic changes on cultured chromaffin cells. *Neuroreport* 2000;11:503-6.
150. Pringle JH. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg* 1908;48:541-549.
151. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181:160-6.
152. Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002;235:400-7.

153. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;312:159-63.
154. Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 2000;32:508-15.
155. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic Res Commun* 1991;15:277-84.
156. Weber GF. The measurement of oxygen-derived free radicals and related substances in medicine. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990;28:569-603.
157. Yagi K. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. *Adv Exp Med Biol* 1994;366:1-15.
158. Meagher EA, FitzGerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1745-50.
159. Wright G, Terada K, Yano M, Sergeev I, Mori M. Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation. *Exp Cell Res* 2001;263:107-17.
160. Wieme RJ, Demeulenaere L. Enzyme assays in liver disease. *J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)* 1970;4:51-9.
161. Mori M, Miura S, Morita T, Takiguchi M, Tatibana M. Ornithine transcarbamylase in liver mitochondria. *Mol Cell Biochem* 1982;49:97-111.
162. Forman HJ, Maiorino M, Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*;49:835-42.
163. Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, Davies KJ. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291:R491-511.
164. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219:1-14.
165. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 2002;32:790-6.
166. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006;10:389-406.
167. Tadolini B, Fiorentini D, Landi L, Cabrini L. Lipid peroxidation. Definition of experimental conditions for selective study of the propagation and termination phases. *Free Radic Res Commun* 1989;5:245-52.
168. Fukai M, Hayashi T, Yokota R, Shimamura T, Suzuki T, Taniguchi M, Matsushita M, Furukawa H, Todo S. Lipid peroxidation during ischemia depends on ischemia time in warm ischemia and reperfusion of rat liver. *Free Radic Biol Med* 2005;38:1372-81.
169. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 2009;390:191-214.
170. Nordstrom G, Saljo A, Li SJ, Hasselgren PO. Effects of ischemia and reperfusion on protein synthesis in livers with different glutathione levels. *Ann Surg* 1990;211:97-102.
171. Fraternali A, Paoletti MF, Casabianca A, Nencioni L, Garaci E, Palamara AT, Magnani M. GSH and analogs in antiviral therapy. *Mol Aspects Med* 2009;30:99-110.

172. Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB. Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest* 1988;82:476-85.
173. Swartz HM, Khan N, Khramtsov VV. Use of electron paramagnetic resonance spectroscopy to evaluate the redox state in vivo. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:1757-71.
174. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991;260:G355-62.
175. Jaeschke H, Smith CW. Cell adhesion and migration. III. Leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature. *Am J Physiol* 1997;273:G1169-73.
176. Frank J, Pompella A, Biesalski HK. Histochemical visualization of oxidant stress. *Free Radic Biol Med* 2000;29:1096-105.
177. Cutrin JC, Cantino D, Biasi F, Chiarpotto E, Salizzoni M, Andorno E, Massano G, Lanfranco G, Rizzetto M, Boveris A, Poli G. Reperfusion damage to the bile canaliculi in transplanted human liver. *Hepatology* 1996;24:1053-7.
178. Arai S, Monden K, Adachi Y, Zhang W, Higashitsuji H, Furutani M, Mise M, Fujita S, Nakamura T, Imamura M. Pathogenic role of Kupffer cell activation in the reperfusion injury of cold-preserved liver. *Transplantation* 1994;58:1072-7.
179. 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.
180. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000;28:463-99.
181. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
182. Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL. Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol* 1999;36:941-8.
183. Yamamoto Y, Kume M, Yamaoka Y. Implications of heat shock proteins during liver surgery and liver perfusion. *Recent Results Cancer Res* 1998;147:157-72.
184. Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 1999;30:1-5.
185. Rostom A, Dube C, Lewin G, Tsertsvadze A, Barrowman N, Code C, Sampson M, Moher D. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2007;146:376-89.
186. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcborg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbicki R, Langer C, Moore MJ. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007;357:2040-8.
187. Aparicio Gallego G, Diaz Prado S, Jimenez Fonseca P, Garcia Campelo R, Cassinello Espinosa J, Anton Aparicio LM. Cyclooxygenase-2 (COX-2): a molecular target in prostate cancer. *Clin Transl Oncol* 2007;9:694-702.

188. Klass CM, Shin DM. Current status and future perspectives of chemoprevention in head and neck cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2007;7:623-32.
189. Arber N, Levin B. Chemoprevention of colorectal neoplasia: the potential for personalized medicine. *Gastroenterology* 2008;134:1224-37.
190. Suzuki R, Yamamoto M, Saka H, Taniguchi H, Shindoh J, Tanikawa Y, Nomura F, Gonda H, Imaizumi K, Hasegawa Y, Shimokata K. A phase II study of carboplatin and paclitacel with meloxicam. *Lung Cancer* 2009;63:72-6.
191. Montalvo-Jave E, Ortega-Salgado, A., Montalvo-Arenas, C., Carrasco-Daza, D., Castell, A., Jay, D., Gleason, R., Pina, E. COX-1 and COX-2 inhibitors ameliorates hepatic oxidative stress during ischemia reperfusion injury in the rat. *Gastroenterology* 2006;130:(Abstract) A905.
192. Montalvo-Jave EO-SJ, Carrasco-Daza D., Montalvo-Arenas C., Castell-Rodriguez A., Jay D., Gleason R., Muñoz E., Hernández-Muñoz R., Piña E. Piroxicam (COX-1) and meloxicam (COX-2) inhibitors ameliorate hepatic oxidative stress promoted by ischemia-reperfusion injury. *World J Surg* 2009.



# Role of Protein Carbonylation in Kupffer and Endothelial Cells: Cyclooxygenase 1 and Cyclooxygenase 2 Inhibitors Ameliorate Hepatic Oxidative Stress Promoted by Ischemia-Reperfusion Injury

AQ: 1

Eduardo E. Montalvo-Javé,<sup>1,2,6,7</sup> José A. Ortega-Salgado, Andrés Castel,<sup>3</sup> Daniel Carrasco-Daza,<sup>8</sup> David Jay,<sup>4,9,10</sup> Roberto Gleason,<sup>4</sup> Eduardo Muñoz,<sup>4</sup> César Montalvo-Arenas,<sup>3</sup> Rolando Hernández-Muñoz,<sup>5</sup> and Enrique Piña<sup>2</sup>

AQ: 2

Departments of <sup>1</sup>Surgery, <sup>2</sup>Biochemistry, and <sup>3</sup>Cellular and Tissue Biology, Faculty of Medicine, <sup>4</sup>Department of Physical State, Institute of Physics, and <sup>5</sup>Department of Cellular Biology, Institute of Cellular Physiology, Independent National University of Mexico, Mexico City, Mexico; <sup>6</sup>Division of Experimental Surgery, Dr. Manuel Gea González General Hospital, Secretariat of Health, Mexico City, Mexico; <sup>7</sup>Service of General Surgery, General Hospital of Mexico, Secretariat of Health, Mexico City, Mexico; <sup>8</sup>Unit of Molecular Pathology, National Institute of Pediatrics, Mexico City, Mexico; and Departments of <sup>9</sup>Pediatrics and <sup>10</sup>Pharmacology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

AQ: 3

This study was designed to assess the effects of protein carbonylation (PC) in hepatic cells and the effects of inhibitors of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 on indicators of tissular damage induced by liver ischemia-reperfusion injury (LIRI), which is unavoidable in liver surgery in general and especially in transplantation, hepatic resections, and trauma. We used male Wistar rats, which were randomly distributed into 1 sham group and 3 groups subjected to LIRI (1 untreated group and 2 groups treated with piroxicam or meloxicam). Warm ischemia was performed by partial vascular occlusion for 90 minutes, and then reperfusion was allowed. Samples were taken at the following postreperfusion times: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 12, and 24 hours. In serum, we determined the catalytic activity of the following hepatic enzymes: alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, and ornithine carbamoyltransferase. In liver samples, we studied cellular alterations by means of histological studies, and we measured lipid peroxidation markers by assaying thiobarbituric reactive substances, PC by immunohistochemistry, and apoptosis by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling technique. We also measured reactive oxygen species in bile by means of electron paramagnetic resonance. All indicators of cell injury appeared from the first hour of reperfusion and reached their maximum expression at 2 and 4 hours post-reperfusion. A sharp increase in the serum activity of the 4 hepatic enzymes was observed simultaneously with the greatest histological damage. An increase in thiobarbituric reactive substances, PC, and apoptosis was recorded, and it correlated with an elevated reactive oxygen species pool in the bile. On the basis of PC data, endothelial cells and Kupffer cells, prior to parenchymal cells, were the first to exhibit LIRI-associated oxidative damage. The administration of piroxicam or

AQ: 4

**Abbreviations:** ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; COX, cyclooxygenase; EC, endothelial cell; EPR, electron paramagnetic resonance; HEP, hepatocyte; IR, ischemia-reperfusion; KC, Kupffer cell; LDH, lactate dehydrogenase; LIRI, liver ischemia-reperfusion injury; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; OCT, ornithine carbamoyltransferase; PBN, alpha-phenyl *N*-tert-butyl nitron; PBS, phosphate-buffered saline; PC, protein carbonylation; PG, prostaglandin; ROS, reactive oxygen species; TBARS, thiobarbituric reactive substances; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling; Tx, thromboxane A<sub>2</sub>.

AQ: 5

This study was presented in part at the 2006 Annual Meeting of the American Gastroenterological Association (Digestive Disease Week) in San Francisco, CA, and was published as an abstract in *Gastroenterology* (2006;130:A905). Eduardo E. Montalvo-Javé received grants from the National Council of Science and Technology (Mexico) and from DGEP, Independent National University of Mexico (Mexico).

Address reprint requests to Eduardo E. Montalvo-Javé, M.D., F.A.C.S., Department of Surgery, Faculty of Medicine, Independent National University of Mexico, 04510 Mexico, DF, Mexico. E-mail: montalvoeduardo@hotmail.com

Address reprint requests to Enrique Piña, M.D., Ph.D., Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Independent National University of Mexico, 04510 Mexico, DF, Mexico. E-mail: eparza@servidor.unam.mx

DOI 10.1002/lt.21908

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

meloxicam during the pre-ischemic period produced a highly significant decrease in all studied injury indicators. No significant differences were revealed between the 2 drugs. In conclusion, the data reported here suggest the potential use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in minimizing ischemic event–caused damage in the liver, especially during programmed surgical intervention–related events. We also propose that PC may be employed as an adequate tool to assess tissue damage following oxidative stress during clinical interventions. *Liver Transpl* 15:000-000, 2009. © 2009 AASLD.

Received April 29, 2009; accepted August 2, 2009.

Fu

Ischemia-reperfusion (IR) injury occurs when tissue is temporarily deprived of its blood supply, and the return of the blood supply triggers an intense inflammatory response.<sup>1</sup> Liver ischemia-reperfusion injury (LIRI) comprises a complex phenomenon that occurs in many clinically important events, including hepatic surgery, transplantation, trauma, and hemorrhagic shock.<sup>2</sup> In this organ, ischemia activates Kupffer cells (KCs), which are the main source of vascular reactive oxygen formation during the initial reperfusion period.<sup>3</sup> A burst of reactive oxygen species (ROS) occurs upon the restoration of the blood flow after an IR injury.<sup>4</sup> Also, KCs generate primary cytokines such as tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, tumor necrosis factor beta, interferon gamma, and granulocyte colony stimulating factor, which enhance KC activation and promote neutrophil recruitment into the liver.<sup>5,6</sup> As part of this inflammatory response, arachidonic acid metabolites such as thromboxane A2 (Tx), prostaglandins (PGs), and leukotrienes are released.<sup>7</sup> The effects of Tx on LIRI are characterized by the stimulation of neutrophil aggregation and recruitment and the induction of platelet aggregation; both activities promote vasoconstriction and increase vascular permeability, leading to edema and thrombosis.<sup>8</sup> The effects of PG on the IR-subjected liver include, among others, inhibited ROS generation, improved insulin action and lipid metabolism, the prevention of leukocyte migration, reduced synthesis or production of membrane degradation products, the regulation of cell adhesion molecules, and hepatocyte (HEP) proliferation.<sup>9</sup> On the whole, these inflammatory responses and microcirculatory alterations further aggravate the injury after reperfusion.<sup>10,11</sup>

Moreover, ROS have been suggested to be the primary activators of the mitochondrial permeability transition pore, a large multiprotein conductance channel. The opening of this channel causes a loss in the membrane potential, mitochondrial swelling with membrane rupture, cytochrome C release, and apoptotic cell death.<sup>12,13</sup>

PG synthase, also known as cyclooxygenase (COX), is the key and first regulatory enzyme in the arachidonic cascade leading to PG, Tx, and prostacyclin synthesis.<sup>14</sup> The COX enzyme exists in 2 isoforms: COX-1, a constitutive form that is expressed in multiple cell types and is generally considered to contribute to normal tissue homeostasis maintenance,<sup>15</sup> and COX-2, an inducible form that is rapidly up-regulated in response to lipopolysaccharides, cytokines, and mitogens and is found more commonly in inflammatory and immune cells.<sup>16</sup> Tx and PG production through both COX iso-

forms is inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as piroxicam and meloxicam. Piroxicam is a preferential COX-1 inhibitor,<sup>17</sup> and meloxicam is a better COX-2 inhibitor<sup>18</sup>; both are widely used in the clinical setting and are nonspecific blockers of Tx or PG pathways.<sup>7</sup> On the basis of all the provided information, it appears reasonable to assay the role of NSAIDs in restraining the inflammatory response observed after LIRI. One factor in favor of this proposal is our previous study, which showed a beneficial action of aspirin, naproxen, nimesulide, and piroxicam in alternative models of hepatic ROS generation such as acute ethanol intoxication: these NSAIDs prevented hepatic increases in lipids and thiobarbituric reactive substances (TBARS) and a decrease in glutathione produced after ethanol ingestion.<sup>19-22</sup> Thus, this study was focused on evaluating the effect of protein carbonylation (PC) in hepatic cells and the protective effects of piroxicam or meloxicam during a 24-hour temporal course after reperfusion in a rat warm-ischemia model.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

After approval by the animal care and ethics committee of the Dr. Manuel Gea Gonzalez General Hospital (Mexico City, Mexico), we used male Wistar rats, weighing 250 to 300 g, that were obtained from the Animal Facility of the Independent National University of Mexico School of Medicine. They were fed commercial rat chow (Purina, Mexico) and water ad libitum under a dark-light cycle of 12 hours, and they were maintained at a constant temperature of 22°C.

The rats were randomly divided into 4 study groups (n = 10 for each) as follows: (I) a sham group (a surgical procedure without vascular clamping), (II) an IR group without the administration of any drug, (III) a group of animals subjected to the IR protocol and treated with piroxicam (13 mg/kg; Pfizer, Mexico), and (IV) a group of animals treated with meloxicam (0.9 mg/kg; Boehringer Ingelheim, Mexico). Drugs were administered intraperitoneally 1 hour prior to surgery.

A warm hepatic IR model was used. Arterial and portal venous blood supplies were interrupted to cephalad lobes of the liver for 90 minutes with a vascular atraumatic clamp in groups II, III, and IV, and this was followed by a variable reperfusion time. Samples for specific determinations were taken at 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 12, and 24 hours during the reperfusion period.

## Surgical Procedure

After a 12-hour fasting period with water ad libitum, under general anesthesia with xylazine (100 mg/kg) and ketamine (13 mg/kg; Pisa, Mexico), rats were placed in a dorsal decubitus position, and by means of a mid-longitudinal incision, the peritoneal cavity was dissected by planes with bipolar electrocautery. After dissection and gut mobilization to the right, the portal vein, hepatic duct, and hepatic artery were identified and subjected to ischemia with a microvascular clamp (Braun-Aesculap, Germany), the hepatic blood flow being interrupted. After 90 minutes of partial hepatic warm ischemia, the clamp was removed, and this initiated hepatic reperfusion. During the surgical procedure, the animals were kept hydrated intraperitoneally with an isotonic saline solution at 36.5°C with a flow of 15 mL/kg/hour; throughout the surgical procedure and recovery, rats were placed on a neonatal thermal pad at 36.5°C to avoid hypothermia. Liver samples were taken from the right lateral and median lobe for analytical procedures. The abdominal cavity was closed in planes with a Polyglactin 910 5-0 gastrointestinal suture (Ethicon-J&J, New York). Animals placed on the neonatal thermal pad were monitored during their postoperative period for the following 4 hours and were then placed in the animal fence-in for 24 hours.

## Assessment of Hepatic Function

Blood samples were taken from suprahepatic veins 0.5 to 24 hours after hepatic reperfusion to determine serum enzyme levels (activities) of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, and ornithine carbamoyltransferase. Each sample was placed in an Eppendorf tube and centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes; the serum was obtained with a Pasteur pipette, transferred to new Eppendorf tubes, and processed routinely with a universal kit (Bayer, Mexico). The ornithine carbamoyltransferase activity was determined with the method of Ceriotti.<sup>23</sup>

## Histopathological Study

Hepatic damage was assessed as a function of acinus and/or lobular affection, which has been well characterized in acute, subacute, and chronic hepatitis as well as hepatic ischemic injury.<sup>24,25</sup> In fixed paraffin-embedded liver samples, we assessed the following variables: hepatocellular necrosis, congestion and vascular ectasia, and the type and amount of inflammatory infiltrates. We used a conventional scale: minimal (<25%), moderate (25%-50%), and severe (>50%). Determinations were performed for a minimum of 10 portal spaces chosen at random. The stains used were those considered routine for the evaluation of hepatic damage and consisted of hematoxylin-eosin, Masson, and periodic acid-Schiff stains with and without diastase.

## TBARS Assay

Liver homogenates (1:3 wt/vol) in a phosphate-buffered saline (PBS) buffer (pH 7.4) were obtained from hepatic samples of each experimental group. After filtration, homogenates were incubated at 37°C under shaking for 30 minutes. At the end of the incubation period, 20% acetic acid (Sigma, Mexico) and 0.8% thiobarbituric acid (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO), previously dissolved in a phosphate buffer, were added. The mixture was boiled for 45 minutes to complete the chemical reaction, and the tubes were covered with marbles to avoid evaporation; 2% KCl was added. The developed color was extracted with 15:1 *n*-butanol-pyridine (Sigma, Mexico), mixed, and centrifuged at 5000 rpm. Finally, the pink supernatant was read at 532 nm with a Beckman 650 photometer (Beckman, Germany). The protein was determined according to the Bradford method for calculating TBARS per milligram of protein.<sup>21,26</sup>

## Electron Paramagnetic Resonance (EPR) in Bile Samples

The intravenous administration (through the portal vein) of the spin-trap alpha-phenyl *N*-tert-butyl nitron (700 mg/kg) in dimethyl sulfoxide was carried out 5 minutes prior to reperfusion. Bile samples (1.5-2.0 mL each) were collected by the placement of a PE-23 (tubing) cannula (Becton Dickson & Co., Sparks, MD) into the common bile duct, and bile was sequentially collected over the following 120 minutes (*n* = 5 per group). Bile samples were then frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until EPR measurements were taken. Thawed bile samples were transferred into flat quartz EPR cells (model WG-812, Wilmad-Lab Glass, United States) and studied in an EPR spectrometer (e-Line Century series, Varian, United States). Typical EPR operating conditions were as follows: gain,  $5 \times 10^4$ ; modulation amplitude, 2.0 G; modulation frequency, 100 kHz; microwave power, 2 mW; and time constant, 0.5 minutes. The sweep time for each spectrum was recorded for 4 minutes at room temperature. Ten scans were typically accumulated (we observed no change in the signal intensity during data accumulation) to average out and intensify the weak signals observed, which were first detected with an Agilent model 54622A oscilloscope (Agilent, United States). Excel Microsoft software was employed to manipulate data. Relative EPR signal intensities were assessed by the measurement of the height of the EPR peaks in millimeters under standardized spectrometer conditions.

## Immunohistochemistry of PC

The rate of oxidized protein was followed with an immunohistochemical reaction, for which a biotin-streptavidin-peroxidase complex method was used. Tissues were fixed in ethanol for 2 hours and then embedded in paraffin. Sections of 2 and 3 mm were made, and immunostaining was achieved by the



marked polymer technique with EnVision HRP+ (Dako Corp., Carpinteria, CA). To modify the antibody binding site, we employed 0.1% 2,4-dinitrophenylhydrazine (Sigma Chemicals) in 2 N HCl. Samples were treated with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in an aqueous medium for 5 minutes to block endogenous peroxidase activity. Samples were treated with 1% bovine serum albumin dissolved in PBS for 5 minutes to eliminate unspecific binding sites. Then, they were incubated for 45 minutes with the anti-2,4-dinitrophenol (1:1) monoclonal antibody (Zymed-Invitrogen, CA, United States); this was followed by the addition of the polymer conjugated with peroxidase and the anti-mouse secondary antibody for 30 minutes. To visualize the reaction, 3,3'-diaminobenzidine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dako) was used as a substrate. As a negative control, we used normal mouse serum in PBS instead of the primary antibody. The whole tissue was immunohistochemically analyzed. Positive and negative interpretations were based on standard criteria consisting of a staining affinity of <10% of the cell population with specific immunolocalization (membrane staining), and the staining intensity was considered as follows: (+) weak, (++)/ (++++) moderate, and (+++++) intense. A positive control for the immunohistochemical mounting technique was performed with cerebral tissue from 1 patient with Alzheimer's disease according to the technique published by Smith et al.<sup>27</sup>

### Immunohistochemistry of CD34 and CD68

For immunohistochemical studies, 2- $\mu$ -thick sections were treated with 0.1 M sodium citrate (pH 6.0) and Tween 20 for the unraveling of epitopes. Endogenous peroxidases were blocked with 0.3% hydrogen peroxide, and this was followed by incubation with 1% bovine serum albumin in PBS for 5 minutes to eliminate nonspecific binding. Monoclonal antibodies were used against CD34 (clone QBEnd 10, Dako; 1:50 dilution) in this study. The sections were incubated with primary antibodies for 45 minutes. After the primary antibodies, the sections were incubated for 30 minutes with biotinylated anti-mouse/anti-rabbit antibody, and this was followed by similar incubation with the streptavidin/peroxidase complex (labeled streptavidin biotin horseradish peroxidase; Dako). The reaction products were visualized with 3,3'-diaminobenzidine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and subsequently washed with a PBS buffer for 4 minutes. The sections were also incubated with CD68 antibody (clone PG-M1, Dako; 1:150 dilution). Sections were then incubated with biotinylated anti-mouse/anti-rabbit antibody and with the streptavidin/phosphatase alkaline complex for 30 minutes each (labeled streptavidin biotin/phosphatase alkaline; Dako). The reaction products were visualized with a new fuchsin substrate (Biogenex, San Ramon, CA). Sections were subsequently counterstained with Gill hematoxylin solution. Normal liver samples were used as positive controls; as a negative control, PBS was applied as a substitute for primary antibodies.

### Assessment of Apoptosis by Light Microscopy Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate Nick-End Labeling (TUNEL) Assay

Apoptosis was assessed by the detection of DNA fragmentation with an in situ TUNEL assay under light microscopy. Liver slides were processed with an ApopTag in situ apoptosis detection kit (Intergen Co., United States) according to the manufacturer's instructions. Briefly, liver tissue slides were pretreated with proteinase K and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and incubated with a reaction mixture containing terminal deoxynucleotidyl transferase and digoxigenin-conjugated deoxyuridine triphosphate for 1 hour at 37°C. The labeled DNA was visualized with horseradish peroxidase-conjugated anti-digoxigenin antibody with diaminobenzidine as the chromogen. For a negative control, the terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme was omitted from the reaction mixture. As previously described by Corona-Morales et al.,<sup>28</sup> 10 portal spaces of each culture were randomly chosen, and positively stained cells were counted.

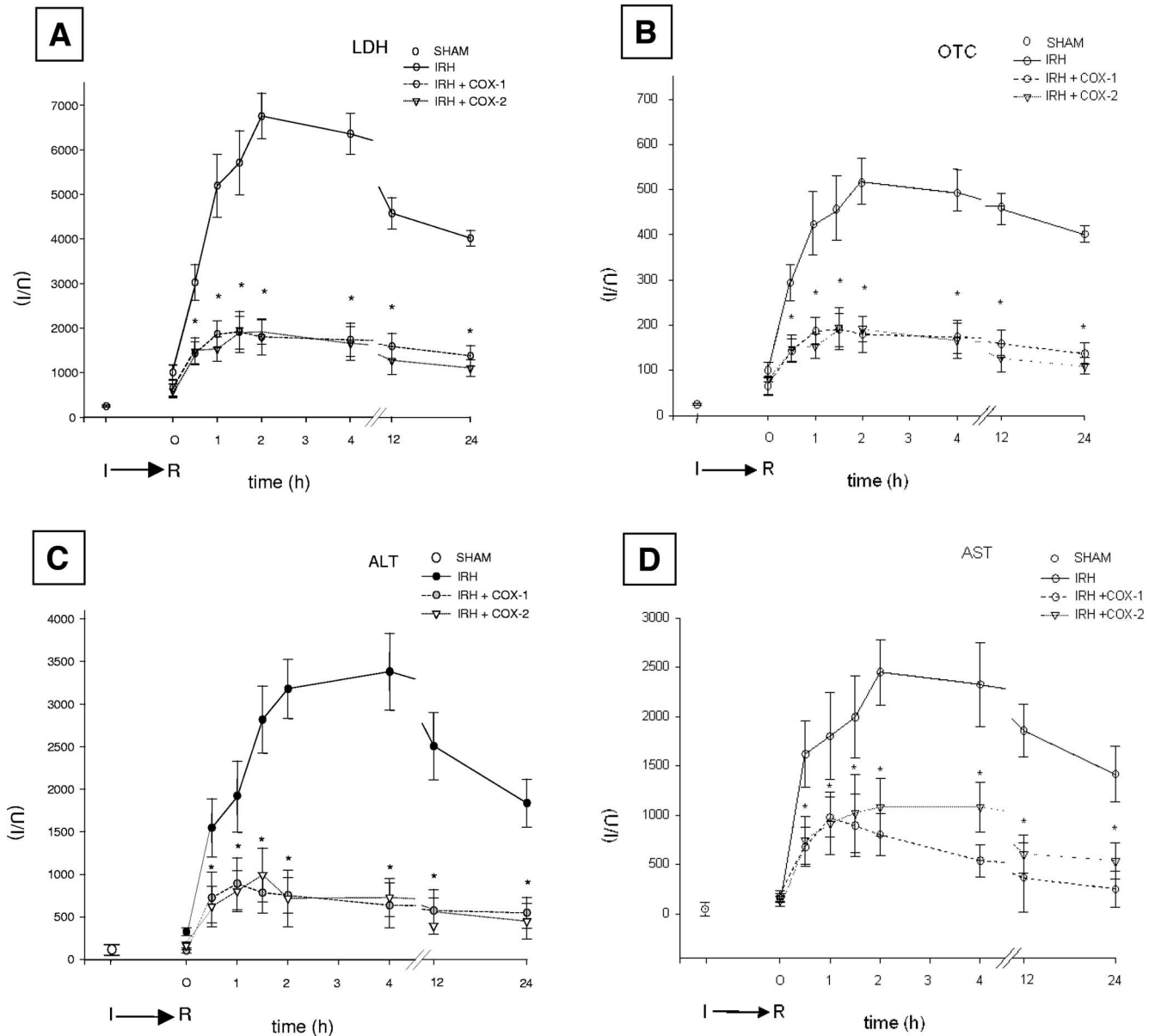
### Statistics

The Kruskal-Wallis test was employed to assess whether differences existed between the studied groups. When statistically significant differences were revealed, the Mann-Whitney test was used to compare the studied groups in order to identify statistical differences with  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Serum Activity of the Liver Enzymes

In this work, we used 6 different indicators of liver damage produced by IR; only 1 of these, the serum enzyme assay, is regularly used in clinical practice. Thus, the Results section is initiated with the presentation of progressive changes in the serum activity of liver enzymes during the experimental protocol. The idea was to expedite a correlation between the values of increased serum enzymes from the liver and the magnitude of liver damage observed after the assay with other indicators. Blood samples were taken from suprahepatic veins at different times after LIRI to assay the catalytic activity of the released liver enzymes. The sham group (I) depicted normal serum values of liver enzymes during the experiment, as shown in Fig. 1A; the recorded values of the studied enzymes were substantially higher after 1 hour of reperfusion (Fig. 1B-D). The pattern of change in the serum activity was similar for the liver enzymes mainly present in cell cytosol (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and lactate dehydrogenase) in comparison with enzymes localized within the mitochondrial space.<sup>29,30</sup> Either piroxicam or meloxicam treatment partially prevented, in a similar fashion, the release of serum enzymes 2, 4, and 12 hours post-reperfusion (Fig. 1).



**Figure 1. Serum values of the liver enzyme activity: ALT, AST, LDH, and OCT patterns in a 24-hour period. The values are expressed in international units per liter. Statistically significant differences at the different times tested are indicated by an asterisk ( $P < 0.05$ ). Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; COX, cyclooxygenase; LDH, lactate dehydrogenase; OCT, ornithine carbamoyltransferase.**

### Histological Changes

LIRI-associated histological changes followed the tissular evolution described for many organs and systems subjected to similar stress. During the ischemic period (90 minutes), no inflammatory cells, no damage to microcirculation (stasis), and no necrosis were observed in the 3 groups of IR-subjected animals. Once reperfusion had been initiated and at 60 minutes (1 hour), the sole group affected was the untreated IR group, which exhibited the focal presence of apoptotic bodies as well as edema and congestion. These findings were initially found in the COX-1-inhibited group (III) and in the COX-2-inhibited group (IV) at 2 hours until a plateau was reached, which

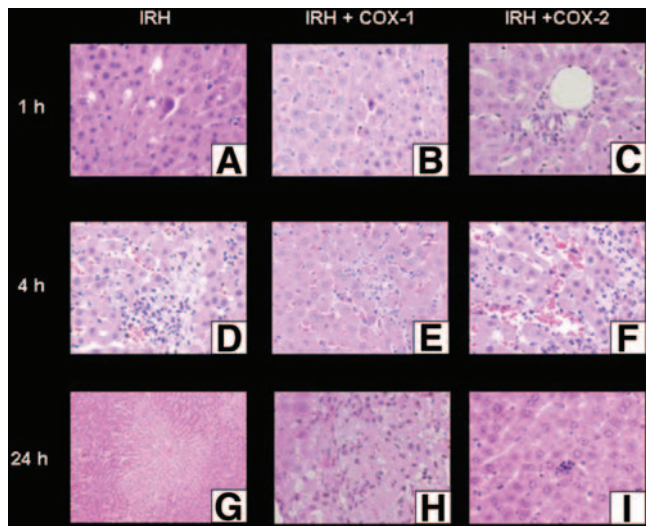
was accompanied by the presence of inflammatory cells, apoptosis, and congestion. Necrosis appeared first in the untreated IR group at 2 hours and at 4 hours in both NSAID-treated groups, and it was absent at 12 hours in the untreated IR group, becoming bridges and remaining focal in piroxicam-treated animals and meloxicam-treated animals (Fig. 2).

F2

### Presence of ROS Measured Indirectly by TBARS and Directly by EPR

Levels of TBARS, a widely used indicator of lipid peroxidation due to the presence of ROS, were significantly

FOFOFO



**Figure 2. Representative hematoxylin-eosin staining of the liver. (A)** After 1 hour of reperfusion, apoptotic bodies (3) and minimal inflammatory cells were found. **(B)** An apoptotic body (1) without inflammatory cells. **(C)** Normal hepatic preservation. **(D)** In contrast, after 4 hours of reperfusion, liver samples exhibited focal necrosis areas and moderate inflammatory cells. **(E)** Focal necrosis and minimal inflammatory cells. **(F)** Lower focal necrosis. **(G)** After 24 hours of reperfusion, the ischemia-reperfusion group showed dropout and severe necrosis. **(H,I)** Samples from livers treated with COX-1 or COX-2 inhibitors showed scant focal necrosis and fewer inflammatory cells. The original amplifications were 10× and 20×. Abbreviation: COX, cyclooxygenase.

AG: 8

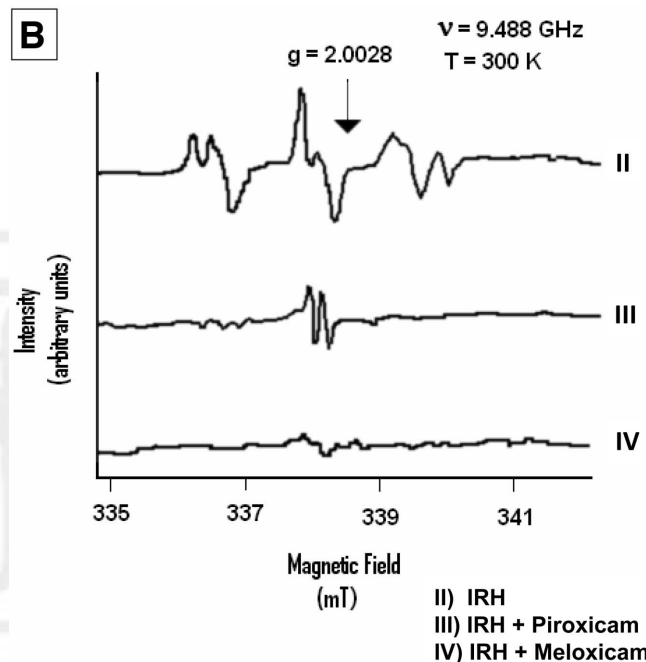
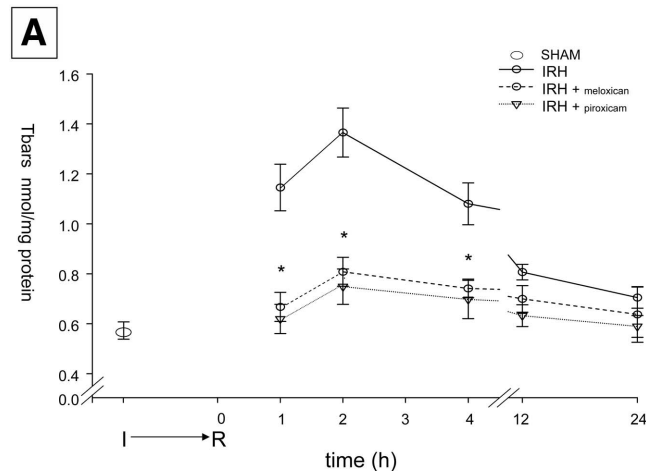
higher in the IR group than in the sham group. The piroxicam-treated and meloxicam-treated groups both demonstrated reduced levels of TBARS after IR in comparison with the IR group alone (Fig. 3A). In a parallel fashion and as in the release of liver enzymes, there were significant differences in the TBARS levels between untreated and treated groups, which were noted 4 to 8 hours after reperfusion. No significant differences were found between the treated groups.

F3

As shown in Fig. 3B, when bile samples were taken from the bile duct during the liver reperfusion phase to measure the ROS pool directly, a decline in the signal intensity in NSAID-treated groups was observed in comparison with the untreated IR group. No ROS presence was found in the sham group. However, a small paramagnetic signal could be detected in the majority of the bile samples analyzed, including those from the sham group and those from the treated and untreated IR groups (see the arrow in Fig. 3B). This spectral feature was detected even in the absence of alpha-phenyl *N*-tert-butyl nitron, indicating the presence of a small amount of a paramagnetic species in the bile, and although its chemical nature could not be determined, this presented characteristics (isotropic and centered around  $g = 2.0028$ ) associated with a non-metal-centered free radical.

**PC**

An analysis of the PC phenomenon in the 3 IR groups at progressive times revealed that no PC generation oc-

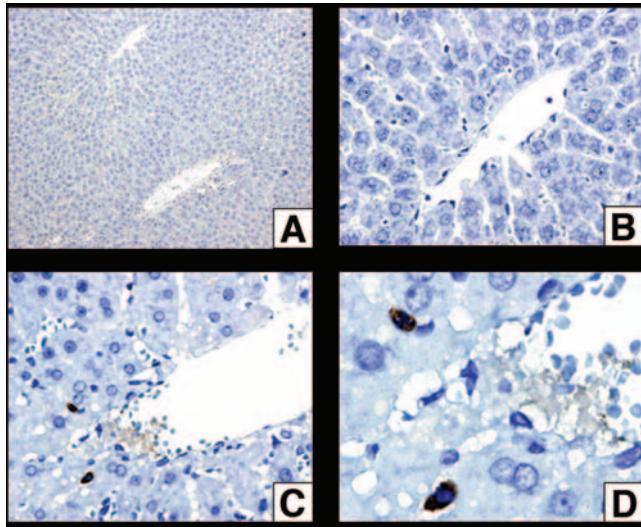


**Figure 3. (A) Liver TBARS content. In the sham group (I), a basal value of  $0.58 \pm 0.3$  was obtained, whereas in the ischemia-reperfusion group without treatment (II), the presence of TBARS was higher after 1, 2, and 4 hours in comparison with the cyclooxygenase 1-treated group (III) and cyclooxygenase 2-treated group (IV); a statistical difference is indicated by an asterisk. No significant difference was found between the nonsteroidal anti-inflammatory drug-treated groups. A molar extinction coefficient of  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  was used to estimate the values. (B) EPR. We used the free-radical spin-trap PBN to detect reactive oxygen species directly in bile samples obtained after ischemia. As controls, we analyzed the samples of the sham group (I) with and without PBN and the samples of each experimental group without PBN. No additional reactive oxygen species could be detected in these groups (data not shown); however, the Results section has a description of the spectral feature centered around  $g = 2.0028$  (arrow). The EPR parameters were as described in the Materials and Methods section. Abbreviations: EPR, electron paramagnetic resonance; PBN, alpha-phenyl *N*-tert-butyl nitron; TBARS, thiobarbituric reactive substances.**

curred during the first 90 minutes of the experiment (ischemia time), with the exception of positive staining in KCs in group II (Fig. 4). In addition, positive PC

F4





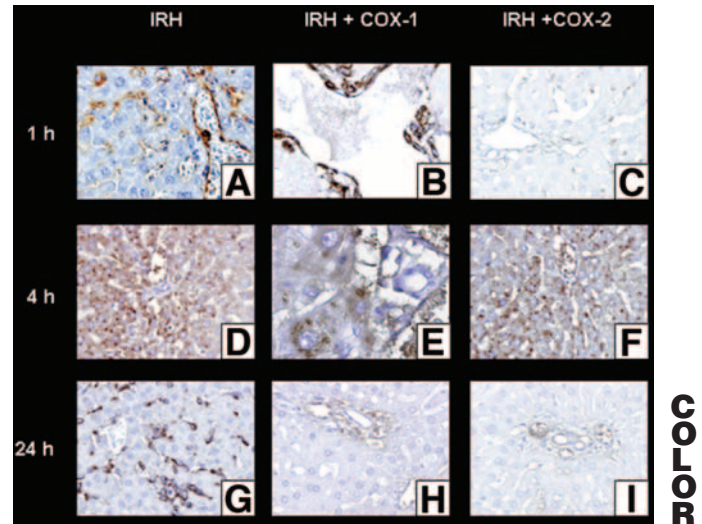
**Figure 4.** Liver expression of protein carbonylation at the end of the ischemia time. The sham group showed normal histopathology (A) in 1 portal triad and (B) in the central vein; endothelial cells, Kupffer cells, and hepatocytes were negative to staining. (C,D) In contrast, liver samples from the untreated ischemia-reperfusion group (II) after 90 minutes of ischemia showed staining in Kupffer cells. These samples were taken before the reperfusion phase. This observation was not made in animals from groups III and IV. The amplifications were (A) 100 $\times$ , (B,C) 40 $\times$ , and (D) 20 $\times$ .

AG: 6

appeared in endothelial cells (ECs) from the untreated IR group but not from NSAID-treated groups from the beginning of reperfusion. The same expression pattern was retained for the following 30 to 60 minutes, with only slight intensity changes and initial compromising of KCs. At 90 minutes, the 3 groups showed PC in the previously defined cells (ECs, KCs, and HEPs). The cell population number and PC signal intensity remained constant at 2 and 4 hours in the 3 groups; at 12 hours, the disappearance of PC was observed, mainly in HEPs. During the following 12 hours and up to 24 hours after reperfusion was initiated, PC was absent in HEPs and KCs in COX-treated groups. During this period, the signal remained in KCs and ECs from the untreated IR group (Fig. 5). To confirm cell identity, CD68-specific and CD34-specific labeling of KCs and ECs, respectively, was performed as described in the Material and Methods section and visualized by light microscopy (Fig. 6). As shown in Fig. 5, during the first postreperfusion hour, ECs and KCs intensively expressed the marker (+++), which was not found in the HEPs (-); at 4 hours, the expression of the carbonyl groups was similar in the studied populations (++/+++), and at 24 hours, the expression persisted in the ECs and KCs (++) and was negative in the HEPs. As an effect of the IR injury, ROS were released that reached the portal and systemic circulation; this event was demonstrated by the expression of carbonylation in the liver ECs; as the injury progressed, it extended to the KCs because of their protective function. Other studies have demonstrated the participation of ECs and KCs, but in an indirect way; the applied immunohistochemistry (PC) demonstrated in vivo the damage to these cells.

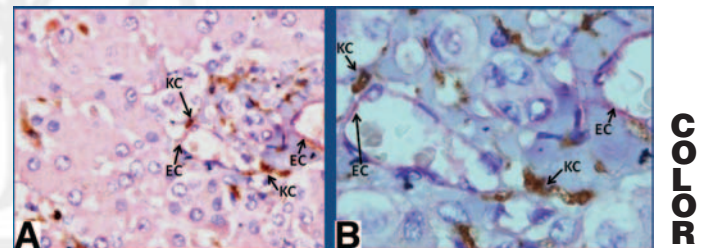
F5

F6



**Figure 5.** Liver expression of PC after reperfusion. After 1 hour of reperfusion, the untreated ischemia-reperfusion group showed (A) PC in ECs (+++) and KCs (+++). In contrast, livers treated with COX-1 or COX-2 inhibitors showed PC in (B) ECs (++) and (C) ECs (+), respectively. (D-F) After 4 hours of reperfusion, we observed PC in ECs, KC, and hepatocytes (+/++++). After 24 hours of reperfusion, liver samples were characterized by (G) PC in ECs and KC (++) and (H,I) PC in ECs (++) . The amplifications were (A,C-E,G-I) 20 $\times$ , (B), 40 $\times$ , and (F) 100 $\times$ . Abbreviations: +, weak; ++/++++, moderate; +++++, intense; COX, cyclooxygenase; EC, endothelial cell; KC, Kupffer cell; PC, protein carbonylation.

AG: 9



**Figure 6.** Immunohistochemistry to CD34 and CD68. Liver samples of a portal space showed immune expression (red for ECs and brown for KCs). The amplifications were (A) 40 $\times$  and (B) 100 $\times$ . Abbreviations: EC, endothelial cell; KC, Kupffer cell.

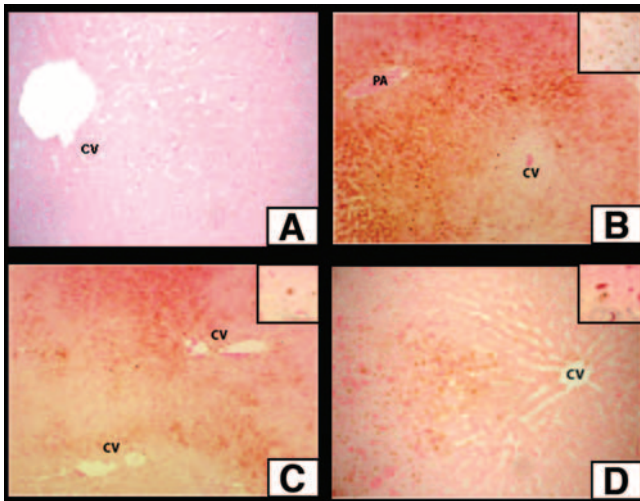
### Apoptosis During Liver IR

As shown in Fig. 7, TUNEL-positive cells were rarely found in livers treated with piroxicam or meloxicam in comparison with the IR group. In the sham group, 1 or 2 cells were found, and this was considered a normal finding. The most relevant data were obtained after 4 hours of reperfusion. Brown cells were considered positive for apoptosis, and a few red cells were observed in the sinusoidal space.

F7

### DISCUSSION

The model reproduces the main events found in the clinical practice of surgeons and gastroenterologists interested in the liver, such as portohepatic ischemia induced by the Pringle maneuver,<sup>31,32</sup> with its modi-



**Figure 7. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling technique. (A) In the sham group,  $5 \pm 2$  apoptotic cells were observed per portal space. (B) Statistically significant differences were found in a comparison of the untreated group and the group that underwent hepatic ischemia-reperfusion;  $101 \pm 35$  apoptotic cells were observed per portal space versus (C)  $41 \pm 11$  apoptotic cells per portal space in the hepatic ischemia-reperfusion and piroxicam group and (D)  $37 \pm 6$  apoptotic cells per portal space in the hepatic ischemia-reperfusion and meloxicam group. No statistical difference was found between groups III and IV. The amplifications were  $40\times$  and  $10\times$ , respectively.**

AG: 10

fications or indications according to each case, or in all conditions that reduce arterial and/or venous flow.<sup>33-37</sup>

A striking fact of the results as a whole is that once a change was detected in 1 of the assayed hepatic injury indicators, a similar variation in time and magnitude occurred in the remaining liver damage indicators. These changes emerged previously and were quantitatively higher in the IR group than in the NSAID-treated animals (eg, compare data from Figs. 1 and 5), but a close correlation among these is clear, mainly during the first 4 hours post-reperfusion. These synchronized points suggest a cellular response to IR that is apparently triggered by a burst in ROS production, which is followed by a domino effect that spreads the injury in an amplification cascade. KC activation during the initial reperfusion period appears to cause the sudden generation of ROS once restoration of the blood flow occurs.<sup>3,38</sup>

Our data on PC are in agreement with evidence that the initial damage occurs in KCs and additionally in ECs (Fig. 5A). The ROS burst impinges upon cellular constituents, such as proteins and lipids, to establish oxidative stress in which ROS generation surpasses cellular mechanisms to promote their disappearance. Moreover, activated KCs generate primary cytokines that enhance KC activation and promote neutrophil recruitment into the liver, which can create a vicious circle that further increases the ROS pool.<sup>3,37,39,40</sup> This higher ROS pool was manifested by a progressive accumulation of PC observed in KCs and ECs and later in

HEPs (Fig. 5D-F). Following this line of thought, we found that ROS reached lipids in cell membranes to promote the enhanced production of TBARS (Fig. 3A) and in the ROS pool directly measured in bile (Fig. 3B). ROS-mediated injury to proteins and lipids led to cell necrosis (Fig. 2), apoptosis (Fig. 8), and more rapid release of hepatic enzymes from parenchymal cells to serum (Fig. 1).

AG: 7

Lipids in the hepatic tissue were assessed by the formation of TBARS adducts; this is not a specific method for the affected lipids, but it provided the amount of oxidized lipids needed in the analyzed samples. These results were evident from the first hour onward; they reached their maximal biochemical expression within the first 2 to 4 hours post-reperfusion (Fig. 3A). The decline started around 24 hours, and it could have been due to the exhaustion of the oxidizable sources or a halt in their release due to cell death by apoptosis or necrosis.

Notwithstanding this, the relevant finding in this work is the ability of piroxicam and meloxicam to lower ROS levels, presumably at the level of KCs and ECs, during the initial reperfusion period. Data from Fig. 4 are relevant because they demonstrate that PC occurred at the very beginning of reperfusion in the untreated rats, whereas in the COX-treated groups, PC presented only at a later stage and with much lower severity. The present results suggest that PC is not solely another of the deleterious and causative agents in ischemic hypoxic tissular damage but rather is probably one that underlies many of the important events observed (Fig. 5).

The usefulness of this finding lies in the possibility of correlating it with serum enzyme values, an apoptosis index by TUNEL, and ROS (malondialdehyde and EPR), which could indicate progression of the damage. This would allow the use of this parameter as a tissular monitoring tool with clinical significance.<sup>41-44</sup>

In summary, the anti-inflammatory-mediated ability to lower ROS values also reduced PC, TBARS, EPR signals in bile, necrosis, apoptosis, and the release of hepatic enzymes in serum. No experiments were carried out to define specifically whether this effect was mainly due to a preventive action of NSAIDs on ROS generation or an effect of the drugs in promoting ROS disappearance. Importance was assigned to describing a hepatoprotector action of 2 NSAIDs, at least during the initial 24 hours after reperfusion. These results are in agreement with our previous work that showed a hepatoprotective action of other NSAIDs in preventing certain deleterious effects of acute ethanol intoxication.<sup>20-22</sup> The hepatoprotective action of aspirin on acetaminophen-induced liver injury has been reported by other authors.<sup>45,46</sup> In this respect, the work of Imaeda et al.<sup>47</sup> is also of relevance because the authors found that the action of aspirin is due to down-regulation of pro-inflammatory cytokines. In addition, this group identified the requirement of toll-like receptor 9 and the nacht domain, leucine-rich repeat, and PYD-containing protein 3 inflammasome for acetaminophen-induced hepatotoxicity.

AG: 6



Recently Hamada et al.<sup>48</sup> showed in COX-2-deficient mice significantly decreased levels of interleukin 2 as well as interleukin 12, a cytokine known to have a central role in T helper 1 effector cell differentiation; previously, Ozturk and Gezici<sup>49</sup> showed that celecoxib has beneficial effects in IR injury and may protect the liver. These data correlate with our findings in this experimental study.

Further experiments are required with drugs from the anti-inflammatory pharmacological group in order to define the compound with fewest contraindications and adverse effects that could be used as an elective hepatoprotective compound.<sup>50-53</sup> The use of such a putative compound could be of particular utility in programmed cases of IR. Because damage occurs from the first hour and is proportional to the duration of the ischemic event, the effects on the function and viability of the liver will depend on the promptness and effectiveness of the pharmacological intervention.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Benjamín León, Andrés Montiel-Rodríguez, Carolina Baños-Galeana, Carmen Peña-Jiménez, Jorge García-Loya, and Graciela Villeda-Rodríguez (Department of Surgery, Faculty of Medicine, Independent National University of Mexico) for their technical assistance with animal care and malondialdehyde samples, and they also thank Beatriz Hernández for performing the TUNEL assay (Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Independent National University of Mexico). The cerebral sample was donated by Jesús D. Rembao-Bojórquez, head of the Department of Pathology at the National Institute of Neurology and Neurosurgery (Mexico City, Mexico).

## REFERENCES

- Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Pina E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008; 147:153-159.
- Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 2000; 32:508-515.
- Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G15-G26.
- Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca<sup>2+</sup> overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H2024-H2034.
- Mosher B, Dean R, Harkema J, Remick D, Palma J, Crockett E. Inhibition of Kupffer cells reduced CXC chemokine production and liver injury. *J Surg Res* 2001;99:201-210.
- Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181:160-166.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998;12:1063-1073.
- Turnage RH, Kadesky KM, Bartula L, Myers SI. Pulmonary thromboxane release following intestinal reperfusion. *J Surg Res* 1995;58:552-557.
- Hossain MA, Wakabayashi H, Izuishi K, Okano K, Yachida S, Maeta H. The role of prostaglandins in liver ischemia-reperfusion injury. *Curr Pharm Des* 2006;12:2935-2951.
- Arii S, Teramoto K, Kawamura T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10:189-194.
- Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2003;125:1246-1257.
- Wood KC, Gladwin MT. The hydrogen highway to reperfusion therapy. *Nat Med* 2007;13:673-674.
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;43:S31-S44.
- Wang D, Mann JR, DuBois RN. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2005;128:1445-1461.
- Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, Jennette JC, et al. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 1995;83:473-482.
- Berg DJ, Zhang J, Weinstock JV, Ismail HF, Earle KA, Alila H, et al. Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice. *Gastroenterology* 2002;123:1527-1542.
- Smith WL, Meade EA, DeWitt DL. Interactions of PGH synthase isozymes-1 and -2 with NSAIDs. *Ann N Y Acad Sci* 1994;744:50-57.
- Pairet M, van Ryn J, Schierok H, Mauz A, Trummlitz G, Engelhardt G. Differential inhibition of cyclooxygenases-1 and -2 by meloxicam and its 4'-isomer. *Inflamm Res* 1998; 47:270-276.
- Saldana-Balmori Y, Zentella de Pina M, Guinzberg R, Rocha-Hernandez A, Pina E. Piroxicam modifies the effects of ethanol on isolated rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 1996;317:225-229.
- Zentella de Pina M, Corona S, Rocha-Hernandez AE, Saldana Balmori Y, Cabrera G, Pina E. Restoration by piroxicam of liver glutathione levels decreased by acute ethanol intoxication. *Life Sci* 1994;54:1433-1439.
- Zentella de Pina M, Saldana-Balmori Y, Hernandez-Tobias A, Pina E. Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17: 1228-1232.
- Zentella de Pina M, Hernandez-Tobias A, Saldana-Balmori Y, Diaz-Belmont A, Pina E. Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *FEBS Lett* 1992;298:123-125.
- Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M, Suarez J, Chagoya de Sanchez V. Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Hepatology* 1990; 12:242-248.
- Ikedo T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K. Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 1992;16:454-461.
- Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-699.
- Wilbur KM, Bernheim F, Shapiro OW. The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. *Arch Biochem* 1949;24:305-313.
- Smith MA, Sayre LM, Anderson VE, Harris PL, Beal MF, Kowall N, Perry G. Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J Histochem Cytochem* 1998;46:731-735.
- Corona-Morales AA, Castell A, Zhang L. L-DOPA-induced

- neurotoxic and apoptotic changes on cultured chromaffin cells. *Neuroreport* 2000;11:503-506.
29. Wright G, Terada K, Yano M, Sergeev I, Mori M. Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation. *Exp Cell Res* 2001;263:107-117.
  30. Diaz-Juarez J, Rivera-Valerdi L, Bernal-Cerrillo DE, Hernandez-Munoz R. Predominance of released mitochondrial enzymes by partial hepatectomy-induced rat regenerating liver is controlled by hemodynamic changes and not related to mitochondrial damage. *Scand J Gastroenterol* 2006;41:223-233.
  31. Pringle JH. V. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg* 1908;48:541-549.
  32. Garcea G, Gescher A, Steward W, Dennison A, Berry D. Oxidative stress in humans following the Pringle manoeuvre. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006;5:210-214.
  33. Richardson JD. Changes in the management of injuries to the liver and spleen. *J Am Coll Surg* 2005;200:648-669.
  34. Tsung A, Geller DA. Workup of the incidental liver lesion. *Adv Surg* 2005;39:331-341.
  35. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, et al. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg* 1999;229:369-375.
  36. Clavien PA, Emond J, Vauthey JN, Belghiti J, Chari RS, Strasberg SM. Protection of the liver during hepatic surgery. *J Gastrointest Surg* 2004;8:313-327.
  37. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003;125:917-936.
  38. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 1991;13:83-95.
  39. Cavalieri B, Mosca M, Ramadori P, Perrelli MG, De Simone L, Colotta F, et al. Neutrophil recruitment in the reperused-injured rat liver was effectively attenuated by repertaxin, a novel allosteric noncompetitive inhibitor of CXCL8 receptors: a therapeutic approach for the treatment of post-ischemic hepatic syndromes. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005;18:475-486.
  40. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996;23:506-514.
  41. Frank J, Pompella A, Biesalski HK. Histochemical visualization of oxidant stress. *Free Radic Biol Med* 2000;29:1096-1105.
  42. Fukai M, Hayashi T, Yokota R, Shimamura T, Suzuki T, Taniguchi M, et al. Lipid peroxidation during ischemia depends on ischemia time in warm ischemia and reperfusion of rat liver. *Free Radic Biol Med* 2005;38:1372-1381.
  43. Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ, Bernlohr DA. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J Biol Chem* 2008;283:21837-21841.
  44. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006;10:389-406.
  45. De Vries J, De Jong J, Lock FM, Van Bree L, Mullink H, Veldhuizen RW. Protection against paracetamol-induced hepatotoxicity by acetylsalicylic acid in rats. *Toxicology* 1984;30:297-304.
  46. Wu KK. Aspirin and other cyclooxygenase inhibitors: new therapeutic insights. *Semin Vasc Med* 2003;3:107-112.
  47. Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohammadnejad M, Sutterwala FS, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest* 2009;119:305-314.
  48. Hamada T, Tsuchihashi S, Avanesyan A, Duarte S, Moore C, Busuttill RW, Coito AJ. Cyclooxygenase-2 deficiency enhances Th2 immune responses and impairs neutrophil recruitment in hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Immunol* 2008;180:1843-1853.
  49. Ozturk H, Gezici A. The effect of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, on liver ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in rats. *Hepatol Res* 2006;34:76-83.
  50. Warner TD, Mitchell JA. COX-2 selectivity alone does not define the cardiovascular risks associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* 2008;371:270-273.
  51. Targownik LE, Metge CJ, Leung S, Chateau DG. The relative efficacies of gastroprotective strategies in chronic users of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterology* 2008;134:937-944.
  52. Strand V. Are COX-2 inhibitors preferable to non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs in patients with risk of cardiovascular events taking low-dose aspirin? *Lancet* 2007;370:2138-2151.
  53. Warner TD, Vojnovic I, Bishop-Bailey D, Mitchell JA. Influence of plasma protein on the potencies of inhibitors of cyclooxygenase-1 and -2. *FASEB J* 2006;20:542-544.

Author Proof

## AUTHOR QUERIES

### AUTHOR PLEASE ANSWER ALL QUERIES

1

AQ1: Please confirm or correct the title.

AQ2: Please confirm or correct the names of the authors, the affiliations, and the correspondence footnotes. Telephone and fax numbers may be added to the footnotes.

AQ3: In accordance with journal style, subheadings have been deleted from the abstract; some sentences have been reworded for clarity. Please confirm or correct the changes. Also, please shorten the abstract to 275 words or fewer.

AQ4: Please confirm or correct the abbreviation note here and those in the figure legends.

AQ5: Please spell out "DGEP."

AQ6: Please confirm or correct the sentence.

AQ7: Please correct this figure citation (there is no Figure 8).

AQ8: Please define "IRH."

AQ9: Please define "CK."

AQ10: Please define "CV" and "PA."

---

ORIGINAL ARTICLE

## Ethanol-mediated Oxidative Changes in Blood Lipids and Proteins Are Reversed by Aspirin-like Drugs

Martha Zentella de Piña,<sup>a</sup> Adrián Sandoval-Montiel,<sup>b,c</sup> Laura Serrano-Alessandri,<sup>a</sup>  
Eduardo Montalvo-Jave,<sup>a,d</sup> Alejandro Zentella-Dehesa,<sup>b,c</sup> and Enrique Piña<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, <sup>b</sup>Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology,  
Institute of Biomedical Research (IIB); National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City, Mexico

<sup>c</sup>Department of Biochemistry, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán (INCMNSZ), Mexico City, Mexico

<sup>d</sup>Department of Surgery, Faculty of Medicine, UNAM, and Hospital General de México, Secretaría de Salud (SSA), Mexico City, Mexico

Received for publication April 14, 2006; accepted September 1, 2006 (ARCMED-D-06-00144).

**Background.** Previous work from our laboratory revealed that administration of selected nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)—aspirin, naproxen, nimesulide, and piroxicam—prevented some signs of oxidative stress produced in rat livers acutely intoxicated with ethanol. Our final aim was to pursue these advantageous effects of NSAIDs in humans in relation to opposing the oxidative action of ethanol. In preparation for these studies, we conducted a search for tissues that were more accessible than liver, such as plasma and blood cells.

**Methods.** Either ethanol (5 g/kg body weight) or an isocaloric amount of glucose from a 30% solution alone or combined with one of the NSAIDs was administered orogastrically to rats; animals were sacrificed 5 h later.

**Results.** Ethanol increased both protein carbonylation (PCO) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in isolated lymphocytes, increased proteolysis in isolated red blood cells (RBC), and decreased the pool of plasma amino acids. The NSAIDs employed reversed the ethanol-mediated rise in PCO in plasma, but with the exception of aspirin failed to prevent the ethanol-produced decrease in the amino-acid serum pool. Additionally, the increase in TBARS and PCO promoted by ethanol in lymphocytes was reverted with aspirin. In contrast, ethanol-activated proteolysis was not modified by aspirin.

**Conclusions.** The pro-oxidant effects of ethanol and certain beneficial actions of NSAIDs, especially those of aspirin, preventing these pro-oxidant effects can be followed in blood constituents of rats. Hence, these oxidative markers could be regarded as potential clinical monitors for ethanol-mediated oxidative stress. © 2007 IMSS. Published by Elsevier Inc.

**Key Words:** Ethanol, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, TBARS, Protein carbonylation, Proteolysis, Plasma amino acids.

### Introduction

Despite numerous studies of biochemical changes in liver and other central tissues induced by ethanol intoxication there is limited information on similar effects in blood that

could be used in clinical studies. Hence, we tested the oxidative changes previously reported in liver and the beneficial opposing effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) that could be reproduced in plasma and blood cells. Acute ethanol intoxication produces oxidative stress which has been characterized in liver and includes, among several changes, an increase in the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), indicative of lipid peroxidation (1), a rise in protein carbonylation (PCO), a sign of oxidized proteins (2), simultaneously with

Address reprint requests to: Adrián Sandoval-Montiel, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Circuito Universitario S/N, 04510 México, D.F., México; E-mail: sandovalmontiel@msn.com



a decrease in the content of antioxidants, such as total and reduced glutathione (3). In addition, acute ethanol oxidation produces widely studied hepatic metabolic disturbances, like a limited gluconeogenesis, an accumulation in triacylglycerides (TAG) and a reduction in protein synthesis (4). Of potential practical interest is the finding that several NSAIDs administered to rats simultaneously with ethanol (5 g/kg bw) diminished some indicators of liver damage promoted by this hepatotoxic compound. Thus, the use of NSAIDs— aspirin, naproxen, nimesulide, and piroxicam—partially reverted the increase in TAG and TBARS and the decrease in reduced and total glutathione produced by acute ethanol intoxication (5–7). The aim of this work was to explore whether these NSAIDs might share protection against potential pro-oxidative effects of ethanol in plasma constituents and blood cells, a more accessible tissue for obtaining samples, thus facilitating studies in humans. Acute ethanol intoxication in blood samples from rats resulted in higher TBARS values in RBC membranes (8) and a rapid decrease in the pool of plasma amino acids (9–14). With these precedents, in this work we explored additional signs of ethanol's pro-oxidant action in blood components, among these PCO levels in serum and peripheral blood lymphocytes. A rise in PCO has been interpreted as a consequence of an increase in protein oxidation, and previous reports have shown higher PCO values in liver 36 h after ethanol treatment (2). Furthermore, Davis demonstrated that mildly oxidized proteins are more easily degraded by proteolytic attack (15–20). Therefore, ethanol intoxication by means of PCO might lead to an increase in cellular proteolysis and eventually contribute to maintaining a higher pool of amino acids, which would rise even more as a consequence of the previously mentioned reduction in protein synthesis rate following ethanol treatment (4). Nevertheless, because a rapid decrease in the plasma amino-acid pool has been reported constantly in ethanol-treated rats (9–14), in this work the eventual coexistence of both ethanol actions, increased cellular proteolysis and decreased content of blood plasma amino acids, will be analyzed. Finally, of the four tested NSAIDs, aspirin was more effective in reverting ethanol-promoted changes in blood constituents.

## Materials and Methods

### Chemicals

The L-alanine dehydrogenase, 2,4-dinitrophenylhydrazine,  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, thiobarbituric acid, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, bovine serum albumin, Histopaq, aspirin, piroxicam, naproxen, and nimesulide were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All remaining reagents were of the highest purity available, and Bradford reagent was purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA).

### In Vivo Experiments

Male Wistar rats (200 g  $\pm$  20 g) were fed with a commercial diet (Nutricubos; Purina-Nestlé, Mexico City, Mexico), received water *ad libitum* and were fasted for 16 h prior to treatment. The experimental animals were divided randomly into six groups and treated as follows: the control group received no treatment; the sham group was treated with 2 mL saline solution, 0.9% NaCl corresponding to the vehicle used to administer all NSAIDs, adjusting pharmacologic doses employed in humans to 200 g rats as follows: aspirin, 45 mg/kg; naproxen, 10 mg/kg; nimesulide, 28 mg/kg, and piroxicam, 10 mg/kg (5). Because aspirin was the focus of this study, not all the remaining three NSAIDs were utilized in all experiments. As indicated in the figures, control animals received a single dose of one isocaloric amount of sucrose (30% solution), and experimental animals received a single dose of ethanol 5 g/kg body weight (bw) (as a 60% solution) through an orogastric tube. All animals were sacrificed by decapitation at the times indicated in the figures, and blood samples were collected in tubes with heparin. The Ethics Committee of the School of Medicine at the National Autonomous University of Mexico (UNAM) approved the experimental protocol in accordance with the International Animal Care and Use Committee.

### Isolation of Red Blood Cells and Plasma

Routinely, four rats receiving the same treatment were sacrificed simultaneously and their blood was used as an 18–20 mL pool. All of the following steps were performed at 4°C. Whole blood was centrifuged at 1200  $\times$  g for 10 min and plasma supernatant was carefully recovered for further analysis, avoiding contamination with cellular components. The leukocytes of the upper part of the pellet were removed by aspiration and discarded. The remaining red blood cells were washed twice with Krebs-Ringer phosphate solution pH 7.3 (KRP). The supernatant of the second wash was discarded by aspiration. This red blood cell-enriched pellet was divided into two samples to be used for alanine determination or proteolysis (15).

### Isolation of Lymphocytes

Lymphocytes were isolated from blood through a Histopaq gradient according to manufacturer's indications. Briefly, 15 mL of blood were diluted with phosphate buffer solution (PBS) (1:3) and were added to a 50 mL conical tube containing 10 mL of histopaq, diluted blood added carefully to avoid disrupting the gradient. After centrifugation at 1800  $\times$  g for 30 min, the fraction that contained lymphocytes was carefully absorbed and washed with PBS.

### Determination of Alanine Pool

Alanine content was assayed in plasma and RBC according to Davies (15). Briefly, protein was precipitated by use of

perchloric acid and alanine was measured in the neutralized supernatant spectrophotometrically with the aid of  $\text{NAD}^+$  and alanine dehydrogenase. The highest value of the alanine pool detected in blood was observed 5 h after ethanol administration; therefore, studies reported in this work focus on this time point.

#### Proteolysis Studies

Alanine is not synthesized *de novo* in RBC; thus, net alanine production can solely occur via protein degradation (15). Briefly, RBC were diluted with RKP 3:1 and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 2 h. Samples were taken each hour, beginning at time zero in the total mixture and in the RBC after centrifugation at  $1,200 \times g$  for 10 min. Alanine was measured in the collected samples according to the method described previously. An internal control of proteolysis with red blood cells (RBCs) from untreated control rats was always included.

#### Carbonyl Assay

PCO content was carried out in plasma and lymphocytes by the method of Levin (21). In short, protein carbonyl groups were determined by the 2,4-dinitrophenylhydrazine reaction. Carbonyl protein content was calculated using the absorption coefficient of  $22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  at 370 nm for aliphatic hydrazones.

#### Lipid Peroxidation

Peroxidation was assessed by measurement of TBARS according to Buege and Aust (22). The TBARS assay has been discredited as an accurate measurement of the extent of lipid peroxidation. Nonetheless, it is a simple, reproducible, and widely used assay. In our work, it was an additional assay for following the pro-oxidant action of ethanol. Briefly, lymphocyte samples (100  $\mu\text{L}$ ) were boiled for 20 min with thiobarbituric acid. TBARS content was determined by measuring their absorbance at 535 nm. Calculations were based on standard curves of 1,1,3,3-tetraethoxypropane prepared for each individual experiment.

#### Protein Determination

Protein was determined as described by Bradford (23), using bovine serum albumin as standard.

#### Statistical Analysis

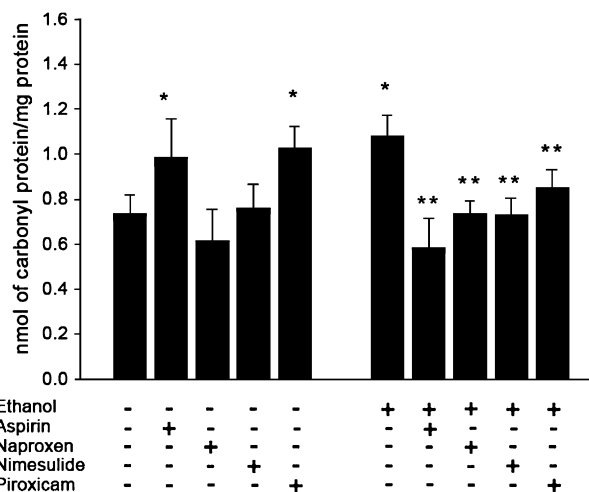
Statistical analysis was performed using Sigma Plot, version 5.0 (SPSS, Chicago, IL). All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Wilcoxon, signed rank test, or Student's *t*-test were used for paired data. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

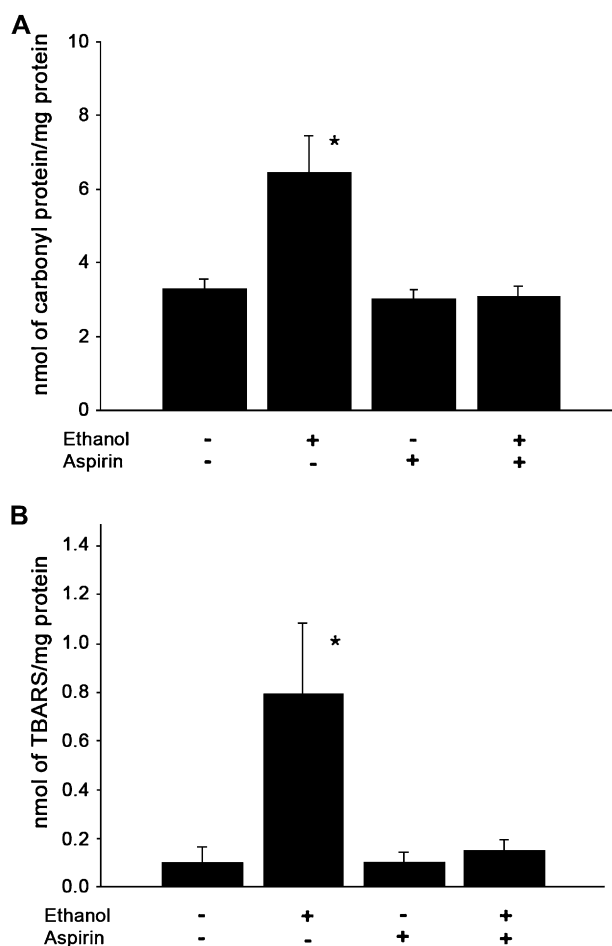
Five hours after ethanol administration alone (5 g/kg body weight), there was a 46.2% increase in plasma PCO levels as compared with those of the control group (Figure 1). As expected, all four NSAIDs assayed— aspirin, naproxen, nimesulide, and piroxicam—impaired or lowered the ethanol-dependent increase of PCO (Figure 1). Due to all of the pro-oxidant effects of ethanol described for several tissues (liver, pancreas, plasma, red blood cells, leukocytes) in this study and in papers cited in this work, it is highly probable that proteins were indeed oxidatively modified by ethanol and not merely subjected to adduction arising from the metabolic formation of acetaldehyde. However, interpretation of these results becomes complex because administration of only two of these NSAIDs, namely, aspirin or piroxicam, in the absence of ethanol, increased the amount of PCO in plasma to similar values of those recorded with ethanol alone (Figure 1).

The pro-oxidant effects of ethanol and the observed protective effect of aspirin were explored in isolated lymphocytes and RBC. In lymphocytes obtained from rats that had been intoxicated for 5 h with ethanol, TBARS content and PCO levels were increased (Figures 2A and 2B); aspirin, the sole NSAID tested, prevented both effects of ethanol administration (Figures 2A and 2B). A study on the effect of ethanol modifying PCO levels in RBC was not possible because of interference due to the elevated concentration of hemoglobin present in these cells.

The effect of ethanol on RBC proteolysis was studied in parallel. Alanine presence in isolated RBC is indicative of proteolysis, because these are unable to synthesize alanine *de novo* (15). Therefore, these cells were isolated from rats



**Figure 1.** Protein carbonyl content in plasma from rats 5 h after acute ethanol intoxication and simultaneous NSAIDs administration. Animals received the indicated treatments. Data represent mean  $\pm$  standard error ( $n = 4$ ). Statistical significance control vs. aspirin, piroxicam, or ethanol alone, \* $p < 0.05$ ; ethanol vs. ethanol plus NSAIDs, \*\* $p < 0.01$ .



**Figure 2.** Effect of aspirin on PCO (A) and TBARS (B) content in lymphocytes 5 h after ethanol intoxication. Animals received the indicated compounds. Data represent mean  $\pm$  standard error ( $n = 4$ ). Statistical significance ethanol vs. all other groups,  $*p < 0.05$ .

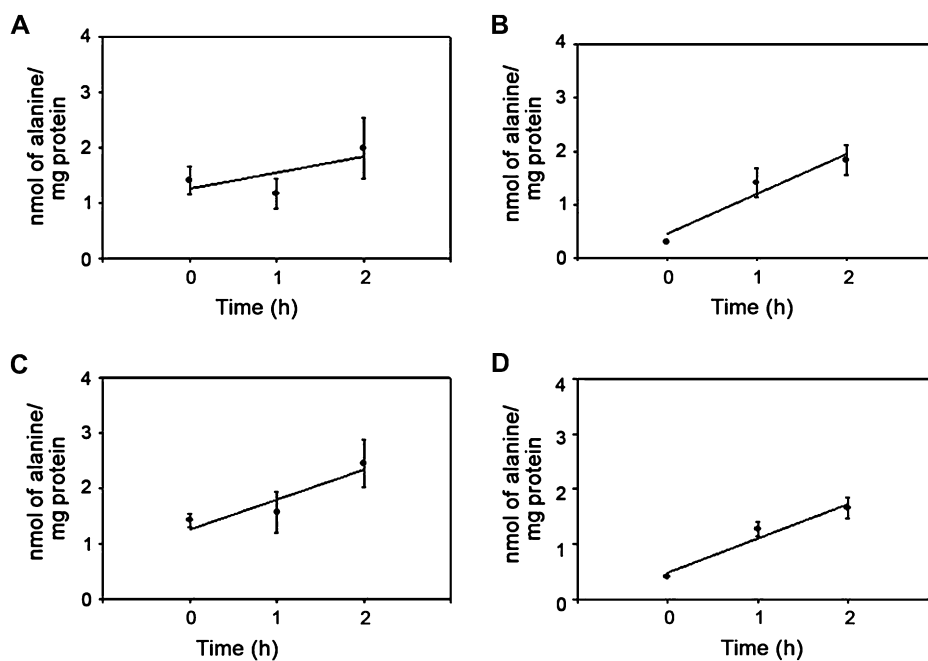
treated for 5 h with ethanol and/or aspirin and incubated *in vitro* to measure alanine-pool content. In RBC from ethanol-treated rats, more alanine was present (0.75 nmol of alanine/mg protein  $\times$  h<sup>-1</sup>) than in the corresponding cells from control rats (0.29 nmol of alanine/mg protein  $\times$  h<sup>-1</sup>) (Figure 3). All this indicates that 5 h of treatment with high doses of ethanol promoted sufficient *in vivo* changes to develop a higher rate of *in vitro* proteolysis once these RBC were maintained under the experimental conditions described in Materials and Methods. In rats receiving ethanol and aspirin, their RBC presented a lower rate of alanine production (0.63 nmol of alanine/mg protein  $\times$  h<sup>-1</sup>) than cells from rats treated with ethanol alone (0.75 nmol of alanine/mg protein  $\times$  h<sup>-1</sup>). When rats were treated with aspirin alone, proteolysis took place above control levels (0.53 nmol of alanine/mg protein  $\times$  h<sup>-1</sup>), indicating that, in the absence of ethanol, aspirin alone can promote PCO in RBC (Figure 3). From these results, it is evident that proteolysis is activated by ethanol and that when administered in

combination with aspirin, a protective effect becomes apparent, lowering PCO content. Contrary to what was expected, aspirin alone determines an increase in PCO above control level and, more importantly, when combined with ethanol, no additive effect on PCO content was observed. During *in vitro* incubation, PCO decreased in RBC derived from ethanol- and aspirin-treated rats. Therefore, we proceeded to evaluate whether the protective action of aspirin on ethanol's deleterious effect is present *in vivo*. To render the effect of ethanol more evident on the pool of alanine in plasma, we carried out major adjustments on previously reported experimental protocols (13,26) (results shown in Figures 4A and 4B). Experimental groups were as follows; a) the ethanol dose utilized was 5 g/kg body weight, b) rats were fasted for 12 h prior to treatment with saline (sham), sucrose, ethanol, or no treatment (control animals), and c) the *in vivo* content of alanine was measured not only in plasma as a previous papers, but also in RBC. Alanine pool in plasma remained constant within experimental error and demonstrated similar values for control and sham rats (Figure 4A). Plasma alanine pool at 0 h was 20% higher than RBC alanine pool (Figure 4B). Sucrose treatment lead to an increase in plasma and RBC alanine content 4 h later, followed by a decrease in these values for both plasma and RBC (Figures 4A and 4B). The most important finding in this experiment included that the reported ethanol action of lowering the amino acid pool observed here for alanine is quantitatively important (62.7%, 4 h after ethanol intoxication), reproducible, with small individual differences, is present in both plasma and RBC, and persists for > 12 h after ethanol administration (Figures 4A and 4B).

With the purpose of reverting the *in vivo* alcohol-mediated effect of lowering the alanine pool in plasma and RBC, each of the four NSAIDs was administered simultaneously with ethanol. When NSAIDs were administered alone, some raised the pool of alanine either in plasma or in RBC; nevertheless, when the NSAIDs were administered simultaneously with ethanol the effects of the latter persisted and alanine pool in plasma and RBC remained at low levels significantly. Aspirin reversed the action of ethanol and prevented the decrease of alanine pool in both plasma and RBC (Figure 5).

## Discussion

The results presented in this work show that several pro-oxidant actions of high doses of ethanol were detected in blood constituents 5 h after ethanol administration (Figures 1 and 2). These results, as well as our previous reports showing an increase in TBARS of RBC membranes from ethanol-treated rats (8), indicate that ethanol intoxication promotes *in vivo* a rise in reactive oxygen species (ROS) of blood constituents. The NSAIDs used, in particular,



**Figure 3.** Effect of aspirin on proteolysis in RBC after ethanol intoxication. Control (A), ethanol (B), aspirin (C), and ethanol plus aspirin (D). Data represents the mean  $\pm$  standard error ( $n = 4$ ). Slope values of the straight line were calculated with Sigma plot version 7.0 (SPSS).

aspirin, reverted the majority of ethanol's pro-oxidant actions on the blood constituents studied herein, i.e., they increased plasma PCO (Figure 1) and increased TBARS and PCO in lymphocytes (Figures 2A and 2B). The greatest protective effect was observed on lymphocyte PCO.

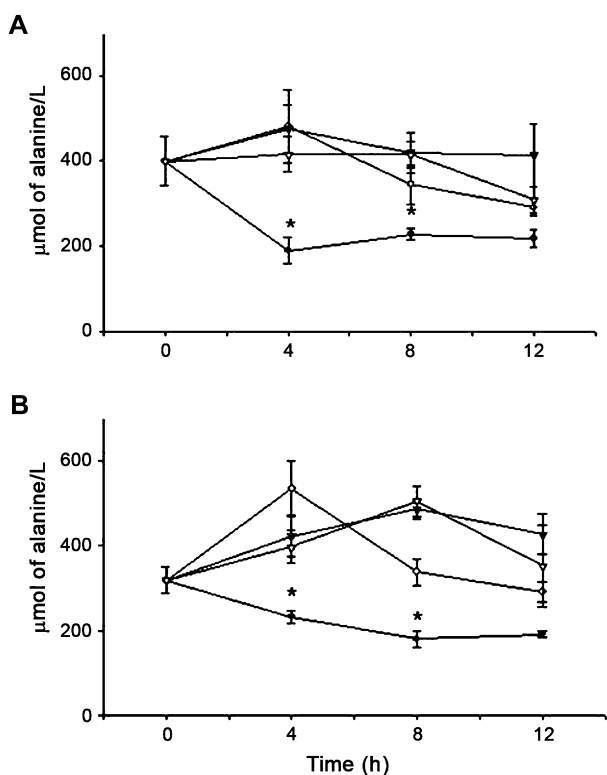
At this point, we do not know the possible mechanisms by which NSAIDs, and aspirin in particular, elicit their protective actions. Nevertheless, several known processes might be involved: in the absence of cellular components, NSAIDs such as aspirin and piroxicam act as trapping agents for free radicals (24,25). Under the *in vivo* conditions studied, the potential contribution of this particular mechanism would have to be small, considering that administration of the NSAIDs aspirin and piroxicam leads to an increase rather than a decrease in PCO (Figure 1). Unexpectedly, the effects of aspirin and ethanol on PCO when administered alone were not additive during present simultaneous treatment. One possible explanation is that ethanol and aspirin induced increases in PCO when administered, reflecting different biochemical events: PCO induced by aspirin could sensitize the cell into activating a better protective response once confronted with the additional ethanol-produced metabolic stress, with a consequent decrease of PCO content to nearly control values (Figure 1).

Proteins are susceptible to aggregation, fragmentation, amino-acid modification, and proteolytic attack after exposure to ROS and are rapidly degraded, as has been suggested in hepatocytes (2) and as has been shown in RBC incubated *in vitro* (15–20). The observed increase in alanine content in RBC from ethanol-intoxicated rats

(Figure 3) is in agreement with this concept. This is highly suggestive that ethanol administration-generated ROS activated proteolysis of oxidized proteins, which can be considered an additional indicator of ethanol-mediated oxidative stress in RBC. Despite the fact that aspirin alone promoted some proteolysis (Figure 3), it is important to consider that ethanol-stimulated proteolysis was not additive to proteolysis activated by aspirin (Figure 3), a similar pattern to that observed for PCO. However, proteolysis measured by an alanine increase in RBC might not constitute a good indicator for following aspirin's protective effect vs. ethanol's pro-oxidant actions, due to the fact that the proteolytic effect of ethanol was masked by an important ethanol-mediated decrease of amino acids in plasma and RBC (Figure 4) (26).

Our present knowledge concerning the effects of ethanol on amino acid metabolism in blood constituents is paradoxical (27–30): while ethanol has been reported to promote both increased proteolysis and reduced protein synthesis that should lead to an increase in the amino acid pool, a consistent reduction is observed (9–14). Our work confirmed and extended these results: a protracted decrease of alanine pool in plasma and RBC (Figures 4A and 4B). How ethanol exerts its effect on plasma amino acids remains unclear. Two hypotheses underlying the amino acids' decreasing effect have been postulated (11). The first hypothesis indicates that the metabolism of ethanol shifts the redox state in the liver, and the consequent increase in the [NADH]/[NAD] ratio forces the consumption of amino acids to be converted into their keto acids, which react with NADH and regenerate  $\text{NAD}^+$  to further oxidize the ethanol (13). The second hypothesis claims that the reduction of amino

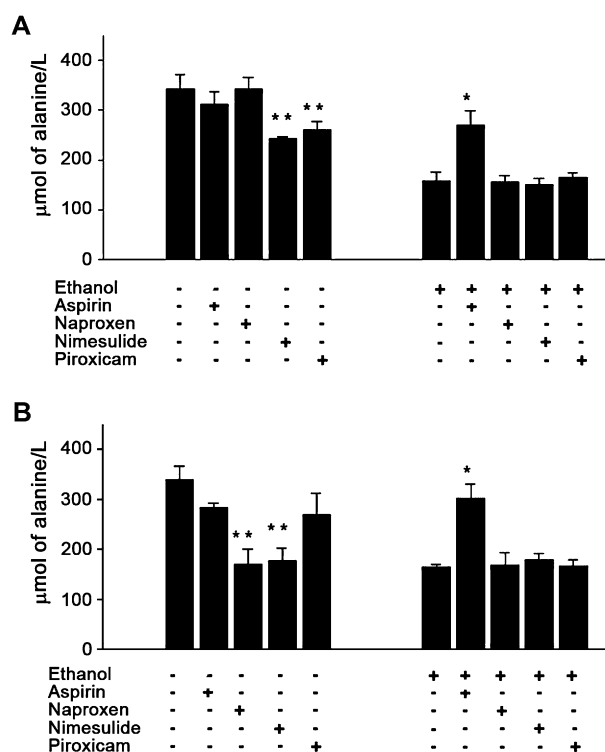




**Figure 4.** Time courses for alanine in plasma (A) and RBC (B) after acute ethanol intoxication. Rats received the following treatments: control (∇); sham (▼); sucrose (○), and ethanol (●), and were sacrificed at the indicated times after intoxication. Data represent mean  $\pm$  standard error ( $n = 5$ ). Ethanol at 4 h and 8 h vs. all other groups at 4 h and 8 h in both plasma and RBC,  $*p < 0.05$ .

acids is not caused by the ethanol molecule itself (12) but is secondary to an increase in epinephrine secretion and higher levels of circulating catecholamines derived from acute ethanol intoxication (10,14), this suggestion supported by related studies (10,31). Previous considerations lead us to suggest that an ethanol-mediated decrease in plasma amino acids is independent of the pro-oxidant effects of ethanol. Notwithstanding, it is noteworthy that aspirin reversed the decrease of alanine pool in plasma and RBC (Figures 4A, 4B, and 5). An antagonism between metabolic actions elicited by adrenergic agonists and actions provoked by NSAIDs has been published previously in isolated rat hepatocytes; piroxicam blocked epinephrine-mediated glucose release from lactate (32).

In conclusion, the main purpose of this work was achieved: to have at one's disposal an accessible tissue for *in vivo* study of the effects of NSAIDs in preventing the pro-oxidant action of ethanol. Thus, the pro-oxidant actions evoked by ethanol *in vivo* emerge in blood constituents as a PCO increase in lymphocytes and protein plasma, an increase of TBARS lymphocytes, and a decrease of alanine content in both plasma and RBC. All of these were reverted by treatment with NSAIDs; thus, this protec-



**Figure 5.** Effect of NSAIDs on the pool of alanine in plasma (A) and RBC (B) 5 h after ethanol intoxication. Animals were treated as indicated. Data represents means  $\pm$  standard error ( $n = 4$ ). Statistical significance aspirin plus ethanol vs. ethanol alone, and ethanol alone and all other NSAIDs,  $*p < 0.05$ ; control vs. nimesulide, control vs. piroxicam,  $**p < 0.05$ .

tive effect of NSAIDs can be easily followed in samples of blood constituents. The magnitude of the increase in TBARS and PCO in lymphocytes from ethanol-intoxicated animals (Figure 2) and their degree of reversion by aspirin render these measurements good candidates for clinical studies.

### Acknowledgments

We would like to extend our thanks to Enrique Moreno-Hernández, M.V.Z., for his support in handling the experimental animals, to Maggie Brunner for critically editing the manuscript, and to Mrs. Alejandra Palomares for her secretarial contribution. This work was partially supported by IN-224903–2 DGAPA, UNAM, and 45003-M CONACYT México grants.

### References

- Bondy S, Guo S. Effect of ethanol treatment on indices of cumulative oxidative stress. *Eur J Pharmacol* 1994;270:349–355.
- Rankonczay Z Jr, Boros I, Jarmay K, Hegyi P, Lonovics J, Takacs T. Ethanol administration generates oxidative stress in the pancreas and liver, but fails to induce heat-shock proteins in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:858–867.

3. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. Oxford, UK: Clarendon Press; 1989. pp. 137–142.
4. Reilly ME, Patel VB, Peters TJ, Preedy VR. *In vivo* rates of skeletal muscle protein synthesis in rats are decreased by acute ethanol treatment but are not ameliorated by supplemental alpha-tocopherol. *J Nutr* 2000;130:3045–3049.
5. Zentella de Piña M, Hernández-Tobías A, Saldaña-Balmori Y, Díaz-Belmont A, Piña E. Biochemical ethanol effects affected by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *FEBS Lett* 1992;298:123–125.
6. Zentella de Piña M, Saldaña-Balmori Y, Hernández-Tobías A, Piña E. Nonsteroidal antiinflammatory drugs lower ethanol-mediated liver increase in lipids and thiobarbituric acid reactive substances. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17:1228–1232.
7. Zentella de Piña M, Corona S, Rocha-Hernández A, Saldaña-Balmori Y, Cabrera G, Piña E. Restoration by piroxicam of liver glutathione levels decreased by acute ethanol intoxication. *Life Sci* 1994; 54:1433–1439.
8. Gutiérrez-Salinas J, Zentella de Piña M, Piña E. Acute ethanol intake produces lipid peroxidation in rat red blood cell membranes. *Biochem Mol Biol Int* 1993;29:263–270.
9. Dahchour A, Hoffman A, Deitrich R, de Witte P. Effects of ethanol on extracellular amino acid levels in high- and low-alcohol sensitive rats: a microdialysis study. *Alcohol* 2000;35:548–553.
10. Eriksson T, Carlsson A, Liljequist S, Hagman M, Jagenburg R. Decrease in plasma amino acids in rat after acute administration of ethanol. *J Pharm Pharmacol* 1980;32:512–513.
11. Hagman M, Eriksson T. Dose-dependent decrease in rat plasma amino acids after acute administration of ethanol. *J Pharm Pharmacol* 1990; 42:869–870.
12. Hagman M, Eriksson T, Kitson KE. Similar effects of ethanol and tert-butanol on amino acid concentrations in rat serum and liver. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17:299–303.
13. Milakofsky L, Miller JM, Vogel WH. Effects of acute ethanol administration on rat plasma amino acids and related compounds. *Biochem Pharmacol* 1986;35:3885–3888.
14. Vogel WH, De Turck K, Miller JM. Differential effects of ethanol on plasma catecholamine levels in rats. *Biochem Pharmacol* 1986;35: 3983–3987.
15. Davies KJ, Goldberg AL. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J Biol Chem* 1987;262:8220–8226.
16. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem* 1987;262:9895–9901.
17. Davies KJ, Delsignore ME. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem* 1987;262:9908–9913.
18. Davies KJ, Delsignore ME, Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem* 1987;262:9902–9907.
19. Davies KJ, Lin SW, Pacifici RE. Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denature protein. *J Biol Chem* 1987;262:9914–9920.
20. Davies KJ, Goldberg AL. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J Biol Chem* 1987; 262:8227–8234.
21. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994;233:346–357.
22. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302–310.
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
24. Sagone AL, Husney RM. Oxidation of salicylates by stimulated granulocytes: evidence that these drugs act as free radical-scavengers in biological systems. *J Immunol* 1987;138:2177–2183.
25. Castrejón SM, Boldú O, Muñoz PE, Zentella de Piña M, Piña E, Gleason VR. Spin-trapping studies on the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on hydroxyl and hydroxyethyl free radicals *in vitro*. *Res Commun Pharmacol Toxicol* 1996;1:289–299.
26. Shaw S. Alcohol induced changes of amino acid metabolism. *Leber Magen Darm* 1978;8:265–270.
27. Marway JS, Bonner AB, Preedy VR. Characterization of contractile and non-contractile protein synthesis in the stomach, small and large intestine and caecum of the rat, and response to acute ethanol dosage. *Addict Biol* 1996;1:85–92.
28. Motoni K, Tomoko K, Tadashi N. Acute effect of epinephrine on muscle proteolysis in perfused rat hindquarters. *Am J Physiol* 1996; 270:E961–E967.
29. Vary TC, Lynch CJ, Lang CH. Effects of chronic alcohol consumption on regulation of myocardial protein synthesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1242–H1251.
30. Bonner AB, Dalwai S, Marway JS, Preedy VR. Acute exposure to the nutritional toxin alcohol reduces brain protein synthesis *in vivo*. *Metabolism* 2003;52:389–396.
31. Shamon H, Jacob R, Sherwin RS. Epinephrine-induced hypoaminoacidemia in normal and diabetic human subjects: effect of beta blockade. *Diabetes* 1980;29:875–881.
32. Riveros-Rosas H, Zentella de Piña M, Guinzberg R, Saldaña-Balmori Y, Julián-Sánchez A, Saavedra-Molina A, Piña E. Antagonism between the metabolic responses induced by epinephrine and piroxicam on isolated rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 1999;380:49–59.

## RESEARCH REVIEW

# Factors in the Pathophysiology of the Liver Ischemia-Reperfusion Injury

Eduardo E. Montalvo-Jave, M.D.,\*†‡ Tomas Escalante-Tattersfield, M.D.,\* Jose A. Ortega-Salgado, M.D.,\* Enrique Piña, M.D., Ph.D.,† and David A. Geller, M.D.§<sup>1</sup>

\*Department of Surgery, †Department of Biochemistry, Faculty of Medicine and National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico and "Hospital General de Mexico OD"; ‡Transplantation Biology Program, Department of Surgery, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota; and §Department of Surgery, Thomas E. Starzl Transplantation Institute, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania

Submitted for publication February 18, 2007

**Hepatic ischemia-reperfusion injury is commonplace in liver surgery, particularly in hepatic transplantation, hepatic resection, and trauma. The signaling events contributing to local hepatocellular damage are diverse and complex and involve the interaction between hepatocytes, sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells, as well as infiltrating neutrophils, macrophages, and platelets. Signaling mediators include cytokines, reactive oxygen and nitrogen species, calcium, complement, and several transcription factors. The purpose of this review article was to summarize the factors that contribute to the pathophysiology of hepatic ischemia-reperfusion injury.** © 2008 Elsevier Inc.

All rights reserved.

**Key Words:** liver; ischemia-reperfusion; IR injury; nitric oxide; NO; iNOS; adenosine; cytokines; endothelial and Kupffer cells; ROS.

### INTRODUCTION

Interruption of an organ's blood flow, with its subsequent lack of oxygen and nutrient supply, is an inherent phenomenon during diverse surgical procedures. In liver surgery, there are clinical situations in which the ischemic periods can be particularly long, such as during the resection of large hepatic tumors, management of hepatic trauma of diverse origins, vascular reconstructions, and liver procurement for transplantation [1–3]. Once the blood flow and oxygen supply are rees-

tablished, reperfusion enhances the injury caused by the ischemic period, aggravating the damage caused at the cellular level [4, 5]. This phenomenon, known as ischemia-reperfusion (IR) injury, impacts directly on liver viability, especially during transplantation and liver surgery [3, 6]. During an ischemic period, several functional changes occur at the cellular level that promote cell injury. A decrease in oxidative phosphorylation results in adenosine triphosphate (ATP) depletion and derangements in calcium homeostasis [7].

The deleterious effects of ATP catabolism modification are further enhanced by the production of several substances, including reactive oxygen species (ROS), cytokines, adhesion molecules, and vasoactive agents (endothelin and thromboxane-A<sub>2</sub>). These alterations are accompanied by a decrease of cytoprotective substances including nitric oxide, prostacyclin, and others [8]. Hepatic cell death occurs due to both necrosis and apoptosis [9].

### MICROCIRCULATORY FAILURE

During the ischemic period, the lack of energetic substrate interferes with active transmembrane transport, producing edema in Kupffer cells (KC) and endothelial cells (EC) [10]. Loss of the delicate equilibrium between nitric oxide (NO) and endothelin (ET) induces vasoconstriction and narrowing of the sinusoidal lumen, compromising leukocyte flow and bringing them in close contact with the capillary wall [11]. The increase in contact between leukocytes and EC promotes leukotaxis, and although not occluding the capillary lumen completely, the trapped leukocytes interfere

<sup>1</sup> To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Thomas E. Starzl Transplantation Institute, University of Pittsburgh, 3459 Fifth Avenue, MUH 7 South, Pittsburgh, PA 15213. E-mail: gellerda@msx.upmc.edu.



with the flow of blood through the sinusoidal capillaries [12–14]. Platelet aggregation within the hepatic sinusoids further aggravates the turbulent flow rate through the partially occluded capillaries [15]. On reperfusion of the ischemic liver, the collapse of the microcirculation maintains areas of ischemic liver parenchyma, in a phenomenon known as “no-reflow” [8, 16, 17]. In addition to the microcirculatory failure, the activation of KC and neutrophils leads to the synthesis of inflammatory cytokines, further aggravating the severity of the ischemic injury. The cytokines most frequently implicated in IR injury are the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukins (ILs) 1 and 6, prostaglandins, and ROS, especially superoxide ( $O_2^-$ ) and hydrogen peroxide [18–23]. Several relevant factors and mediators such as NO are involved in the ischemic injury of the liver. NO is synthesized from L-arginine by the action of nitric oxide synthase (NOS). NO is an important mediator of immunomodulation, neurotransmission, and platelet aggregation [24]. Within EC, NO triggers platelet cyclic 3',5'-guanosine monophosphate to reduce the vascular tone and act as a vasodilator [24, 25]; NO can mediate the intensity of the IR injury by modulating neutrophil adhesion, platelet aggregation, and stellate (Ito) cell relaxation [4, 15, 26]. Stellate cells contract when exposed to ET-1, whereas sodium nitroprusside (NO donor) induces their relaxation [27]. Therefore, one of the mechanisms involved in IR injury is loss of the equilibrium between ET and NO levels during reperfusion [27, 28]. At the beginning of reperfusion, NO levels decrease and ET levels increase, favoring microcirculatory vasoconstriction [29, 30]. Ischemia reduces intracellular NADPH and oxygen (factors necessary for NO synthesis) and induces the release of arginase [31], producing an important reduction in NO synthesis, with a significant increase in degradation of its precursor L-arginine [31, 32]. Both endogenous and exogenous NO protect hepatocytes and EC against IR injury, apparently by vasodilation, and by inhibiting the expression of adhesion molecules (E-selectin) within the sinusoidal lumen [25, 26]. To produce significant amounts of NO in response to a specific stimulus such as IR, the inducible nitric oxide synthase enzyme (iNOS) is synthesized *de novo*, a process that takes 4 to 6 h [24, 33]. Blockade of the L-arginine/NO synthase pathway has been shown to worsen hepatic apoptosis and liver transplant preservation injury [34, 35]. Augmenting graft iNOS expression with adenoviral iNOS transduction has also been shown to improve liver transplant preservation injury and improve survival in severe preservation injury [35]. In clinical practice, an increase in NO concentration, as well as the reduction of ET, have been shown to decrease the severity of IR injury [36].

## FACTORS INVOLVED

### Cell Types

#### KC

During the initial stages of reperfusion, KC are activated, producing morphological changes that cause them to protrude into the sinusoids, contributing to the reduction of blood flow within the sinusoidal lumen [18, 37]. Activated KC release a large amount of both proinflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, and prostaglandins) and anti-inflammatory mediators (IL-10, IL-13), as well as ROS [22, 23]. Some studies show that IR injury can be attenuated or aggravated by the suppression or potentiation of KC activity, respectively [37, 38]. Cold liver preservation induces strong KC activation [39]; modulation of KC activity can therefore attenuate the IR damage in transplanted organs and consequently improve their survival.

#### Neutrophils

Activated neutrophils contribute to IR damage through the release of ROS and several proteases [40]. Neutrophils accumulate in the liver at the initial stages of reperfusion, and their adhesion to EC is mediated by the interaction between selectins and integrins expressed in the neutrophil membrane, and intercellular adhesion molecules (ICAM) expressed on EC [41, 42]. IR increases ICAM-1 expression in hepatic EC, probably through TNF- $\alpha$  and IL-1 synthesis [43, 44]. In fact, increased ICAM-1 expression has been associated with acute liver rejection [45, 46] and neutralization of ICAM-1 decreases the severity of IR injury [47, 48].

Recent studies propose that NK-T-cell and T-cells also play an important role in hepatic IR injury [49]. Resident lymphocytes found within the liver include conventional alphabeta TCR cells as well as unconventional NK and gammadelta T-cells. These lymphocytes can alter inflammation through the secretion of soluble mediators such as cytokines and chemokines or through cognate interactions in an antigen-dependent manner. Expression of these mediators will then result in the recruitment of more lymphocytes and neutrophils [50].

#### Platelets

Platelets adhere to the hepatic sinusoids and induce programmed EC death upon reperfusion of transplanted organs [51]. Platelets synthesize and release several factors that play an important role in the liver IR and hepatic regeneration [52]. These include cytokines, growth factors such as transforming growth factor- $\beta$ , serotonin, and calpain. Platelet-derived serotonin has recently been shown to promote tissue repair after normothermic hepatic ischemia in mice [53]. In

human platelets, calpain activation is dependent on fibrinogen binding to integrin and subsequent platelet aggregation, suggesting a potential role for this protease in the regulation of postaggregation responses [54]. Platelets also produce NO that leads to the production of peroxynitrite, which acts as a potent inducer of programmed cell death in EC [55, 56].

### Mediators

#### *Cytokines*

Cytokines play a relevant role in IR injury, both by starting and maintaining the inflammatory response, as well by as modulating its severity [57, 58]. The substances most studied in this context are the TNF- $\alpha$  and interleukins IL-1 and IL-6. These cytokines have large proinflammatory activity, inducing IL-6 and IL-8 synthesis [59] and lower anti-inflammatory IL-10 levels [60, 61]. IL-8 is a potent neutrophil chemotactic and activating factor and correlates with the neutrophil infiltration in an IR model [61]. The expression of adhesion molecules ( $\beta_2$ -integrins and selectins) also promote leukocyte–EC interaction [43]. These factors, together with chemokines and complement factors, recruit polymorphonuclear leukocytes [8] that infiltrate the liver, perpetuating and amplifying the ischemic injury by releasing additional ROS, TNF- $\alpha$ , and diverse proteases [62]. TNF- $\alpha$  by itself produces leukocyte chemotaxis and activation [19] and induces ROS production by KC [63]. In turn, IL-1 induces TNF- $\alpha$  synthesis by KC and induces neutrophil recruitment, which in turn produces ROS [20, 64]. Both TNF- $\alpha$  and IL-1 levels are increased during hepatic IR injury [39, 45] and their neutralization decreases the intensity of IR injury [20, 64]. Recent studies have confirmed the relationship between IL-1 and neutrophil recruitment within hepatic tissue after IR, but its relationship to the extent of hepatocellular injury remains unclear [65].

#### *ROS*

Aerobic metabolism releases ROS, which under normal circumstances are neutralized through diverse antioxidant mechanisms [66]. Under stress conditions, the balance between ROS and antioxidants shifts toward the former, resulting in oxidative stress and cytotoxicity [40, 67].

Some of the processes involved both directly and indirectly in IR injury by ROS synthesis include the transformation of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase (an oxygen-dependent process that produces uric acid, releasing the ROS superoxide and hydrogen peroxide) [68], induction of NADPH oxidase by activated KC and neutrophils (ROS production is blocked when NADPH oxidase is inhibited), and NO production and its conversion to peroxynitrite (both

considered reactive nitrogen species) [56, 67]. Within the liver, the cytotoxic effects of ROS translate into nitrosylation of iron–sulfur groups and tyrosine residues, inactivation of the heme group, and lipid peroxidation [5, 56].

Because of the potential inhibition of ROS by antioxidant agents, several studies have focused on modulating the severity of IR injury with different mechanisms, including pharmacologic  $\alpha$ -tocopherol [69], allopurinol [70, 71], *N*-acetylcysteine [72], and enzymatic superoxide dismutase [73] and catalase [73, 74] therapies. Endogenous antioxidant levels decrease significantly during reperfusion [69, 75]. Therefore, the administration of exogenous antioxidants, particularly in the early stages of reperfusion, could significantly decrease the severity of IR damage in transplanted livers.

#### *Complement System*

Activation of the complement system has been demonstrated during IR. The complement system, consisting of about 30 soluble and membrane-bound proteins, can be activated by any one of three pathways, the antibody-dependent classical pathway, the alternative pathway, or mannose-binding lectin pathway [76]. Activated complement acts both directly through the formation and deposition of membrane attack complexes [77] and indirectly by stimulating the production of chemotactic agents and proinflammatory cytokines, resulting in migration and adhesion of leukocytes and neutrophil recruitment within the sinusoids [78, 79]. Complement inhibitors have been shown to be effective in reducing pathology of various organ-specific IR injuries. For example, a partial IR rat model was used to investigate the efficacy of a small molecule C5a receptor antagonist against hepatic IR injury. This antagonist ameliorated neutrophil infiltration, liver injury, and mortality [80]. However, only a few complement inhibitors such as the small molecule C5a receptor antagonist and recombinant sCR1 or C5 antibody are currently suitable for clinical testing in humans [81].

#### *Calcium*

Calcium was one of the first factors implicated in IR, by modulating the severity of IR with Ca<sup>2+</sup> channel blockers. During IR, Ca<sup>2+</sup> is essential for the activation of calcium-dependent phospholipases, nucleases, and proteases, and it plays a key role in the interruption of oxidative phosphorylation by decreasing ATP levels [82]. Modulation of mitochondrial calcium management has also been shown to attenuate hepatic warm IR injury [83].

#### *Adenosine*

Adenosine is an endogenous compound that is produced by the enzymatic metabolism of ATP, adenosine



diphosphate, and adenosine 5'-monophosphate. At high concentrations, it confers certain protection against ischemia by inhibiting platelet aggregation [84], neutrophil activation [85], and ET and ROS production, while enhancing NO production [85, 86]. During liver ischemia reperfusion, adenosine and inosine are released from the liver, which in turn contributes to homeostasis by releasing glucose from the hepatic glycogen through stimulation of A<sub>3</sub> adenosine receptors [87]. With reperfusion, inosine can be washed out of the organ [88], thus eliminating completely its protective effect. Inosine, when converted to hypoxanthine and xanthine, is also involved in ROS [89].

*Molecular Mechanisms Involved in Liver IR*

When the liver is subjected to an ischemic insult, the alterations induced by oxidative stress can exceed the compensatory capacity of the liver, producing cell death. The ischemic event can reprogram gene expression of the surviving cells, initiating cellular mechanisms that allow them to regenerate and remodel. ATP is depleted during the ischemic period, and then liver injury is further exacerbated during reperfusion. One of the important transcription factors involved in mediating hepatic IR injury is nuclear factor kappa B (NF-κB) [90–92].

NF-κB is normally found in the cytoplasm attached to the inhibitory protein IκB [93]. During oxidative stress, IκB is degraded, allowing for the translocation of NF-κB to the nucleus [93, 94]. When activated, NF-κB induces the synthesis of iNOS, cytokines (TNF-α), chemokines, and adhesion molecules (ICAM-1) [27, 94]. The most important mechanism for NF-κB activation is ROS production, particularly hydrogen peroxide [95], whereas the administration of antioxidants decreases its activation. NF-κB is activated during two different stages of IR, with different actions: at an early stage (from 30 min to 3 h of reperfusion), it

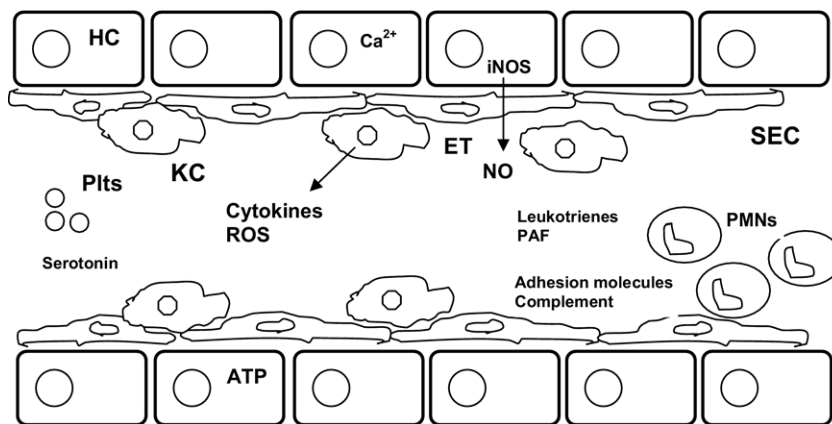
induces an increase in the expression of proinflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, and TNF-α). At a later stage (9 to 12 h after reperfusion), it acts as an anti-inflammatory agent [96]. Other genes that may participate in IR include those of ET-1, NOS-3, and hemoxygenase, and those of the heat stress factor proteins [97]. ROS have been documented to either activate or modulate all these pathways.

*Apoptosis and Necrosis*

During reperfusion, TNF-α and other mediators activate many of the proteins involved in apoptosis, such as the proteases caspase-3 and caspase-8, along with mitochondria cytochrome-C release to the cytoplasm [81]. The cascade of events that starts with these substances leads to DNA destruction and cell death [56]. With this in mind, it is reasonable to think that apoptosis is the final effector of cell death during IR. However, despite the fact that suppression of apoptosis improves survival after ischemia and decreases reperfusion damage [98–101], some investigators argue that the predominate cell death event during IR is massive necrosis [102], particularly in steatotic livers. In view of this controversy, Lemasters in 1999 proposed the theory of “necroapoptosis” [103], emphasizing the main mechanisms that participate in IR at the cellular level and suggesting that both cell death mechanisms, necrosis and apoptosis, occur simultaneously during ischemia, and that they even imbricate during reperfusion. The ischemic stimulus can culminate in necrosis or in apoptosis, depending on the interaction with other determining factors, such as a significant reduction of ATP levels [104] or in the fat content of the liver [105].

**CONCLUSION**

The cell signaling pathways and mediators of hepatic ischemia reperfusion are summarized in Fig. 1. *In vitro*



**FIG. 1.** Mechanisms involved in hepatic ischemia-reperfusion injury. Hepatocyte (HC), sinusoidal endothelial cell (SEC), Kupffer cell (KC), neutrophil (PMN), platelets (Plts), nitric oxide (NO), endothelin (ET), calcium (Ca<sup>2+</sup>), adenosine triphosphate (ATP), platelet activating factor (PAF), reactive oxygen species (ROS).

and preclinical animal studies have led to an overall better understanding of liver anatomy, physiology, and the complex signaling events during IR injury [106].

Application of pharmacologic, genetic, and surgical approaches to reduce hepatic IR injury have been applied and are increasingly being used. Therapeutic approaches include pharmacologic use of *N*-acetylcysteine, prostaglandins, prostacyclin, and ischemic preconditioning [56, 107–111].

Careful liver manipulation and efforts to minimize warm ischemia time are also important principles. Strategies to improve liver outcomes and minimize IR injury were summarized recently in a review by Clavien and colleagues [112]. Ultimately, the goal is application to safer clinical liver surgery during hepatic resections, liver transplantation, and the operative management of liver trauma.

#### REFERENCES

- Huguet C, Addario-Chieco P, Gavelli A, et al. Technique of hepatic vascular exclusion for extensive liver resection. *Am J Surg* 1992;163:602.
- Delva E, Camus Y, Nordlinger B, et al. Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic ischemia: 142 cases. *Ann Surg* 1989;209:211.
- Powner DJ. Factors during donor care that may affect liver transplantation outcome. *Prog Transplant* 2004;14:241; quiz 248.
- Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181:160.
- Romanque UP, Uribe MM, Videla LA. [Molecular mechanisms in liver ischemic-reperfusion injury and ischemic preconditioning]. *Rev Med Chil* 2005;133:469.
- Henderson JM. Liver transplantation and rejection: An overview. *Hepatogastroenterology* 1999;46(Suppl 2):1482.
- de Groot H, Rauwen U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: A review. *Transplant Proc* 2007;39:481.
- Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G15.
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;43:S31.
- Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, et al. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994;145:1421.
- Vollmar B, Menger MD, Glasz J, et al. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1994;267:G786.
- Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990;4:3355.
- Yadav SS, Howell DN, Gao W, et al. L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol* 1998;275:G1341.
- Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1996;270:G798.
- Cywes R, Packham MA, Tietze L, et al. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology* 1993;18:635.
- Pretto EA Jr. Reperfusion injury of the liver. *Transplant Proc* 1991;23:1912.
- Casillas-Ramirez A, Mosbah IB, Ramalho F, et al. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci* 2006.
- Lemasters JJ, Ji S, Thurman RG. Centrilobular injury following hypoxia in isolated, perfused rat liver. *Science* 1981;213:661.
- Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, et al. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology*, 1996;23:506.
- Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, et al. Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 1997;64:1398.
- Cavalieri B, Perrelli MG, Aragno M, et al. Ischaemic preconditioning modulates the activity of Kupffer cells during in vivo reperfusion injury of rat liver. *Cell Biochem Funct* 2003;21:299.
- Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, et al. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1200.
- Tsukamoto H. Redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:741.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298(Pt. 2):249.
- Ignarro LJ. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int Suppl* 1996;55:S2.
- Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 1999;30:1.
- Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, et al. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* 1993;213:815.
- Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, et al. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* 1997;8:80.
- Kawamura E, Yamanaka N, Okamoto E, et al. Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 1995;21:1138.
- Pannen BH, Bauer M, Noldge-Schomburg GF, et al. Regulation of hepatic blood flow during resuscitation from hemorrhagic shock: Role of NO and endothelins. *Am J Physiol* 1997;272:H2736.
- Shiraishi M, Hiroyasu S, Nagahama M, et al. Role of exogenous L-arginine in hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1997;69:429.
- Vodovotz Y, Kim PK, Bagci EZ, et al. Inflammatory modulation of hepatocyte apoptosis by nitric oxide: In vivo, in vitro, and in silico studies. *Curr Mol Med* 2004;4:753.
- Hur GM, Ryu YS, Yun HY, et al. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:917.
- Yagnik GP, Takahashi Y, Tsoulfas G, et al. Blockade of the L-arginine/NO synthase pathway worsens hepatic apoptosis and liver transplant preservation injury. *Hepatology* 2002;36:573.
- Kaizu T, Ikeda A, Nakao A, et al. Donor graft adenoviral iNOS gene transfer ameliorates rat liver transplant preservation injury and improves survival. *Hepatology* 2006;43:464.
- Scottomotau S, Uhlmann D, Loffler BM, et al. Involvement of endothelin/nitric oxide balance in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Langenbecks Arch Surg* 1999;384:65.

37. Shiratori Y, Kiriya H, Fukushi Y, et al. Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. *Dig Dis Sci* 1994;39:1265.
38. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991;260:G355.
39. Arii S, Monden K, Adachi Y, et al. Pathogenic role of Kupffer cell activation in the reperfusion injury of cold-preserved liver. *Transplantation* 1994;58:1072.
40. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, et al. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002;105:248.
41. Gopalan PK, Smith CW, Lu H, et al. Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. *J Immunol* 1997;158:367.
42. Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, et al. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 1986;137:1270.
43. Pober JS. Warner-Lambert/Parke-Davis award lecture. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Physiology and pathology. Am J Pathol* 1988;133:426.
44. Farhood A, McGuire GM, Manning AM, et al. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Leukoc Biol* 1995;57:368.
45. Kiuchi T, Oldhafer KJ, Schlitt HJ, et al. Background and prognostic implications of perireperfusion tissue injuries in human liver transplants: A panel histochemical study. *Transplantation* 1998;66:737.
46. Scoazec JY, Durand F, Degott C, et al. Expression of cytokine-dependent adhesion molecules in postreperfusion biopsy specimens of liver allografts. *Gastroenterology* 1994;107:1094.
47. Nakano H, Kuzume M, Namatame K, et al. Efficacy of intra-portal injection of anti-ICAM-1 monoclonal antibody against liver cell injury following warm ischemia in the rat. *Am J Surg* 1995;170:64.
48. Vollmar B, Glasz J, Menger MD, et al. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 1995;117:195.
49. Lappas CM, Day YJ, Marshall MA, et al. Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. *J Exp Med* 2006;203:2639.
50. Caldwell CC, Tschoep J, Lentsch AB. Lymphocyte function during hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Leukoc Biol* 2007.
51. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, et al. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 2000;118:183.
52. Lesurtel M, Graf R, Aleil B, et al. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 2006;312:104.
53. Nocito A, Georgiev P, Dahm F, et al. Platelets and platelet-derived serotonin promote tissue repair after normothermic hepatic ischemia in mice. *Hepatology* 2007;45:369.
54. Schoenwaelder SM, Yuan Y, Cooray P, et al. Calpain cleavage of focal adhesion proteins regulates the cytoskeletal attachment of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (platelet glycoprotein IIb/IIIa) and the cellular retraction of fibrin clots. *J Biol Chem* 1997;272:1694.
55. Gow AJ, Thom SR, Ischiropoulos H. Nitric oxide and peroxynitrite-mediated pulmonary cell death. *Am J Physiol* 1998;274:L112.
56. Selzner N, Rudiger H, Graf R, et al. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003;125:917.
57. Fong Y, Moldawer LL, Shires GT, et al. The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. *Surg Gynecol Obstet* 1990;170:363.
58. Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit Care Med* 1993;21:S447.
59. Thornton AJ, Strieter RM, Lindley I, et al. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J Immunol* 1990;144:2609.
60. Morariu AM, Loef BG, Aarts LP, et al. Dexamethasone: Benefit and prejudice for patients undergoing on-pump coronary artery bypass grafting: A study on myocardial, pulmonary, renal, intestinal, and hepatic injury. *Chest* 2005;128:2677.
61. Chen X, Kidder LS, Schmidt AH, et al. Osteogenic protein-1 induces bone formation in the presence of bacterial infection in a rat intramuscular osteoinduction model. *J Orthop Trauma* 2004;18:436.
62. Lichtman SN, Lemasters JJ. Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver. *Semin Liver Dis* 1999;19:171.
63. Shibuya H, Ohkohchi N, Tsukamoto S, et al. Tumor necrosis factor-induced, superoxide-mediated neutrophil accumulation in cold ischemic/reperfused rat liver. *Hepatology* 1997;26:113.
64. Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, et al. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* 1997;63:143.
65. Kato A, Gabay C, Okaya T, et al. Specific role of interleukin-1 in hepatic neutrophil recruitment after ischemia/reperfusion. *Am J Pathol* 2002;161:1797.
66. Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, et al. Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. *Exp Clin Transplant* 2004;2:174.
67. Videla LA, Fernandez V. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Arch Biol Med Exp (Santiago)* 1988;21:85.
68. McCord JM. Oxygen-derived radicals: A link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc* 1987;46:2402.
69. Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, et al. Protective effects of free radical scavenger and antioxidant administration on ischemic liver cell injury. *Transplant Proc* 1987;19:1327.
70. Nordstrom G, Seeman T, Hasselgren PO. Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery* 1985;97:679.
71. Kusumoto K, Morimoto T, Minor T, et al. Allopurinol effects in rat liver transplantation on recovery of energy metabolism and free radical-induced damage. *Eur Surg Res* 1995;27:285.
72. Koepfel TA, Lehmann TG, Thies JC, et al. Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1996;61:1397.
73. Mizoe A, Kondo S, Azuma T, et al. Preventive effects of superoxide dismutase derivatives modified with monosaccharides on reperfusion injury in rat liver transplantation. *J Surg Res* 1997;73:160.
74. Younes M, Strubelt O. The involvement of reactive oxygen species in hypoxic injury to rat liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1988;59:369.
75. Marubayashi S, Dohi K, Yamada K, et al. Changes in the levels of endogenous coenzyme Q homologs, alpha-tocopherol, and glutathione in rat liver after hepatic ischemia and reperfusion, and the effect of pretreatment with coenzyme Q10. *Biochim Biophys Acta* 1984;797:1.



76. Qin X, Gao B. The complement system in liver diseases. *Cell Mol Immunol* 2006;3:333.
77. Chavez-Cartaya RE, DeSola GP, Wright L, et al. Regulation of the complement cascade by soluble complement receptor type 1. Protective effect in experimental liver ischemia and reperfusion. *Transplantation* 1995;59:1047.
78. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, et al. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 1993;264:G801.
79. Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, et al. Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol* 1999;36:941.
80. Arumugam TV, Woodruff TM, Stocks SZ, et al. Protective effect of a human C5a receptor antagonist against hepatic ischaemia-reperfusion injury in rats. *J Hepatol* 2004;40:934.
81. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, et al. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. *Shock* 2004;21:401.
82. Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, et al. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 1991;213:137.
83. Anderson CD, Pierce J, Nicond I, et al. Modulation of mitochondrial calcium management attenuates hepatic warm ischemia reperfusion injury. *Liver Transpl* 2005;11:663.
84. Kitakaze M, Hori M, Sato H, et al. Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs. *Circ Res* 1991;69:1402.
85. Ward PA, Cunningham TW, McCulloch KK, et al. Regulatory effects of adenosine and adenine nucleotides on oxygen radical responses of neutrophils. *Lab Invest* 1988;58:438.
86. McKie LD, Bass BL, Dunkin BJ, et al. Nitric oxide mediates the blood flow response to intravenous adenosine in the rabbit. *Circ Shock* 1994;43:103.
87. Guinzberg R, Cortes D, Diaz-Cruz A, et al. Inosine released after hypoxia activates hepatic glucose liberation through A3 adenosine receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E940.
88. Van Belle H, Goossens F, Wynants J. Formation and release of purine catabolites during hypoperfusion, anoxia, and ischemia. *Am J Physiol* 1987;252:H886.
89. Van Belle H, Wynants J, Xhonneux R, et al. Changes in creatine phosphate, inorganic phosphate, and the purine pattern in dog hearts with time of coronary artery occlusion and effect thereon of mioflazine, a nucleoside transport inhibitor. *Cardiovasc Res* 1986;20:658.
90. Wullaert A, van Loo G, Heynink K, et al. Hepatic TNF signaling and NF- $\kappa$ B: Effects on liver homeostasis and beyond. *Endocr Rev* 2007.
91. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006;441:431.
92. Tsoulfas G, Geller DA. NF-kappaB in transplantation: Friend or foe? *Transpl Infect Dis* 2001;3:212.
93. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: Ten years after. *Cell* 1996;87:13.
94. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225.
95. Li Y, Zhang W, Mantell LL, et al. Nuclear factor-kappaB is activated by hyperoxia but does not protect from cell death. *J Biol Chem* 1997;272:20646.
96. Takahashi Y, Ganster RW, Gambotto A, et al. Role of NF-kappaB on liver cold ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G1175.
97. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000;28:463.
98. Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002;122:202.
99. Natori S, Selzner M, Valentino KL, et al. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 1999;68:89.
100. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, et al. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *FASEB J* 1999;13:253.
101. Bilbao G, Contreras JL, Eckhoff DE, et al. Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. *Ann Surg* 1999;230:185.
102. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, et al. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 2001;33:397.
103. Lemasters JJV. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: Shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 1999;276:G1.
104. Cursio R, Gugenheim J, Panaia-Ferrari P, et al. Improvement of normothermic rat liver ischemia/reperfusion by muramyl dipeptide. *J Surg Res* 1998;80:339.
105. Selzner M, Rudiger HA, Sindram D, et al. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology* 2000;32:1280.
106. Massip-Salcedo M, Rosello-Catafau J, Prieto J, et al. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int* 2007;27:6.
107. Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med* 1999;77:577.
108. Clavien PA, Selzner M, Rudiger 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; discussion 851.
109. 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.
110. Clavien PA, Emond J, Vauthey JN, et al. Protection of the liver during hepatic surgery. *J Gastrointest Surg* 2004;8:313.
111. Petrowsky H, McCormack L, Trujillo M, et al. A prospective, randomized, controlled trial comparing intermittent portal triad clamping versus ischemic preconditioning with continuous clamping for major liver resection. *Ann Surg* 2006;244:921; discussion 928.
112. Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, et al. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med* 2007;356:1545.

# Role of Ischemic Preconditioning in Liver Surgery and Hepatic Transplantation

Eduardo E. Montalvo-Jave · Enrique Piña · Cesar Montalvo-Arenas · Raúl Urrutia · Luis Benavente-Chenhalls · Julieta Peña-Sanchez · David A. Geller

Received: 11 March 2009 / Accepted: 24 March 2009  
© 2009 The Society for Surgery of the Alimentary Tract

## Abstract

**Introduction** The purpose of this review is to summarize intraoperative surgical strategies available to decrease ischemia–reperfusion injury associated with liver resection and liver transplantation.

**Material and method** We conducted a critical review of the literature evaluating the potential applications of hepatic ischemic preconditioning (IPC) for hepatic resection surgery and liver transplantation. In addition, we provide a basic bench-to-bedside summary of the liver physiology and cell signaling mechanisms that account for the protective effects seen with hepatic IPC.

**Keywords** Liver · Ischemia–reperfusion injury · Hepatic transplantation · Preconditioning · Surgery · Ischemic preconditioning

## Introduction

Ischemia–reperfusion injury (IRI) is a pathophysiologic process where hypoxic organ damage is accentuated follow-

ing return of blood flow and oxygen delivery to the reperfused tissue. Transient episodes of hepatic IRI occur during liver transplantation, trauma, hypovolemic shock, and elective liver resection when inflow occlusion is used to minimize blood loss. The pathophysiology of liver IRI includes both direct cellular damage as the result of the ischemic insult as well as delayed dysfunction and damage resulting from activation of inflammatory pathways. A comprehensive review of the pathophysiology of hepatic IRI is provided.<sup>1</sup>

---

E. E. Montalvo-Jave  
Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina,  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y  
Servicio de Cirugía General del Hospital General de México,  
Mexico City, Mexico

E. E. Montalvo-Jave · E. Piña  
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,  
Universidad Nacional Autónoma de México  
(UNAM) y Hospital General de México,  
Mexico City, Mexico

C. Montalvo-Arenas  
Departamento de Biología Celular y Tisular,  
Facultad de Medicina,  
Universidad Nacional Autónoma de México  
(UNAM) y Hospital General de México,  
Mexico City, Mexico

E. E. Montalvo-Jave · R. Urrutia · J. Peña-Sanchez  
Gastrointestinal Research Unit, Mayo Clinic,  
Rochester, MN, USA

L. Benavente-Chenhalls  
Department of Gastrointestinal and General Surgery,  
Mayo Clinic,  
Rochester, MN, USA

J. Peña-Sanchez  
Departamento de Biología Molecular,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM,  
Mexico City, Mexico

D. A. Geller  
Department of Surgery,  
Thomas E. Starzl Transplantation Institute,  
University of Pittsburgh,  
Pittsburgh, PA, USA

D. A. Geller (✉)  
Thomas E. Starzl Transplantation Institute,  
University of Pittsburgh,  
3459 Fifth Avenue, MUH 7 South,  
Pittsburgh, PA 15213, USA  
e-mail: gellerda@upmc.edu

Overall strategies to mitigate IRI can be broadly classified into biochemical, genetic, and surgical strategies. The purpose of this review is to summarize the mechanisms and clinical application of ischemic preconditioning (IPC), which is a surgical strategy to decrease organ IRI. IPC is a deliberate brief interruption of blood flow to an organ, followed by a brief reperfusion period, then a more prolonged period of ischemia. For the liver, IPC has been achieved by occluding the portal triad with a tourniquet or a vascular clamp, thus, interrupting the afferent blood flow from the hepatic artery and the portal vein. After a given period of time (typically 10 min), the occlusion device or clamp is removed, and the liver is reperfused for an interval (10 to 15 min), after which the portal triad is once more occluded either intermittently or continuously for the duration of the hepatic procedure. The brief initial ischemic period does not damage the liver macroscopically and induces signaling pathways that result in subsequent protection against a more prolonged IRI.<sup>2–4</sup>

Hence, based on the experimental evidence supporting IPC, several authors conducted a series of clinical trials examining IPC for both liver resection and transplantation. To date, their results have been controversial, particularly in the area of liver transplant. In this study, we reviewed the current scientific literature to assess the specific strategies for hepatic IPC and summarize the signaling mechanisms and clinical applications.

## Background

IPC was initially identified in the kidney by Zager et al.<sup>5,6</sup> and subsequently in the myocardium by Murry et al.<sup>7</sup> in 1986 who published this novel strategy in a heart ischemia–reperfusion model. In the heart model, brief episodes of ischemia slow the rate of adenosine triphosphate (ATP) depletion during subsequent ischemic episodes.<sup>8</sup> Additionally, intermittent reperfusion may be beneficial to the myocardium by washing out catabolites that have accumulated during ischemia. Therefore, the authors proposed that multiple brief ischemic episodes might actually protect the heart from a subsequent sustained ischemic insult.<sup>7</sup>

This innovative application of IPC has been applied experimentally in animal models of brain (1994),<sup>9</sup> skeletal muscle (1995),<sup>10</sup> intestine (1996),<sup>11</sup> lung (1996),<sup>12</sup> kidney (1997),<sup>13</sup> spinal cord (1998),<sup>14</sup> retina (1998),<sup>15</sup> and liver<sup>16–19</sup> IRI. IPC was first demonstrated in the liver by Lloris-Carsi et al.<sup>20</sup> in 1993. Occlusion of the portal triad for 5 min, followed by 10 min of reperfusion improved survival and hepatic function after 90 min of ischemia in rats. These findings were reproduced in similar models,<sup>21,22</sup> modifying both the duration of total ischemia and time intervals of IPC. These findings are characterized by a decrease in the intensity

of the hepatocellular injury, as evident by increase in cellular levels of ATP,<sup>17</sup> reduction of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ <sup>23</sup> and interleukin (IL)-6 levels,<sup>24</sup> decreased leukocyte–endothelial cell (EC) interaction,<sup>25</sup> and reduction in EC injury.<sup>26</sup> This is associated with an increase in global blood flow to the liver,<sup>27</sup> increase in hepatic microcirculation,<sup>28</sup> reduction in hepatocellular apoptosis, maintenance of energy metabolism,<sup>29</sup> increase in intracellular hepatic oxygenation,<sup>30</sup> and protection of extrahepatic organ damage as well.<sup>31</sup>

## Ischemic Preconditioning as a Protective Mechanism

The beneficial effect of IPC has been described in clinical studies by Clavien et al.<sup>32,33</sup> at the Universities of Duke and Zurich, in 2000 and 2003, respectively. Their group evaluated the protective effect of IPC (10 min of ischemia and 10 min of reperfusion) before parenchymal transection of the liver during planned hepatic resection. They demonstrated a decrease of EC apoptosis in patients after partial hepatectomy. Furthermore, IPC was associated with significant beneficial effects in patients after hepatic resection in steatotic liver as evident by control lipid peroxidation, hepatic microcirculation failure, and neutrophil accumulation, reducing the subsequent hepatic injury. This finding has been confirmed by animal studies as well.<sup>34,35</sup>

The effects of IPC are not limited to warm ischemia but also have been reported with cold ischemia. Arai et al.<sup>36,37</sup> from the University of North Carolina demonstrated that IPC prior to liver storage for up to 30 h in UW solution significantly reduced Kupffer cells (KC) activation and EC injury. IPC also decreased the morphological changes that induce EC detachment, apparently by reducing the activity of MP.<sup>38</sup> Interestingly, IPC limited to only one lobe of the liver can protect the nonpreconditioned liver after transplantation. In a rat model in which lobar IPC was followed by whole-organ transplantation, the findings showed that IPC protects sinusoidal endothelial cells and suppresses Kupffer cell activation after storage and reperfusion.<sup>39</sup> The benefits in the preconditioned liver portion were extrapolated to the contralateral liver, yielding a higher survival of the graft. This phenomenon is termed “heterologous preconditioning,”<sup>39</sup> and might be useful to protect the remnant liver against IRI during partial hepatectomy or transplantation.

The protective effect of IPC against IRI can be separated into two distinct phases.<sup>40</sup> The first is known as “acute preconditioning” and confers protection from the moment reperfusion begins and is maintained for 1 to 2 h.<sup>41</sup> Acute preconditioning uses preexisting substances without de novo synthesis of proteins.<sup>42</sup> “Delayed preconditioning” refers to the subsequent period in which the initial effects of IPC present 24 h after reperfusion, lasting up to 3 days.

Delayed preconditioning relies on gene expression within the reperfused tissue to synthesize new proteins.<sup>41</sup> The release of these substances into the systemic circulation allows other distant organs to benefit,<sup>43,44</sup> a phenomenon known as “remote preconditioning.”<sup>39,43</sup> Similar mechanisms are probably responsible for the effects seen in both remote and heterologous preconditioning.<sup>38</sup>

The precise mechanisms by which IPC confers protection to the liver against IRI are still unknown. Several mediators and pathways have been implicated, among which the most studied are preservation of ATP levels through activation of the adenosine-monophosphate-dependent kinase, induction of antioxidant systems,<sup>19</sup> regulation of TNF- $\alpha$  synthesis,<sup>45</sup> release of nitric oxide (NO), and increase in adenosine levels.<sup>46</sup> Because of its reproducibility, IPC is potentially applicable to multiple clinical conditions, and the search to identify and understand its mechanisms has become the focus of several researchers worldwide.

### Molecular Basis and Cellular Mechanisms of Ischemic Preconditioning

Multiple mechanistic pathways are involved in IPC.<sup>22</sup> IPC protects the liver by acting fundamentally on adenosine and nitric oxide (NO), as well as intracellular kinases. Activation of these pathways initiate a cascade of events that progressively increase both the intensity and the extent of the protective effects of IPC. IPC suppresses reactive oxygen species (ROS) production by KC<sup>34</sup> and induces cellular resistance to ROS,<sup>47</sup> and IPC directly protected hepatocytes after warm IR.<sup>48</sup> It also decreased TNF- $\alpha$  synthesis,<sup>49</sup> which could partially explain the mechanism of remote preconditioning. IPC decreases hepatic P-selectin expression, reducing leukocyte adhesion, migration, and activation.<sup>50</sup> The decrease of adhesion molecule expression is probably a consequence of the reduction of TNF- $\alpha$  synthesis. IPC induces the production and release of adenosine, activating the adenosine A2 receptor, increasing NO production, and protecting EC.<sup>51,52</sup> Adenosine inhibits leukocyte adhesion, decreases the expression of adhesion molecules, inhibits leukocyte and platelet function,<sup>53</sup> and inhibits the production of ROS.<sup>54</sup> It is also has a potent vasodilating effect.<sup>55</sup> NO plays a central role in both acute and delayed preconditioning, acting as trigger in the former<sup>56</sup> and as a mediator in the latter.<sup>57</sup> In acute preconditioning, NO is synthesized entirely by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) within hepatic EC.<sup>58</sup> In delayed preconditioning, NO production requires the synthesis of inducible nitric oxide synthase (iNOS).<sup>59</sup> NO also reduces oxygen and energy consumption by opening ATP-dependent K<sup>+</sup> channels and increasing cyclic guanosine monophosphate

(cGMP) concentrations.<sup>60–62</sup> NO exerts anti-inflammatory effects by inhibiting activation of stellate cells,<sup>63</sup> neutrophil adhesion,<sup>64</sup> and platelet aggregation.<sup>65</sup> NO activates intracellular kinases that increase iNOS transcription,<sup>66</sup> and it also modifies apoptosis by inhibiting caspase activity,<sup>67</sup> preventing release of cytochrome-c,<sup>68</sup> increasing cGMP, and promoting Bcl-2<sup>69</sup> and Hsp<sup>67</sup> expression. Some of these effects can be reproduced by the exogenous administration of NO donors.<sup>55</sup>

The decrease of ROS synthesis and neutrophil-mediated injury by IPC confers structural protection to microcirculation, and, in conjunction with NO production in IPC, hepatic perfusion is significantly improved.<sup>70,71</sup> Several intracellular kinases are activated by adenosine and other substances, including bradykinin.<sup>61</sup> Protein kinase C (PKC), p38-activated protein kinase (p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)), and protein kinase B (Akt/PKB)<sup>72–74</sup> play an important role in IPC, although the actual mechanisms are not completely understood.<sup>75</sup> PKC and p38 MAPK are important to the intracellular Na<sup>+</sup> homeostasis.<sup>76</sup> The adenosine A2 receptor activates Akt/PKB in hepatocytes,<sup>77</sup> conferring antiapoptotic effects<sup>78</sup> and stimulating NO production through eNOS synthesis.<sup>79</sup>

The conservation of energy observed in IPC results from a decrease in cellular metabolism.<sup>28,80</sup> Energy conservation prevents necrosis, and the availability of energetic substrate allows for a controlled cellular modulation regulated by apoptosis.<sup>81</sup>

Delayed preconditioning is caused by genetic modification and results from the proteins and substances expressed by the modified genes. One example is nuclear factor (NF)- $\kappa$ B;<sup>82</sup> its increased expression and activation by IPC produces synthesis of antioxidants,<sup>83</sup> Hsp,<sup>84</sup> and iNOS.<sup>58</sup>

### Ischemia–Reperfusion Injury Mechanisms

Although a complete summary of IRI mechanisms is beyond the scope of this review, we will summarize the signaling pathways as they pertain to IPC. The main mechanisms involved in IRI can be summarized in cell activation and cytokine release, expression of adhesion molecules, and microcirculatory alterations with subsequent cellular death.<sup>85</sup>

During the first hours of reperfusion, KC are activated<sup>86</sup> and start to produce and release ROS<sup>87</sup> and the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1.<sup>88</sup> These cytokines promote  $\beta$ 2-integrin/intercellular adhesion molecule (ICAM) expression by EC,<sup>89</sup> potentiating the second IR stage that involves activation, recruitment, and adhesion of neutrophils.<sup>90,91</sup> Among the adhesion molecules implicated in IRI are ICAM-1 from EC and the  $\beta$ 2-integrin Mac-1 from neutrophils. Selectins promote EC and neutrophil interaction<sup>92</sup> through ICAM-1 and Mac-1.<sup>93</sup> Once adhered,



neutrophils leave the intravascular space and migrate to the interstitial space, where they regulate the intensity of the injury through phagocytosis and through the production and release of ROS and proteases.<sup>94</sup> The reduction of the sinusoidal lumen decreases blood flow, producing leukocyte accumulation, impairing reperfusion of liver parenchyma even after blood flow is reestablished. IRI increases ET-1, disrupting the balance between the vasoconstriction effects of ET-1<sup>95</sup> and the vasodilating actions of NO.<sup>96,97</sup> Stellate cells also respond to ET-1 and NO variations, affecting microcirculatory blood flow as well.<sup>96-98</sup>

EC and hepatocytes are the main targets of IRI. One of the mechanisms by which IR produces cell death is by apoptosis,<sup>99</sup> which requires caspase expression.<sup>100,101,102</sup> However, necrosis has been documented to play an important role in cell death after IRI. Because of these findings, cell death occurring via both pathways overlap, under the concept of necroapoptosis.<sup>103</sup>

### IPC Applications within Liver Surgery

Based on our current understanding of the pathophysiology of IRI, several techniques have been adapted to reduce blood loss and counteract the effects of ischemia on hepatic parenchyma during liver resection surgery.<sup>104,105</sup>

It is well documented that one of the main problems associated with hepatic surgery is blood loss, with a clear relationship between the severity of the hemorrhage and postoperative complications.<sup>51</sup> The risk of major hemorrhage is inherent to liver surgery. It can occur during mobilization of the liver, dissection of the portal triad, or division of the hepatic parenchyma. Moreover, hemorrhage can also occur postoperatively and can compound the oxidative stress induced intraoperatively.<sup>106</sup> If the blood loss is substantial, the hypotension, body fluid distribution, and ischemia induced by hypovolemic shock significantly increases morbidity and mortality. Hemorrhage and hypovolemic shock increase the need for blood transfusions, and transfusions *per se* increase the risk of postoperative complications<sup>107</sup> and represent a greater risk of infections due to the immunosuppressive effects of allogenic blood.<sup>108,109</sup>

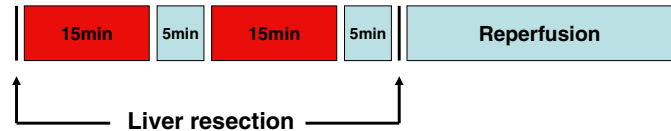
Occlusion of the portal triad (Pringle maneuver) is still employed almost a century after its original description to interrupt hepatic blood flow and decrease hemorrhage.<sup>110</sup> One technical variation is ipsilateral occlusion of the hepatic artery and portal vein instead of clamping the entire portal triad.<sup>52,104,111</sup> It is important to emphasize the differences between continuous and intermittent vascular occlusion of the liver. Continuous vascular occlusion (CVO) of the portal triad has proven effective in reducing hepatic hemorrhage, thus, decreasing the need of trans-

fusions, but prolonged CVO results in greater IRI. To reduce the effects of continuous ischemia, hepatic blood flow can be reduced intermittently by clamping and unclamping the hepatic pedicle.<sup>112</sup> Intermittent vascular occlusion (IVO) allows for short periods of ischemia (from 15 to 30 min), followed by brief periods of reperfusion (from 5 to 10 min).<sup>113</sup> Based on this theory, experimental<sup>113-115</sup> and clinical<sup>33,52</sup> studies have demonstrated the efficacy of IVO to decrease IRI when compared to CVO, resulting in better hepatic function as evident by less elevation of liver enzymes and improved survival and allows for longer ischemic periods.<sup>52,115</sup> However, IVO is associated with increased blood loss during each reperfusion period.<sup>32,113</sup> Although the mechanisms by which IVO reduces the intensity of IRI are unclear, reduction in hepatocyte apoptosis is one major factor, particularly in procedures with prolonged ischemic periods (larger than 75 min).<sup>116</sup> Both CVO and IVO are protective against IRI by maintaining hepatic microcirculation and decreasing Kupffer cell activation for clinically relevant ischemic periods. Intermittent clamping appears superior for prolonged ischemia.<sup>70</sup> Many of the changes observed in IVO's cytoprotection against IRI are similar to those observed during ischemic preconditioning.<sup>32</sup>

Figure 1 presents a schematic description of IPC based on the different strategies of hepatic IR. The times have been adjusted according to trials that favor IPC and represent continuous ischemia and intermittent portal triad clamping.

### Clinical Applications of IPC During Hepatic Resection

IPC should be applicable clinically during hepatic resection and transplantation. In humans, IPC was first performed on 24 patients undergoing elective hemihepatectomy and significantly reduced elevation in postoperative serum transaminases and decreased EC apoptosis.<sup>32</sup> The same group also conducted a randomized prospective study of IPC for hepatic resection. They evaluated IPC in 100 patients with similarly favorable results, particularly in patients with steatosis.<sup>33</sup> Several subsequent studies have reproduced the beneficial effects of IPC during hepatic resection surgery.<sup>117-119</sup> These studies have also demonstrated an improved hemodynamic stability in the post-reperfusion stage,<sup>118</sup> better postoperative evolution of cirrhotic patients,<sup>119</sup> and greater protection and tolerance to longer ischemic periods.<sup>117</sup> Another randomized study showed less postoperative hemorrhage, bile leak, and liver failure with use of IPC.<sup>120</sup> However, in spite of the encouraging findings in several randomized clinical studies, another group was not able to demonstrate any benefit to IPC during hepatectomy under vascular exclusion of the

**Figure 1** Surgical strategies for liver IPC.**A. Continuous ischemia****B. Ischemic Preconditioning (IPC) with Continuous Clamping****C. Intermittent Portal Triad Clamping**

liver with preservation of the caval flow.<sup>121</sup> In this study, IPC did not improve postoperative liver function or affect morbidity/mortality rates.

**IPC and Liver Transplantation**

It stands to reason that IPC could also be applied in the liver transplant setting which involves donor graft ischemia associated with the donor condition, followed by a prolonged cold storage period, and then warm ischemia during implantation and reperfusion. However, there is significant controversy regarding the use of IPC during donor hepatectomy. A recent review on this topic revealed lack of evidence to support or refute this practice.<sup>122</sup> Ischemic preconditioning for 10 min in deceased donors decrease serum transaminases but did not appear to have any long-term clinical impact on liver graft survival.<sup>123</sup> A prospective trial of IPC at time of deceased donor hepatectomy with donor clamping for 5 min showed that deceased donor livers can tolerate 5 min of ischemia, but application of IPC did not decrease graft injury posttransplant.<sup>124</sup> Recently, the same group published a randomized controlled trial using 10 min of IPC instead of the 5 min in their pilot study. Fifty donors were randomized to 10 min of IPC vs. 51 controls without IPC; however, no clinical benefit was demonstrated in the patients that were transplanted with the IPC-preconditioned donor grafts.<sup>125</sup> The authors suggest that use of other potential strategies including pharmacological therapy combined with IPC.<sup>125</sup> In contrast, another group performed a randomized prospective study with 60 liver transplant patients and showed a significant improvement in IRI and decreased apoptosis in the 10-min IPC group.<sup>126</sup>

**IPC and Steatosis**

Steatotic livers are particularly susceptible to IRI, and fatty livers have a greater risk of poor graft function or primary nonfunction after liver transplantation.<sup>127</sup> Use of IPC was especially beneficial in a subset of patients undergoing elective hepatic resection,<sup>33</sup> a finding well-documented in experimental models.<sup>128,129</sup> Recently, promising results were observed in steatotic livers using adiponectin, which activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- $\alpha$ ), a transcription factor that regulates inflammation in liver disease.<sup>130</sup> Improving the tolerance of steatotic livers to IRI with IPC and/or biochemical strategies could significantly increase the number of livers available for transplantation.

**Conclusion**

IR injury is important in both hepatic resection surgery and liver transplantation. IPC activates several signaling pathways leading to hepatic protection in animal models of liver surgery. However, the contradictory results with use of IPC during elective hepatic resection in randomized clinical trials from experienced groups underscores the complexity (or diversity) of the patient population undergoing hepatic resection surgery and the caution in routine clinical application. Further clinical trials are needed to identify the precise patient population that will benefit from IPC. Moreover, combined strategies of IPC with pharmacologic modulation may be useful, particularly with steatotic livers. Finally, further basic research into the complex signaling of IPC during hepatic surgery is warranted to better elucidate the mechanisms of protection.

**Acknowledgement** We thank Dr. David Nagorney for helpful suggestions and a critical review of the manuscript. (Department of Surgery, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA)

## References

- Montalvo EE, Escalante T, Pina E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *Minireview. J Surg Res* 2008;147:153–159. doi:10.1016/j.jss.2007.06.015.
- Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997;25:934–937. doi:10.1002/hep.510250424.
- Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia–reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G15–G26.
- Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003;125:917–936. doi:10.1016/S0016-5085(03)01048-5.
- Zager RA, Baltus LA, Sharma HM, Jurkowitz MS. Responses of the ischemic acute renal failure kidney to additional ischemic events. *Kidney Int* 1984;26:689–700. doi:10.1038/ki.1984.204.
- DeOliveira ML, Graf R, Clavien PA. Ischemic preconditioning: promises from the laboratory to patients—sustained or disillusioned? *Am J Transplant* 2008;8:489–491. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.02091.x.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124–1136.
- Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB. Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol* 1986;251:H1306–H1315.
- Glazier SS, O'Rourke DM, Graham DI, Welsh FA. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994;14:545–553.
- Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 1995;29:782–788.
- Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222:27–32. doi:10.1006/bbrc.1996.0692.
- Du ZY, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, Macdonald P. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant* 1996;15:1258–1267.
- Turman MA, Bates CM. Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Ren Fail* 1997;19:47–60. doi:10.3109/08860229709026259.
- Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Aoki M, Sadahiro M, Tabayashi K. Enhancement of heat shock protein expression after transient ischemia in the preconditioned spinal cord of rabbits. *J Vasc Surg* 1998;27:720–725. doi:10.1016/S0741-5214(98)70238-1.
- Roth S, Li B, Rosenbaum PS, Gupta H, Goldstein IM, Maxwell KM, Gidday JM. Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:777–785.
- Hardy KJ, McClure DN, Subwongcharoen S. Ischaemic preconditioning of the liver: a preliminary study. *Aust N Z J Surg* 1996;66:707–710. doi:10.1111/j.1445-2197.1996.tb00722.x.
- Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:264–270. doi:10.1006/bbrc.1996.1790.
- Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999;30:1223–1231. doi:10.1002/hep.510300513.
- Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology* 2003;125:1480–1491. doi:10.1016/j.gastro.2003.05.005.
- Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* 1993;25:3303–3304.
- Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T, Uchiyama H, Sugimachi K. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg* 1998;85:1636–1640. doi:10.1046/j.1365-2168.1998.00917.x.
- Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003;20:383–396. doi:10.1159/000072064.
- Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia–reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999;30:1481–1489. doi:10.1002/hep.510300622.
- Tsuyama H, Shimizu K, Yoshimoto K, Nezuka H, Ito H, Yamamoto S, Hasebe K, Onishi I, Muraoka K, Ninomiya I, Tani T, Hashimoto T, Yagi M, Miwa K. Protective effect of ischemic preconditioning on hepatic ischemia–reperfusion injury in mice. *Transplant Proc* 2000;32:2310–2313. doi:10.1016/S0041-1345(00)01677-8.
- Howell JG, Zibari GB, Brown MF, Burney DL, Sawaya DE, Olinde JG, Granger DN, McDonald JC. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. *Transplantation* 2000;69:300–303. doi:10.1097/00007890-200001270-00017.
- Ishii S, Abe T, Saito T, Tsuchiya T, Kanno H, Miyazawa M, Suzuki M, Motoki R, Gotoh M. Effects of preconditioning on ischemia/reperfusion injury of hepatocytes determined by immediate early gene transcription. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:461–468. doi:10.1007/s005340100010.
- Nilsson B, Friman S, Gustafsson BI, Delbro DS. Preconditioning protects against ischemia/reperfusion injury of the liver. *J Gastrointest Surg* 2000;4:44–49. doi:10.1016/S1091-255X(00)80031-1.
- Koti RS, Yang W, Dashwood MR, Davidson BR, Seifalian AM. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transplant* 2002;8:1182–1191. doi:10.1053/jlts.2002.36846.
- Peralta C, Bartrons R, Riera L, Manzano A, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G163–G171.
- Koti RS, Seifalian AM, McBride AG, Yang W, Davidson BR. The relationship of hepatic tissue oxygenation with nitric oxide metabolism in ischemic preconditioning of the liver. *FASEB J* 2002;16:1654–1656.
- Peralta C, Fernandez L, Panes J, Prats N, Sans M, Pique JM, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia–reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 2001;33:100–113. doi:10.1053/jhep.2001.20529.
- Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without

- ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003;238:843–850. discussion 851–852. doi:10.1097/01.sla.0000098620.27623.7d.
33. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 2000;232:155–162. doi:10.1097/00000658-200008000-00001.
  34. Serafin A, Rosello-Catafau J, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Peralta C. Ischemic preconditioning increases the tolerance of fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am J Pathol* 2002;161:587–601.
  35. Casillas-Ramirez A, Amine-Zaouali M, Massip-Salcedo M, Padriasa-Altes S, Bintanel-Morcillo M, Ramalho F, Serafin A, Rimola A, Arroyo V, Rodes J, Rosello-Catafau J, Peralta C. Inhibition of angiotensin II action protects rat steatotic livers against ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 2008;36:1256–1266. doi:10.1097/CCM.0b013e31816a023c.
  36. 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;31:425–427. doi:10.1016/S0041-1345(98)01690-X.
  37. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. 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. doi:10.1053/jhep.2000.8896.
  38. Sindram D, Rudiger HA, Upadhyya AG, Strasberg SM, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism. *J Hepatol* 2002;36:78–84. doi:10.1016/S0168-8278(01)00229-X.
  39. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Ischemic preconditioning of rat livers against cold storage-reperfusion injury: role of non-parenchymal cells and the phenomenon of heterologous preconditioning. *Liver Transplant* 2001;7:292–299. doi:10.1053/jlts.2001.23080.
  40. Banga NR, Homer-Vanniasinkam S, Graham A, Al-Mukhtar A, White SA, Prasad KR. Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br J Surg* 2005;92:528–538. doi:10.1002/bjs.5004.
  41. Jenkins DP, Baxter GF, Yellon DM. The pathophysiology of ischaemic preconditioning. *Pharmacol Res* 1995;31:219–224. doi:10.1016/1043-6618(95)80022-0.
  42. Cutn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1200–1208. doi:10.1016/S0891-5849(02)01017-1.
  43. Ates E, Genc E, Erkasap N, Erkasap S, Akman S, Firat P, Emre S, Kiper H. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation* 2002;74:1247–1251. doi:10.1097/00007890-200211150-00009.
  44. Verdouw PD, Gho BC, Koning MM, Schoemaker RG, Duncker DJ. Cardioprotection by ischemic and nonischemic myocardial stress and ischemia in remote organs. Implications for the concept of ischemic preconditioning. *Ann NY Acad Sci* 1996;793:27–42. doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb33502.x.
  45. Teoh N, Leclercq I, Pena AD, Farrell G. Low-dose TNF- $\alpha$  protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: implications for preconditioning. *Hepatology* 2003;37:118–128. doi:10.1053/jhep.2003.50009.
  46. Kiemer AK, Vollmar AM, Bilzer M, Gerwig T, Gerbes AL. Atrial natriuretic peptide reduces expression of TNF- $\alpha$  mRNA during reperfusion of the rat liver upon decreased activation of NF- $\kappa$ B and AP-1. *J Hepatol* 2000;33:236–246. doi:10.1016/S0168-8278(00)80364-5.
  47. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, op den Winkel M, Fraunberger P, Bilzer M. Induction of cellular resistance against Kupffer cell-derived oxidant stress: a novel concept of hepato-protection by ischemic preconditioning. *Hepatology* 2003;37:286–295. doi:10.1053/jhep.2003.50064.
  48. Tejima K, Arai M, Ikeda H, Tomiya T, Yanase M, Inoue Y, Nagashima K, Nishikawa T, Watanabe N, Omata M, Fujiwara K. Ischemic preconditioning protects hepatocytes via reactive oxygen species derived from Kupffer cells in rats. *Gastroenterology* 2004;127:1488–1496. doi:10.1053/j.gastro.2004.07.023.
  49. Peralta C, Perales JC, Bartrons R, Mitchell C, Gilgenkrantz H, Xaus C, Prats N, Fernandez L, Gelpi E, Panes J, Rosello-Catafau J. 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;160:2111–2122.
  50. Sawaya DE Jr, Brown M, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger DN, McDonald JC, Zibari GB. The role of ischemic preconditioning in the recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 1999;85:163–170. doi:10.1006/jsre.1999.5672.
  51. Nagorney DM, van Heerden JA, Ilstrup DM, Adson MA. Primary hepatic malignancy: surgical management and determinants of survival. *Surgery* 1989;106:740–748. discussion 748–749.
  52. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg* 1999;229:369–375. doi:10.1097/00000658-199903000-00010.
  53. 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;8:313–320. doi:10.1097/00024382-199711000-00001.
  54. Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 1994;76:5–13.
  55. Hori M, Kitakaze M. Adenosine, the heart, and coronary circulation. *Hypertension* 1991;18:565–574.
  56. Lochner A, Marais E, Du Toit E, Moolman J. Nitric oxide triggers classic ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci* 2002;962:402–414.
  57. Rakhit RD, Edwards RJ, Marber MS. Nitric oxide, nitrates and ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1999;43:621–627. doi:10.1016/S0008-6363(99)00081-4.
  58. Shah V, Kamath PS. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liver Transplant* 2003;9:1–11. doi:10.1053/jlts.2003.36244.
  59. Takano H, Manchikalapudi S, Tang XL, Qiu Y, Rizvi A, Jadoon AK, Zhang Q, Bolli R. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation* 1998;98:441–449.
  60. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 1998;97:2463–2469.
  61. Billiar TR, Curran RD, Harbrecht BG, Stadler J, Williams DL, Ochoa JB, Di Silvio M, Simmons RL, Murray SA. Association between synthesis and release of cGMP and nitric oxide biosynthesis by hepatocytes. *Am J Physiol* 1992;262:C1077–C1082.
  62. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1998;179:169–187. doi:10.1023/A:1006832207864.
  63. 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. doi:10.1172/JCI117769.
  64. Harbrecht BG, Wu B, Watkins SC, Billiar TR, Peitzman AB. Inhibition of nitric oxide synthesis during severe shock but not



- after resuscitation increases hepatic injury and neutrophil accumulation in hemorrhaged rats. *Shock* 1997;8:415–421. doi:10.1097/00024382-199712000-00004.
65. Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J, Demetris AJ, Ochoa J, Curran RD, Simmons RL. Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen radical-mediated hepatic injury. *J Leukoc Biol* 1992;52:390–394.
  66. Nandagopal K, Dawson TM, Dawson VL. Critical role for nitric oxide signaling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:474–478.
  67. Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem* 1997;272:1402–1411. doi:10.1074/jbc.272.2.1402.
  68. Kim YM, Kim TH, Chung HT, Talanian RV, Yin XM, Billiar TR. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. *Hepatology* 2000;32:770–778. doi:10.1053/jhep.2000.18291.
  69. Genaro AM, Hortelano S, Alvarez A, Martinez C, Bosca L. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J Clin Invest* 1995;95:1884–1890. doi:10.1172/JCI117869.
  70. Vajdova K, Heinrich S, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Ischemic preconditioning and intermittent clamping improve murine hepatic microcirculation and Kupffer cell function after ischemic injury. *Liver Transplant* 2004;10:520–528. doi:10.1002/lt.20126.
  71. Rehman H, Connor HD, Ramshesh VK, Theruvath TP, Mason RP, Wright GL, Lemasters JJ, Zhong Z. Ischemic preconditioning prevents free radical production and mitochondrial depolarization in small-for-size rat liver grafts. *Transplantation* 2008;85:1322–1331. doi:10.1097/TP.0b013e31816de302.
  72. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti MP, Paola D, Pronzato MA, Albano E. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001;33:131–139. doi:10.1053/jhep.2001.21050.
  73. Harada N, Hatano E, Koizumi N, Nitta T, Yoshida M, Yamamoto N, Brenner DA, Yamaoka Y. Akt activation protects rat liver from ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2004;121:159–170. doi:10.1016/j.jss.2004.04.016.
  74. Izuishi K, Fujiwara M, Hossain MA, Usuki H, Maeta H. Significance of phosphoinositide 3-kinase pathway on ischemic preconditioning followed by ischemia reperfusion in mice liver. *Transplant Proc* 2003;35:132–133. doi:10.1016/S0041-1345(02)03789-2.
  75. Ricciardi R, Meyers WC, Schaffer BK, Kim RD, Shah SA, Wheeler SM, Donohue SE, Sheth KR, Callery MP, Chari RS. Protein kinase C inhibition abrogates hepatic ischemic preconditioning responses. *J Surg Res* 2001;97:144–149. doi:10.1006/jsre.2001.6139.
  76. Carini R, Grazia De Cesaris M, Splendore R, Domenicotti C, Nitti MP, Pronzato MA, Albano E. Signal pathway responsible for hepatocyte preconditioning by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1047–1055. doi:10.1016/S0891-5849(03)00039-X.
  77. Carini R, Grazia De Cesaris M, Splendore R, Baldanzi G, Nitti MP, Alchera E, Filigheddu N, Domenicotti C, Pronzato MA, Graziani A, Albano E. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in the development of hepatocyte preconditioning. *Gastroenterology* 2004;127:914–923. doi:10.1053/j.gastro.2004.06.018.
  78. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231–241. doi:10.1016/S0092-8674(00)80405-5.
  79. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601–605. doi:10.1038/21224.
  80. Selzner N, Selzner M, Jochum W, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the steatotic mouse liver against reperfusion injury: an ATP dependent mechanism. *J Hepatol* 2003;39:55–61. doi:10.1016/S0168-8278(03)00147-8.
  81. Kim JS, Qian T, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology* 2003;124:494–503. doi:10.1053/gast.2003.50059.
  82. Teoh N, Dela Pena A, Farrell G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappa B, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology* 2002;36:94–102. doi:10.1053/jhep.2002.33134.
  83. Steare SE, Yellon DM. The potential for endogenous myocardial antioxidants to protect the myocardium against ischaemia-reperfusion injury: refreshing the parts exogenous antioxidants cannot reach? *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:65–74. doi:10.1016/S0022-2828(08)80008-9.
  84. Yamamoto Y, Kume M, Yamaoka Y. Implications of heat shock proteins during liver surgery and liver perfusion. *Recent Results Cancer Res* 1998;147:157–172.
  85. Casillas-Ramirez A, Mosbah IB, Ramalho F, Rosello-Catafau J, Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci* 2006;79:1881–1894. doi:10.1016/j.lfs.2006.06.024.
  86. Wanner GA, Ertel W, Muller P, Hofer Y, Leiderer R, Menger MD, Messmer K. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 1996;5:34–40. doi:10.1097/00024382-19961000-00008.
  87. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991;260:G355–G362.
  88. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 1994;57:253–258. doi:10.1006/jsre.1994.1140.
  89. Colletti LM, Cortis A, Lukacs N, Kunkel SL, Green M, Strieter RM. Tumor necrosis factor up-regulates intercellular adhesion molecule 1, which is important in the neutrophil-dependent lung and liver injury associated with hepatic ischemia and reperfusion in the rat. *Shock* 1998;10:182–191.
  90. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990;4:3355–3359.
  91. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1994;267:G786–G793.
  92. Zibari GB, Brown MF, Burney DL, Granger N, McDonald JC. Role of P-selectin in the recruitment of leukocytes in mouse liver exposed to ischemia and reperfusion. *Transplant Proc* 1998;30:2327–2330. doi:10.1016/S0041-1345(98)00641-1.
  93. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994;55:662–675.
  94. Jaeschke H, Smith CW. Cell adhesion and migration. III. Leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature. *Am J Physiol* 1997;273:G1169–G1173.
  95. Zhang JX, Pegoli W Jr, Clemens MG. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1994;266:G624–G632.

96. Mittal MK, Gupta TK, Lee FY, Sieber CC, Groszmann RJ. Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver. *Am J Physiol* 1994;267:G416–G422.
97. Kawamura E, Yamanaka N, Okamoto E, Tomoda F, Furukawa K. Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia–reperfusion injury. *Hepatology* 1995;21:1138–1143.
98. Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* 1993;213:815–823. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17824.x.
99. Sasaki H, Matsuno T, Tanaka N, Orita K. Activation of apoptosis during the reperfusion phase after rat liver ischemia. *Transplant Proc* 1996;28:1908–1909.
100. Natori S, Selzner M, Valentino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA, Gores GJ. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 1999;68:89–96. doi:10.1097/00007890-199907150-00018.
101. Contreras JL, Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Anthony Thompson J, Eckhoff DE. Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver in mice. *Surgery* 2004;136:390–400. doi:10.1016/j.surg.2004.05.015.
102. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, Saint-Paul MC, Ferrua B, Auburger AP. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *FASEB J* 1999;13:253–261.
103. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;43:S31–S44. doi:10.1002/hep.21062.
104. Smyrniotis V, Farantos C, Kostopanagiotou G, Arkadopoulos N. Vascular control during hepatectomy: review of methods and results. *World J Surg* 2005;29:1384–1396. doi:10.1007/s00268-005-0025-x.
105. Figueras J, Llado L, Ruiz D, Ramos E, Busquets J, Rafecas A, Torras J, Fabregat J. Complete versus selective portal triad clamping for minor liver resections: a prospective randomized trial. *Ann Surg* 2005;241:582–590. doi:10.1097/01.sla.0000157168.26021.b8.
106. Garcea G, Gescher A, Steward W, Dennison A, Berry D. Oxidative stress in humans following the Pringle manoeuvre. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006;5:210–214.
107. Nielsen HJ. Detrimental effects of perioperative blood transfusion. *Br J Surg* 1995;82:582–587. doi:10.1002/bjs.1800820505.
108. Taylor RW, Manganaro L, O'Brien J, Trotter SJ, Parkar N, Veremakis C. Impact of allogenic packed red blood cell transfusion on nosocomial infection rates in the critically ill patient. *Crit Care Med* 2002;30:2249–2254. doi:10.1097/00003246-200210000-00012.
109. Ikuta S, Miki C, Hatada T, Inoue Y, Araki T, Tanaka K, Tonouchi H, Kusunoki M. Allogenic blood transfusion is an independent risk factor for infective complications after less invasive gastrointestinal surgery. *Am J Surg* 2003;185:188–193. doi:10.1016/S0002-9610(02)01370-3.
110. Pringle JH. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg* 1908;48:541–549. doi:10.1097/0000658-190810000-00005.
111. Dixon E, Vollmer CM Jr, Bathe OF, Sutherland F. Vascular occlusion to decrease blood loss during hepatic resection. *Am J Surg* 2005;190:75–86. doi:10.1016/j.amjsurg.2004.10.007.
112. Makuuchi M, Mori T, Gunven P, Yamazaki S, Hasegawa H. Safety of hemihepatic vascular occlusion during resection of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1987;164:155–158.
113. Chiappa A, Makuuchi M, Zbar AP, Biella F, Vezzoni A, Pozzi S, Andreoni B. Comparison of continuous versus intermittent hepatic pedicle clamping in an experimental model. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1416–1420.
114. Isozaki H, Adam R, Gigou M, Szekely AM, Shen M, Bismuth H. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Br J Surg* 1992;79:310–313. doi:10.1002/bjs.1800790409.
115. Hewitt G, Halliday I, McCaigue M, Campbell G, Rowlands B, Diamond T. Mortality, endotoxaemia and cytokine expression after intermittent and continuous hepatic ischaemia. *Br J Surg* 1995;82:1424–1426. doi:10.1002/bjs.1800821043.
116. Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002;235:400–407. doi:10.1097/0000658-200203000-00012.
117. Nuzzo G, Giuliante F, Vellone M, De Cosmo G, Ardito F, Murazio M, D'Acapito F, Giovannini I. Pedicle clamping with ischemic preconditioning in liver resection. *Liver Transplant* 2004;10:S53–S57. doi:10.1002/lt.20045.
118. Chouker A, Schachner T, Schauer R, Dugas M, Lohe F, Martignoni A, Pollwein B, Niklas M, Rau HG, Jauch KW, Peter K, Thiel M. Effects of Pringle manoeuvre and ischaemic preconditioning on haemodynamic stability in patients undergoing elective hepatectomy: a randomized trial. *Br J Anaesth* 2004;93:204–211. doi:10.1093/bja/ae1195.
119. Li SQ, Liang LJ, Huang JF, Li Z. Ischemic preconditioning protects liver from hepatectomy under hepatic inflow occlusion for hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:2580–2584.
120. Heizmann O, Loehe F, Volk A, Schauer RJ. Ischemic preconditioning improves postoperative outcome after liver resections: a randomized controlled study. *Eur J Med Res* 2008;13:79–86.
121. Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, Maggi U, Sebah M, Ichai P, Lemoine A, Adam R, Castaing D. Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study. *J Am Coll Surg*. 2006;202:203–211. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2005.10.021.
122. Gurusamy KS, Kumar Y, Sharma D, Davidson BR. Ischaemic preconditioning for liver transplantation. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;CD006315.
123. Cescon M, Grazi GL, Grassi A, Ravaioli M, Vetrone G, Ercolani G, Varotti G, D'Errico A, Ballardini G, Pinna AD. Effect of ischemic preconditioning in whole liver transplantation from deceased donors. A pilot study. *Liver Transplant* 2006;12:628–635. doi:10.1002/lt.20640.
124. Koneru B, Fisher A, He Y, Klein KM, Skurnick J, Wilson DJ, de la Torre AN, Merchant A, Arora R, Samanta AK. Ischemic preconditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial of safety and efficacy. *Liver Transplant* 2005;11:196–202. doi:10.1002/lt.20315.
125. Koneru B, Shareef A, Dikdan G, Desai K, Klein KM, Peng B, Wachsberg RH, de la Torre AN, Debroy M, Fisher A, Wilson DJ, Samanta AK. The ischemic preconditioning paradox in deceased donor liver transplantation—evidence from a prospective randomized single blind clinical trial. *Am J Transplant* 2007;7:2788–2796. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.02009.x.
126. Amador A, Grande L, Marti J, Deulofeu R, Miquel R, Sola A, Rodriguez-Laiz G, Ferrer J, Fondevila C, Charco R, Fuster J, Hotter G, Garcia-Valdecasas JC. Ischemic pre-conditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial. *Am J Transplant*. 2007;7:2180–2189. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01914.x.
127. Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP, Hertl M. Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver

- transplantation. *Hepatology* 1994;20:829–838. doi:10.1002/hep.1840200410.
128. Fernandez L, Carrasco-Chaumel E, Serafin A, Xaus C, Grande L, Rimola A, Rosello-Catafau J, Peralta C. Is ischemic preconditioning a useful strategy in steatotic liver transplantation? *Am J Transplant* 2004;4:888–899. doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00447.x.
129. Koti RS, Yang W, Glantzounis G, Quaglia A, Davidson BR, Seifalian AM. Effect of ischaemic preconditioning on hepatic oxygenation, microcirculation and function in a rat model of moderate hepatic steatosis. *Clin Sci (Lond)* 2005;108:55–63. doi:10.1042/CS20040130.
130. Massip-Salcedo M, Zaouali MA, Padrisa-Altes S, Casillas-Ramirez A, Rodes J, Rosello-Catafau J, Peralta C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha inhibits the injurious effects of adiponectin in rat steatotic liver undergoing ischemia-reperfusion. *Hepatology* 2008;47:461–472. doi:10.1002/hep.21935.

# Liver transplantation: Some advances in liver cancer, live liver donation, and cell transplantation: A literature review

Montalvo-Jave EE,<sup>1,2,3</sup> Villegas-Alvarez F,<sup>1</sup> Montalvo-Arenas CE,<sup>4</sup> Peña-Sánchez J,<sup>5</sup> Gutiérrez-Vega R,<sup>1,3</sup> Piña E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Cirugía

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica

<sup>4</sup> Departamento de Biología Celular y Tisular

Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

<sup>3</sup> Servicio de Cirugía General y Trasplantes, Hospital General de México, México, DF.

Transplantation Biology Program, Department of Surgery, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA.

<sup>5</sup> Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

**Correspondence author:** Eduardo E. Montalvo-Javé, MD, FACS. Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM; Av. Universidad 3000, Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510, México, D. F. *E-mail:* montalvoeduardo@hotmail.com

## Abstract

**Background:** Organ transplantation represents one of the medical fields with the largest impact and advances. Liver transplantation constitutes a constant challenge in finding viable options to maintain or recover an adequate function when faced with end-stage liver failure. Critical review of the literature was conducted in specific topics on liver transplantation and development in Mexico. We focused our review on medical and surgical topics such as liver procurement from a related living donor, liver transplantation options for patients with liver cancer, especially hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma, as well as on cellular and molecular biology aspects, such as xenotransplantation and hepatocyte transplantation.

**Aim:** The objective of this review is a critical review of the literature was conducted in specific topics on liver transplantation such as hepatic transplant with related living donor organ, cholangiocarcinoma, hepatocellular carcinoma, xenotransplantation and hepatic cell transplantation and development in Mexico.

**Material and methods:** We performed a computer-assisted search in PubMed and Artemisa with the key words "liver transplantation" AND "cancer", "cholangiocarcinoma", "hepatocellular carcinoma",

## Resumen

*Uno de los campos de la medicina que ha tenido mayor desarrollo e impacto ha sido el de trasplante de órganos; por su parte, el trasplante de hígado representa un desafío constante para mantener viable o recuperar las funciones en los pacientes con falla hepática terminal. En el presente trabajo, los autores realizan una revisión bibliográfica crítica en áreas específicas del trasplante hepático, con una breve introducción general y su desarrollo en México enfocada a los avances en donador vivo relacionado, al trasplante de hígado en los pacientes con cáncer hepático, en especial colangiocarcinoma y carcinoma hepatocelular, así como a los aspectos generales del xenotrasplante y el trasplante celular de hepatocitos.*

**Palabras clave:** *trasplante hepático, colangiocarcinoma, carcinoma hepatocelular, trasplante celular, México.*



“cell transplantation”, “xenotransplantation”, “living donor liver transplantation”, “Mexico” since 1950 to date. We selected studies that include large cohort of patients and that have shown some practical utility. Review articles and web pages were also included. We excluded abstracts, personal communications and articles published in any other language different to English and Spanish.

**Results:** Scarcely 60 years ago, in 1954, Dr. Joseph Murray successfully performed the first renal transplantation in two identical twins in Boston, MA, USA. This event was the hallmark for extraordinary advances in the realm of organ transplants.<sup>1</sup> This scientific event offered

new hope to patients with kidney failure; at that time, some of the large hurdles comprised histocompatibility, technical surgical and anesthesia aspects, availability of organs, rejection by the recipient, and an acceptable immunosuppression regimen. This outstanding surgeon and scientist received the Nobel Prize in Physiology or Medicine in 1999 in recognition for his work and initiative that have permitted organ, tissue, and cell transplants to become a reality in our days.<sup>2</sup>

**Key words:** liver transplantation, cholangiocarcinoma, hepatocellular carcinoma, cell transplantation, Mexico.

## Introduction

It was in 1963, in the city of Denver, CO, USA, that Dr. Thomas E. Starzl performed the first worldwide liver transplantation (LT),<sup>3</sup> and, in 1967, he performed the first transplant with a survival of >1 year.<sup>4</sup> Time has elapsed and, after nearly four decades, the evolution and advances in the transplantation field have allowed considering LT, in its diverse modalities, as the therapeutic option-of-choice for end-stage liver disease.<sup>5</sup> Regarding liver function failures, these have led to the search new alternatives for organ viability and donor availability, because the waiting list in all countries with well-established transplantation programs has been increasing, surpassing the demands of the population.<sup>6</sup> Other aspects to take into account include the following: the study of mechanisms to improve liver preservation;<sup>7</sup> decreasing the effects of the ischemia-reperfusion injury;<sup>8,9</sup> liver preconditioning,<sup>10</sup> new and better drug schemes to decrease acute or chronic rejection; management of postoperative complications, and a fundamental point deals with the health education of the population, as well as the establishment of specialized centers and a defined legal setting.<sup>6</sup>

A clear example of the afore mentioned is the immunosuppression scheme, which has permitted to make a difference in medical treatment. During the 1980s, inclusion of cyclosporine in clinical

protocols allowed for remarkable advances in the multidisciplinary management of transplanted patients; the drug was initially used in patients with renal transplants and then in liver transplantation.<sup>11</sup> There is no doubt that this drug favorably modified the treatment of transplanted patients, constituting a remarkable advance in the treatment of patients with end-stage hepatic disease.<sup>5</sup>

Another important topic in LT is the model for end-stage liver disease (MELD) score. MELD is a numerical scale that ranged from 6 (less ill) to 40 (gravely ill) that is employed for liver transplant candidates aged 12 years and older. MELD provides each person with a “score” (number) that is based on how urgently he/she requires a liver transplant within the next 3 months.<sup>12,13</sup> The MELD score number is calculated by a formula that utilizes the results of three routine laboratory tests: bilirubin, which measures how effectively the liver excretes bile; INR (prothrombin time), which measures the liver’s ability to manufacture blood clotting factors, and creatinine, which measures kidney function. (Impaired kidney function is often associated with severe liver disease.) The MELD is used for candidates aged 12 and older, while the PELD (Pediatric end-stage liver disease model) is used for patients aged 11 years and younger.<sup>14</sup> A patient’s score may rise or fall over time depending on the status of his/her liver disease. The

majority of candidates will have their MELD score assessed a number of times while they remain on the transplantation waiting list. This will aid in ensuring that donated livers are received by the patients in greatest need at that moment. The only priority exception to MELD is a category known as Status 1. Status 1 patients have acute (sudden and severe onset) liver failure and a life expectancy of hours to a few days without a transplant. Fewer than 1% of liver-transplant candidates are in this category. All other liver candidates aged 12 years and older are prioritized by the MELD system.<sup>13,15</sup>

In Mexico, the transplantation program was initiated at the beginning of the 1980s;<sup>16</sup> the first successful LT case was reported in 1991.<sup>17</sup> The number of organ transplant centers, especially kidney transplantation, are increasing in Mexico,<sup>18</sup> and with regard to LT programs, these have achieved notable advances in diverse hospitals.<sup>19-21</sup> Hence, in Mexico it is necessary to strive for a better medical infrastructure, improvement of organ viability, training of specialized personnel, and adjustments in the high costs involved in transplant programs.<sup>21,22</sup>

The multidisciplinary work in transplant medicine and surgery has offered a better insight of this field of knowledge. The present review is aimed at providing the interested reader with a clear and concise panorama of the relevant advances in LT, covering diverse topics, such as surgical aspects that deal with the procurement of segment(s) of the organ from a living related donor, indications for patients with hepatic cancer (hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma), up to the expectations in cellular transplantation of hepatocytes and temporal artificial support for patients with end-stage liver failure, implying a close relationship with molecular, genomic, and proteomic biology.

Other aspects that continue to be of potential clinical interest, but which remain in the primary experimental stage, are xenotransplantations;<sup>23</sup> the concept of this type of transplantation, using, for example, the pig as a donor species, may provide a potential solution to the lack of human organs available for transplantation. Initial clinical experiences have been gained, but have not yet been established as a long-term viable element, mainly because of immunological limitations that could be overcome through potential modifications in the genetics of donor animals.<sup>24</sup> The most studied

animal is the pig, due to its similarity in terms of its hepatic morphology to that of humans; this option for obtaining organs for transplantation is at present the subject of extensive studies. Xenotransplantation employing pig organs could solve the significant increasing shortage of donor organs for allotransplantation.<sup>24-26</sup> Survival of pig-organ xenografts in primates is initially limited by humoral rejection, which can be either hyperacute (defined as occurring within 24 h) or delayed for days or even weeks (variously termed acute humoral xenograft rejection, acute vascular rejection, or delayed xenograft rejection).<sup>25</sup> Pre-formed and/or elicited cytotoxic antibodies against Gala1,3Gal (Gal) epitopes in the pig vascular endothelium are major causative components of the primate anti-pig immune response, and for many years proved to be a major barrier for achieving the prolonged survival of pig grafts in non-human primates.<sup>26</sup>

### **Hepatic transplant with related living donor organ (HTRLD)**

Potential donations and viable organs have been and will continue to be one of the greatest limitations in the transplantation of whole or partial livers. Other factors comprise the ideological tendencies of certain regions of the world, such as, for example, those of Japan and other Eastern countries, where transplant from a cadaver donor has not been feasible until now. Thus, new alternatives are sought for these patients awaiting a hepatic transplant.<sup>27</sup> A good surgical option is provided by living related donors, as in renal transplantation; but in this case, we have only one organ capable of regenerating. Therefore, procuring a hepatic segment for the recipient and leaving the remnant liver in the donor in adequate proportions to allow both individuals to survive and lead healthy active lives are essential aspects.

In the U.S., the clinical stage of HTRLD began at the end of the 1990s. Currently, ca. 5-7% of transplants carried out in adults correspond to this modality.<sup>28</sup> Complications frequently associated with HTRLD include size of the donated organ,<sup>29</sup> use of this type of transplant for patients with hepatocellular cancer,<sup>30</sup> viral neo- and re-infection with hepatitis C with long-term follow-up,<sup>31</sup> need for immunosuppression, histocompatibility problems, and even the death of either the donor or the recipient; thus, their use in transplant centers was limited in its beginnings.<sup>27</sup> However, recently,



successful case series have been published by both Eastern and Western research teams. In Canada, a study with 101 cases reported 0% mortality in patients subjected to right lobe hepatectomy, with a 4-year follow-up and good clinical evolution.<sup>32</sup> In a multicenter study performed by nine specialized centers, HTRLD was performed in 385 patients, who presented 87% of organ survival at 90 days and 81% at 1 year, respectively. In this study, it was observed that geriatric donors and a prolonged cold-ischemia time were the most frequent adverse prognostic factors.<sup>33</sup>

In pediatric population, this HTRLD modality and reduced-size hepatic transplantation (RSHT) exert a great impact because mortality among patients awaiting transplantation is higher than in adults; these data increase each year, and it must be considered that approximately 7–10% of HT are performed in children.<sup>34,35</sup> With this surgical technique, in general, two liver lobes are obtained: one for a child, and the second for an adult. The technique requires careful and expert dissection based on good surgical training; time of ischemia is longer than with conventional HT, and viable donors are also a limiting factor for this group of patients. HTRLD and RSHT are options that have spurred an increase in transplanted patients in both adult and pediatric populations.<sup>36</sup> In Mexico, the team from the Federico Gómez Hospital Infantil de México published a series of 35 HT patients, including the first case of HTRLD in a child, with 77.1% survival in the first year and 74.2% at 5 years.<sup>20</sup>

### Liver transplant and cancer

HT has been indicated in cases of malignant liver neoplasm since its beginning; in the U.S.; ca. 400 patients are treated yearly with this pathology, and LT is a first-choice line of treatment.<sup>30</sup> In hepatic cancer, we must differentiate the pathology according to which cellular groups of the liver are primarily affected, for example, hepatocytes (hepatocellular cancer)<sup>37</sup> and cells of the bile ducts (cholangiocarcinoma); the latter has had a greater increase in number of patients subjected to LT,<sup>38</sup> but LT is not recommended in all cases. In patient selection for LT with hepatocellular cancer, it is considered either a <5-cm tumor, or no more than three lesions <3 cm, without vascular invasion.<sup>37</sup>

When adjusting inclusion criteria for LT in patients with a diagnosis of hepatocellular cancer, survival has been similar to organ viability in

transplanted patients with non-malignant pathologies.<sup>39</sup> Currently according to these guidelines (Milan Criteria and later adjustments), in patients with tumor size  $\leq 5$  cm or 2–3 lesions  $\leq 3$  cm, not  $>3$  cm in circumference, without vascular invasion, and subjected to LT, results have been more encouraging than at its beginnings.<sup>40</sup> One research team has proposed increasing the dimensions in the criteria, allowing up to 6.5 cm as maximal tumor size, or three tumors not  $>4.5$  cm, obtaining similar good results to those achieved with the previously mentioned criteria.<sup>41</sup> Liver transplantation (LT) is the treatment-of-choice for many patients with unresectable hepatocellular carcinoma (HCC), but the long waiting time due to the shortage of donor organs can result in tumor progression and drop-out from LT candidacy. Furthermore, even in candidates who meet the restrictive Milan criteria, there is risk of HCC recurrence; this risk rises significantly when patients with more advanced HCC are included. Chemoembolization, radiofrequency ablation, and ethanol injection all have well-documented antitumor activity; however, there is no high-level evidence that waiting-list HCC treatment with these modalities is effective in achieving any of the three above mentioned aims. Nevertheless, particularly in the U.S. where continued waiting-list priority depends on maintaining HCC within Milan criteria, use of non-surgical HCC treatment will likely continue in an effort to forestall tumor progression and waiting-list drop-out.<sup>42</sup>

In selected patients with HCC, LT is indicated for small, early-stage hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with cirrhosis and requires, in the majority of cases, a long waiting period. Tumor development during the waiting period may be associated with vascular invasion, which is a strong factor for post-operative recurrence. Therefore, local treatment of the tumor including transarterial chemoembolization (TACE), percutaneous radiofrequency (RF), or partial liver resection can be used prior to transplantation.<sup>43</sup>

A study from the University of Toronto in Canada showed the critical analysis in 347 patients in the controversial issue of waiting time prior to LT. Reported survival after liver transplantation (OLT) for early hepatocellular carcinoma (HCC) is superior to the results of liver resection (LR), but few analyses have considered long waiting times and patient drop-outs due to tumor progression. This



group concluded in their report that unless waiting time is short (<4 months), survival of patients with early HCC is similar between LR and LT.<sup>44</sup>

However, in cases of cholangiocarcinoma in advanced stages, prognosis remains poor as compared with that for hepatocellular carcinoma.<sup>45</sup> Patients with combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma had poor post-operative survival rates.<sup>46</sup>

In order to understand the anatomical localization of this type of tumor on the biliary tree, the Bismuth-Corlette classification of hilar cholangiocarcinoma is described as follows:

- Type I involves the common hepatic duct, distal to the bifurcation of the biliary tree.
- Type II affects bifurcation.
- Type IIIa affects the right hepatic duct, in addition to the bifurcation.
- Type IIIb affects the left hepatic duct, in addition to the bifurcation.
- Type IV involves the bifurcation and both right and left hepatic ducts, or indicates multifocal cholangiocarcinoma.<sup>47</sup>

Cholangiocellular carcinoma is a biliary malignancy that frequently presents in advanced unresectable stages. Liver transplantation for cholangiocarcinoma is unclear; because of a high recurrence rate and poor patient survival, the disease has been viewed as an absolute contra-indication to transplantation. Based on good results using neoadjuvant and palliative radiation, a protocol for liver transplantation in selected patients with unresectable hilar cholangiocarcinoma at the Mayo Clinic, neoadjuvant radiation is followed by operative staging to rule out patients with lymph node metastases prior to liver transplantation. This approach has achieved results superior to those of standard surgical therapy, with a 72% 5-year survival for patients with unresectable disease.<sup>48</sup> With data from the University of Nebraska on 17 patients, this study evaluates the effect of neoadjuvant chemoradiation therapy combined with orthotopic liver transplantation in a carefully selected group of patients with hilar cholangiocarcinoma.<sup>49</sup>

The neoadjuvant protocol included 6 000 cgy biliary brachytherapy delivered through percutaneous transhepatic catheters and intravenous infusion of 5-fluorouracil (300 mg/m<sup>2</sup>/day) until transplantation. Five of the 17 patients demonstrated tumor progression precluding transplantation.

Eleven patients underwent liver transplantation, a median of 3.4 months (range = 1–26 months) after diagnosis. Five of the 11 (45%) patients are alive without evidence of tumor recurrence, with a median follow-up of 7.5 years (range = 2.8–14.5 years). Six deaths occurred in the transplanted patients. Tumor recurrence was responsible for two deaths at 10 and 18 months, respectively, after transplantation. Hence, cholangiocarcinoma should not be considered an absolute exclusion criterion for orthotopic liver transplantation. Long-term, tumor-free survival was achieved in 45% of the transplanted patients. Complications of biliary catheter placement for brachytherapy were associated with poor outcome.<sup>49</sup>

In other results from the University of Dokkyo in Japan, 25 patients were identified: nine patients with extrahepatic cholangiocarcinoma (five patients, Klatskin-type; two patients, the middle third, and two patients, the distal third) and 16 patients with intra-hepatic cholangiocarcinoma.<sup>50</sup> Tumor stage was local (stages I and II; *n* = 9) or advanced (stages III and IV; *n* = 16). Overall and disease-free survival rates were 71 and 67% at 1 year and 35 and 32% at 3 years, respectively. Analysis of variables showed statistically significant improved outcomes (*p* < 0.05) for absence of contiguous organ invasion at LT, small tumor size, and single tumor foci. This study indicates that early survival after LT for cholangiocarcinoma is acceptable. Three-year disease-free survival is achieved in approximately 30% of patients. These outcomes can be improved by applying strict selection criteria based on the prognostic variables identified in this study.<sup>50</sup>

In patients with stage I or II cholangiocarcinoma without hilar-positive ganglia, a prospective comparison was conducted of results between patients subjected to HT and neoadjuvant therapy (NT) and patients subjected to conventional resection, revealing that HT plus NT is the best option for this group of patients.<sup>38</sup>

In other types of less aggressive neoplasias, such as epithelioid hemangioendothelioma and hepatoblastoma, LT yields even better results when patients are treated in early disease stages.<sup>30</sup>

### Cellular hepatocytes transplant (CHT)

Studies have been performed in humans and in other species, including autologous and xenotransplants with increasingly encouraging results,



achieving advances in mean life and functionality of hepatocytes.<sup>51,52</sup>

Within CHT, one modality consists of hepatocytes injection through portal route or at ectopic sites, such as splenic pulp; in experimental animals, it has been found that hepatic function values tend toward normality for a given time, depending on the model employed.<sup>51-53</sup> The small number of studied patients and the short viability of hepatocytes have been one of the causes limiting the viability of livers available for LT, because of their high fat content; thus, livers with these tislular characteristics are not yet recommended to be used for CHT.<sup>54</sup> With these characteristics, the potential group of donors is reduced, considering that fatty liver is a pathology frequently associated with and diagnosed in individuals with Western diets having high carbohydrate and fat contents. This clinical entity has raised the interest of Gastroenterologists, Hepatologists, and Internists, as well as its relationship with obesity, dyslipidemia, or metabolic syndrome.<sup>55</sup>

Regarding hepatic cells, these can derive from the same individual based on stem cell technology, from other individuals, or from xenografts.<sup>56</sup> Another viable option is stem cells proceeding from bone marrow-derived mesenchymal cells, thereby providing a novel option for treatment of hepatic diseases.<sup>57</sup>

However, the largest numbers of studies performed in this area have focused on xenotransplantation, arising from the cooperation between basic and clinical research, both indispensable for progress in LT. This type of transplant has been studied as a viable option in humans; organ procurement has been researched in several species, among which pigs and primates are the main species considered, although some initial experiments have been carried out in rodents. The limiting factor in using the whole organ for transplantation or hepatic cells for implantation comprises the transmission of pathogens, particularly viruses.<sup>58,59</sup> Therefore, gene therapy prior to cellular transplant becomes an attractive field for modifying this immunological and genetic potential.<sup>60</sup> Another research line entertaining great potential is the study of knockout (KO) or Gal KO (alpha1,3-galactosyltransferase knockout) animals. Encouraging data and survival times have been published with this technique in heart transplantation.<sup>61</sup> However, an acute rejection effect due to antibodies to the

kidney antibodies when using Gal-KO animals has been published,<sup>62</sup> giving rise to controversy in the utilization of this type of animal as potential sources of organs for transplantation.

Genetic and immunological manipulation is feasible for the use of hepatic cells, which can be stored under cryopreservation in a cell bank or stocked for their later use. However, controversy remains regarding definite authorization for scientific and non-restricted handling of stem cells for specific pathologies; as in all areas, clinical hepatology and transplants are no exceptions.

Artificial support in patients with fulminant or end-stage liver failure and candidates for LT consists of diverse initial procedures to purify the blood, such as hemofiltration and plasmapheresis, as well as bio-artificial liver support. The latter constitutes an option when no organ is available immediately; its use is aimed at improving hepatic function, as well as ammonia levels in these patients while they await an organ.<sup>63,64</sup>

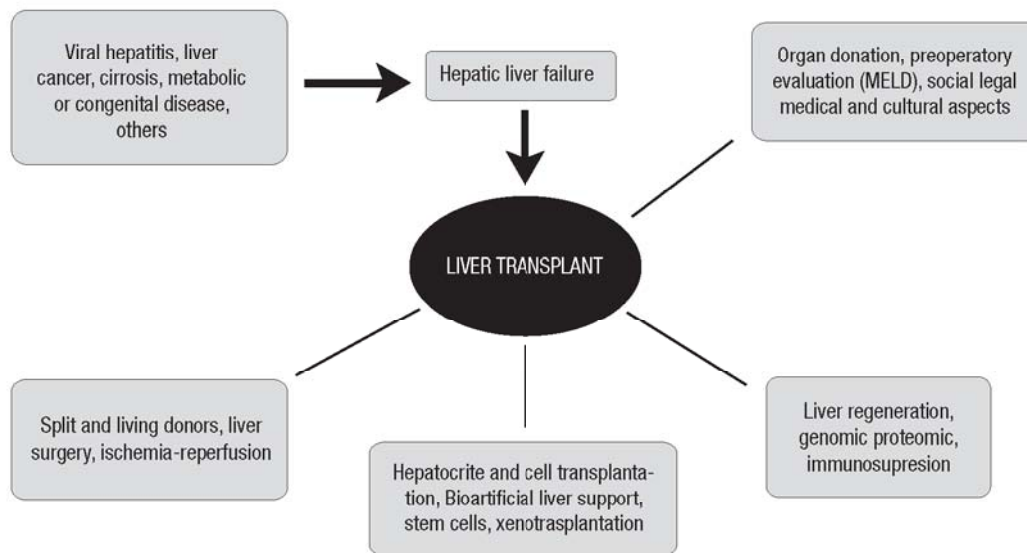
At the clinical level, this external hepatic support has been based on the use of pig hepatocytes. In a multicenter comparative study in 171 patients, its relative efficacy was demonstrated in patients with fulminant liver failure.<sup>65</sup>

Given the initial promising results, several research teams are currently studying the feasibility of its clinical use.

## Conclusion

The range of factors involved in liver transplantation is very broad; we must take into account the etiology of hepatic disease, its treatment or maintenance options prior to surgery, type of surgical procedure, including cellular transplant of hepatocytes, and post-operative follow-up. We consider follow-up and survival at the short, medium, and long term as fundamental issues due to the potential risk for acute and/or chronic rejection and therefore, the need for an appropriate immunosuppressant therapy, among other measures. Long-term survival of kidney-transplanted patients without immunotherapy and of bone marrow-transplanted patients has been published recently.<sup>66</sup> Thus, it is possible that we might soon observe the use of this modified therapy in LT. We have attempted to include the main factors associated with LT in **Figure 1**, to express our viewpoint regarding a disease that affects the worldwide population, with Mexico not devoid of this reality.

Figure 1.



## References

- Murray JE. The first successful organ transplants in man. *J Am Coll Surg* 2005;200:5-9.
- Harrison JH, Merrill JP, Murray JE. Renal homotransplantation in identical twins. *Surg Forum* 1956;6:432-6.
- Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet* 1963;117:659-76.
- Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, et al. Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg* 1968;168:392-415.
- Starzl TE. The mystique of organ transplantation. *J Am Coll Surg* 2005;201:160-70.
- Delmonico FL, Sheehy E, Marks WH, Baliga P, McGowan JJ, Magee JC. Organ donation and utilization in the United States, 2004. *Am J Transplant* 2005; 5:862-73.
- Clavien PA, Emond J, Vauthey JN, Belghiti J, Chari RS, Strasberg SM. Protection of the liver during hepatic surgery. *J Gastrointest Surg* 2004;8:313-27.
- Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003;125:917-36.
- Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Pina E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008;147:153-9.
- Montalvo-Jave EE, Pina E, Montalvo-Arenas C, Urrutia R, Benavente-Chenhalls L, Pena-Sanchez J, Geller DA. Role of ischemic preconditioning in liver surgery and hepatic transplantation. *J Gastrointest Surg* 2009 (in press).
- Furukawa H, Todo S. Evolution of immunosuppression in liver transplantation: contribution of cyclosporine. *Transplant Proc* 2004;36(suppl 2):274S-284S.
- Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 2003;124:91-6.
- United Network for Organ Sharing [página en internet]. United Network for Organ Sharing; c2009 [actualizado el 26 de mayo de 2009; citado el 26 de mayo de 2009]. Disponible en: [www.unos.org](http://www.unos.org).
- Freeman RB Jr, Wiesner RH, Roberts JP, McDiarmid S, Dykstra DM, Merion RM. Improving liver allocation: MELD and PELD. *Am J Transplant* 2004;4(suppl 9):114-31.
- Cholongitas E, Marelli L, Shusang V, Senzolo M, Rolles K, Patch D, Burroughs AK. A systematic review of the performance of the model for end-stage liver disease (MELD) in the setting of liver transplantation. *Liver Transpl* 2006;12:1049-61.
- Juárez de la Cruz FJ. Trasplante hepático. *Cirujano General* 1998;20:192-197.
- Diliz H, Orozco H, Kershenobich D, Rodríguez LC, Casillas MA, Hurtado R, Castorena G, Contreras A, Chávez-Peón F. Trasplante hepático en México. Reporte del primer caso exitoso en México. *Rev Gastroenterol Mex* 1991;56:33-8.
- Diliz Perez H, Bordes Aznar J, Varela Fascinetto G, Lerma Alvarado R, De Leo C, Sanchez-Melgarejo S, Kuri AD. Interinstitutional program of cadaveric organ transplantation in Mexico. *Transplant Proc* 1991;23:1797-8.
- Mendoza-Sánchez F, Haro-Haro FJ, Sandoval-Alvarado J, Zepeda-González A, Herrera-Rodríguez R, Bassols-Ricárdez A. Trasplante hepático ortotópico. Resultados en un centro de trasplantes. *Cir Cir* 2007;75:281-5.
- Varela-Fascinetto G, Davila-Perez R, Nieto-Zermeno J, et al. Experience of a successful pediatric liver transplant program in Mexico. *Transplant Proc* 2005;37:1201-2.
- Munoz-Espinosa LE, Cordero-Perez P, Escobedo-Villarreal MM. Development of a liver unit in Latin America. *Ann Hepatol* 2002;1:80-4.
- Centro Nacional de Trasplantes [página en internet]. Secretaría de Salud; c 2009 [actualizado el 7 de enero de 2009; citado el 26 de mayo de 2009]. Disponible en: [www.cenatra.salud.gob.mx](http://www.cenatra.salud.gob.mx).
- Toledo-Pereyra LH, Lopez-Nebolina F. Xenotransplantation: a view to the past and an unrealized promise to the future. *Exp Clin Transplant* 2003;1:1-7.
- Le Bas-Bernardet S, Anegón I, Blanco G. Progress and prospects: genetic engineering in xenotransplantation. *Gene Ther* 2008;15:1247-56.
- Petrowsky H, Busuttill RW. Evolving surgical approaches in liver transplantation. *Semin Liver Dis* 2009;29:121-33.
- Tai HC, Ezzelarab M, Hara H, Ayares D, Cooper DK. Progress in xenotransplantation following the introduction of gene-knockout technology. *Transpl Int* 2007;20:107-17.
- Shimada M, Fujii M, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Ishibashi H. Living-donor liver transplantation: present status and future perspective. *J Med Invest* 2005;52:22-32.
- Russo MW, Brown RS, Jr. Adult living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2004;4:458-65.
- Fruhauf NR, Malago M, Frilling A, Beckebaum S, Broelsch CE. Latest development in split liver transplantation. *Surg Technol Int* 2004;13:183-9.
- Nissen NN, Cavazzoni E, Tran TT, Poordad FP. Emerging role of transplantation for primary liver cancers. *Cancer J* 2004;10:88-96.
- Brown RS. Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* 2005;436:973-8.
- Shah SA, Grant DR, Greig PD, et al. Analysis and outcomes of right lobe hepatectomy in 101 consecutive living donors. *Am J Transplant* 2005;5:2764-9.
- Olthoff KM, Merion RM, Ghobrial RM, et al. Outcomes of 385 adult-to-adult living donor liver transplant recipients: a report from the A2ALL Consortium. *Ann Surg* 2005;242:314-23.
- Magee JC, Bucuvalas JC, Farmer DG, Harmon WE, Hulbert-Shearon TE, Mendeloff EN. Pediatric transplantation. *Am J Transplant* 2004;4(Suppl 9):54-71.
- Hendrickson RJ, Karrer FM, Wachs ME, Slater K, Bak TE, Kam I. Pediatric liver transplantation. *Curr Opin Pediatr* 2004;16:309-13.
- Kim JS, Broering DC, Tustas RY, et al. Split liver transplantation: past, present and future. *Pediatr Transplant* 2004;8:644-8.
- Schwartz M. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:S268-S276.
- Rea DJ, Heimbach JK, Rosen CB, et al. Liver transplantation with neoadjuvant chemoradiation is more effective than resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 2005;242:451-8.
- Sotiropoulos GC, Molmenti EP, Losch C, Beckebaum S, Broelsch CE, Lang H. Meta-analysis of tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma based on 1,198 cases. *Eur J Med Res* 2007;12:527-34.
- Koller FL, Geevarghese SK, Gorden DL. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: current role and future opportunities. *Curr Pharm Des* 2007;13:3265-73.



41. Duffy JP, Vardanian A, Benjamin E, et al. Liver transplantation criteria for hepatocellular carcinoma should be expanded: a 22-year experience with 467 patients at UCLA. *Ann Surg* 2007;246:502-9.
42. Schwartz M, Roayaie S, Uva P. Treatment of HCC in patients awaiting liver transplantation. *Am J Transplant* 2007;7:1875-81.
43. Belghiti J, Carr BI, Greig PD, Lencioni R, Poon RT. Treatment before liver transplantation for HCC. *Ann Surg Oncol* 2008;15:993-1000.
44. Shah SA, Cleary SP, Tan JC, et al. An analysis of resection vs transplantation for early hepatocellular carcinoma: defining the optimal therapy at a single institution. *Ann Surg Oncol* 2007;14:2608-14.
45. Gores GJ, Nagorney DM, Rosen CB. Cholangiocarcinoma: is transplantation an option? For whom? *J Hepatol* 2007;47:455-9.
46. Kim KH, Lee SG, Park EH, et al. Surgical treatments and prognoses of patients with combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2009;16:623-9.
47. Ustundag Y, Bayraktar Y. Cholangiocarcinoma: a compact review of the literature. *World J Gastroenterol* 2008;14:6458-66.
48. Rea DJ, Rosen CB, Nagorney DM, Heimbach JK, Gores GJ. Transplantation for cholangiocarcinoma: when and for whom? *Surg Oncol Clin North Am* 2009;18:325-37.
49. Sudan D, DeRoover A, Chinnakotla S, et al. Radiochemotherapy and transplantation allow long-term survival for nonresectable hilar cholangiocarcinoma. *Am J Transplant* 2002;2:774-9.
50. Shimoda M, Farmer DG, Colquhoun SD, et al. Liver transplantation for cholangiocellular carcinoma: analysis of a single-center experience and review of the literature. *Liver Transpl* 2001;7:1023-33.
51. Horslen SP, Fox IJ. Hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2004;77:1481-6.
52. Nagata H, Nishitai R, Shirota C, et al. Prolonged survival of porcine hepatocytes in cynomolgus monkeys. *Gastroenterology* 2007;132:321-9.
53. Nishitai R, Koch CA, Ogata K, Knudsen BE, Plummer TB, Butters KA, Platt JL. Toward the survival and function of xenogeneic hepatocyte grafts. *Liver Transpl* 2005;11:39-50.
54. Baccarani U, Sanna A, Cariani A, et al. Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience. *Liver Transpl* 2003;9:506-12.
55. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation. *Liver Transpl* 2006;12:523-34.
56. Masson S, Harrison DJ, Plevis JN, Newsome PN. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: a critical review. *Stem Cells* 2004;22:897-907.
57. Aurich I, Mueller LP, Aurich H, et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007;56:405-15.
58. Schuurman HJ, Pierson RN, 3rd. Progress towards clinical xenotransplantation. *Front Biosci* 2008;13:204-20.
59. Weiss MJ, Ng CY, Madsen JC. Tolerance, xenotransplantation: future therapies. *Surg Clin North Am* 2006;86:1277-96.
60. Nguyen TH, Ferry N. Liver gene therapy: advances and hurdles. *Gene Ther* 2004;11(suppl 1):S76-S84.
61. Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, et al. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med* 2005;11:29-31.
62. Chen G, Qian H, Starzl T, et al. Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat Med* 2005;11:1295-8.
63. Naruse K, Tang W, Makuuch M. Artificial and bioartificial liver support: a review of perfusion treatment for hepatic failure patients. *World J Gastroenterol* 2007;13:1516-21.
64. Selden C, Hodgson H. Cellular therapies for liver replacement. *Transpl Immunol* 2004;12:273-88.
65. Demetriou AA, Brown RS, Jr, Busuttil RW, et al. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg* 2004;239:660-7.
66. Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, et al. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 2008;358:353-61.

# Abdomen agudo. Avances en su manejo y abordaje

Dr. Eduardo E. Montalvo Javé,<sup>\*</sup> <sup>\*\*</sup> Dr. Heriberto Rodea Rosas,<sup>\*</sup> Dr. César Athié Gutiérrez,<sup>\*</sup>  
Dr. Arturo Zavala Habib<sup>\*\*\*</sup>

**Palabras clave:** Abdomen agudo, trauma, cirugía endoscópica, NOTES, dolor abdominal, urgencia.

**Key words:** Abdomen acute, trauma, endoscope surgery, NOTES, abdominal pain, emergency.

## Resumen

El manejo del paciente con abdomen agudo es sin duda por su frecuencia de presentación en todo servicio de urgencias médico-quirúrgicas o centro especializado de trauma, una entidad en que debemos mantenernos actualizados en sus diversas modalidades diagnósticas, padecimientos y opciones en su tratamiento. En el presente estudio se hace una revisión concreta de las modalidades de semiología, algoritmo general de tratamiento y manejo y se hace referencia a las opciones quirúrgicas de mínima invasión como la cirugía endoscópica o de mínima invasión y NOTES por su acrónimo en inglés (Natural orifice transluminal endoscopic surgery), en pacientes con patología abdominal que requieren tratamiento de urgencia en sus modalidades asociadas al trauma y las que tienen un origen médico-quirúrgico no traumático.

## Abstract

The Management of the patient with acute abdomen is no doubt by his frequency of presentation in all service of medical urgencies o trauma center. An entity in witch we have to be obliged at know his diverse diagnostic methods, pathologies and therapeutic options. In this study does at concrete revision of semiology, treatment algorithm, we do reference at surgical options of invasion minimal and

\* Servicio de Cirugía General. Hospital General de México.

\*\* Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. (UNAM).

\*\*\* Hospital ABC. México D.F.

Dirección para correspondencia:  
Dr. Eduardo E. Montalvo Javé. FACS.  
Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. UNAM  
Circuito Universitario 3000. Delegación Coyoacán. México D.F. México.  
E-mail: montalvoeduardo@hotmail.com

NOTES (Natural orifice transluminal endoscopic surgery), in patients with abdominal pathology that requires emergency treatment in traumatic or not traumatic pathology.

## Introducción

El concepto de abdomen agudo o dolor agudo abdominal, ha sido desde su integración un reto para el médico, por lo que la correcta y oportuna evaluación e historia clínica continúan siendo primordiales en el diagnóstico y tratamiento. El abdomen agudo comprende el origen traumatológico y padecimientos no relacionados al trauma; como causa u origen del cuadro clínico.<sup>1,2</sup>

Abdomen agudo se define como un síndrome caracterizado por dolor abdominal de instalación aguda, con duración en casos mayor a 6 horas, progresivo y potencialmente mortal; que ocasiona alteraciones locales y sistémicas que dependen de la etiología y su etapa evolutiva, por lo tanto requieren de un diagnóstico y tratamiento oportunos y resolutivos en forma inmediata.

El abdomen agudo es una de las principales causas de atención en los servicios de urgencias tanto traumatológicas como no traumatológicas, en donde el dolor abdominal es el síntoma principal del que parten una serie de procedimientos diagnósticos para llegar a definir en principio, si el cuadro clínico corresponde a un evento quirúrgico de urgencia. Descartando tanto los procesos específicos o sistémicos que simulan un abdomen agudo como las patologías que aunque son intraabdominales no son en principio quirúrgicas como puede ser la pancreatitis aguda, hepatitis aguda, enfermedad pélvica inflamatoria, etc. Todo paciente de acuerdo a la gravedad del padecimiento, y en base a su estado hemodinámico será candidato o no a cirugía, en relación a la enfermedad de base, un ejemplo frecuente es lo acontecido en todo servicio de urgencias médico-quirúrgicas como cuando se debe determinar si en cierto caso existe patología intraabdominal y extraabdominal. En ocasiones cuadros médicos semejan un cuadro de abdomen agudo como son entidades pleura-pulmonares, diabetes mellitus descompensada, alteraciones hidroelectrolíticas, intoxicaciones, etc.<sup>1,2</sup>

Esta tendencia cambia notoriamente en un centro de trauma, lugar donde la estabilización del paciente, manejo prehospitalario y medidas de reanimación en su traslado a un nivel hospitalario, nos proporcionarán una perspectiva sobre los mecanismos de trauma y factores asociados.

Es objetivo del presente estudio el evaluar de manera concreta los métodos de diagnóstico en casos de abdomen agudo, el impacto de la cirugía endoscópica, y se hace énfasis en la población general especialmente cuando no tenemos un evento traumatológico asociado, pero en ambos casos representan una urgencia médica.

## Métodos de diagnóstico

Varios han sido los progresos de la medicina en las últimas décadas, que han proporcionado un avance en el diagnóstico inicial, en diferenciar el órgano o región primariamente afectada, dichos métodos pueden clasificarse en no invasivos como pueden ser el ultrasonido, la tomografía axial computarizada, la resonancia magnética, además de sus versiones helicoidal y tridimensional, etc.<sup>3-7</sup> Y los considerados invasivos como son las punciones, guiadas o no por ultrasonido, laparoscopia o endoscopia diagnóstica y en ciertas circunstancias estas modalidades proporcionan y se emplean de manera terapéutica.<sup>8,9</sup> Sin embargo en la medida de la estabilidad, la naturaleza de la patología y su magnitud, los estudios pueden ser solamente básicos para trasladarlo al quirófano o más avanzados como la TAC helicoidal o la resonancia magnética o el ultrasonido tridimensional, teniendo en consideración que las complicaciones del abdomen agudo son tiempo-dependientes, de tal manera que es más conveniente para el paciente una laparotomía exploradora (en sus modalidades de cirugía abierta o endoscópica) por un diagnóstico incierto a un diagnóstico preciso con un retraso quirúrgico. Por otro lado, es importante recordar que un estudio avanzado no sustituirá nunca una buena historia clínica con una buena exploración.

## Cirugía endoscópica

La cirugía endoscópica desde sus inicios al final de los años ochenta e inicios de la década pasada, tuvo un impacto relevante en el tratamiento y diagnóstico de la patología abdominal, y posteriormente en todas y cada de las ramas de la cirugía. Inicialmente conocida como abordaje laparoscópico, ahora en un concepto integral se le conoce como cirugía endoscópica, dado que emplea cada vez más los avances de la tecnología en microprocesadores, cámaras de mayor resolución, mejor instrumental endoscópico y quirúrgico que finalmente proporcionan una mejor calidad de atención de los pacientes.

Ahora con orificios de menor tamaño podemos realizar procedimientos igualmente efectivos a los que se realizaban por cirugía abierta o convencional.

En nuestros tiempo los estudios iniciales y un diagnóstico certero por la cirugía endoscópica representa y es sin duda uno de los mayores avances en el campo quirúrgico.

Aun cuando existieran dudas diagnósticas, se puede visualizar de manera directa la cavidad abdominal, tomar muestras y biopsias, sin necesidad de someter al paciente a una cirugía abierta mayor, que puede requerir mayor tiempo y una recuperación prolongada, en casos de trauma severo y estado de choque esta modalidad puede verse limitada en su aplicación.<sup>9,10</sup>

Este tipo de abordaje es una práctica habitual hoy en nuestros días en la gran mayoría de programas de residencia en nuestro país y en el mundo, por lo que su implementación y desarrollo es y será cada vez más la opción más empleada. Recientemente se vienen realizando modificaciones a ese abordaje como lo es el método **NOTES** por sus siglas en inglés: (**N**atural **O**rifice **T**ranslumenal **E**ndoscopic **S**urgery).<sup>11,12</sup> Que se refiere a realizar los procedimientos quirúrgicos endoscópicos a través de orificios naturales como son el tracto gastrointestinal (estómago, duodeno, colon, etc.), tracto urinario y otros órganos como la vagina en pacientes candidatas.<sup>13</sup>

Los resultados preliminares son alentadores, tiene un gran potencial y cada vez más tal vez como en sus inicios de la cirugía endoscópica existan limitaciones que se irán superando con la curva de aprendizaje y experiencia de los cirujanos entrenados en este campo.<sup>14</sup>

Otro ejemplo es la cápsula endoscópica, empleada para realizar en su trayecto gastrointestinal una

serie de imágenes, que nos proporcionaba en casos como sangrados de tubo digestivo, lesiones benignas y neoplasias y otras que se consideran de un difícil diagnóstico y acceso, especialmente en el intestino delgado.<sup>15</sup>

## Padecimientos de origen no traumatológico

Este conjunto de signos y síntomas no es únicamente de la población adulta, existe un gran número de patologías en pediatría y geriatría que se presentan con datos abdominales que requieren atención médica de urgencia como son en los niños la intususcepción intestinal, apendicitis aguda, divertículo de Meckel perforado, etc.<sup>16,17</sup> Y en la población adulta mayor casos de cáncer, perforación de víscera hueca (por enfermedad ácido-péptica, salmonella, divertículo de Meckel, etc.), isquemia intestinal, diverticulitis aguda, sangrado de tubo digestivo, etc.<sup>18-21</sup>

En el embarazo y como cualquier paciente, puede cursar con alguna patología de urgencia abdominal o ginecológica, ejemplos frecuentes son el embarazo ectópico en sus primeras semanas de gestación,<sup>22,23</sup> apendicitis aguda<sup>24-26</sup> y colecistitis aguda en el transcurso del embarazo,<sup>26,27</sup> entre otras que requieren un tratamiento quirúrgico de urgencia.

## Fisiopatología

La patogenia del abdomen agudo se relaciona con las características del dolor abdominal y los métodos diagnósticos están orientados a la etiología del padecimiento. Existen tres tipos de dolor relacionados al abdomen agudo: 1) El visceral, producido por distensión, espasmo, isquemia e irritación, el cual se manifiesta como un síntoma profundo, difuso y mal localizado, que en cuadros severos se acompaña de hiperestesia, hiperbaralgesia y rigidez muscular involuntaria, 2) El dolor somático, síntoma más agudo y localizado que se origina desde el peritoneo parietal, raíz del mesenterio y diafragma, y 3) El dolor referido, relacionado con el sitio del proceso original y manifestado en el trayecto de una metámera o de una extensión inflamatoria o infecciosa.

Los procesos inflamatorios e infecciosos son las principales causas, por lo que habrá de recordarse que la invasión bacteriana produce dos tipos de respuesta: La local, de defensa propiamente antibac-

teriana y otra sistémica con manifestaciones hemodinámicas, metabólicas y neuroendocrinas. El daño peritoneal estimula la liberación de sustancias vasoactivas y aumento de la permeabilidad peritoneal y con ello la participación de distintos mediadores y que al cabo de pocas horas se instala una respuesta celular y humoral intensa que a nivel sistémico puede dar origen a disfunciones o fallas orgánicas y eventualmente la muerte.

### Cuadro clínico

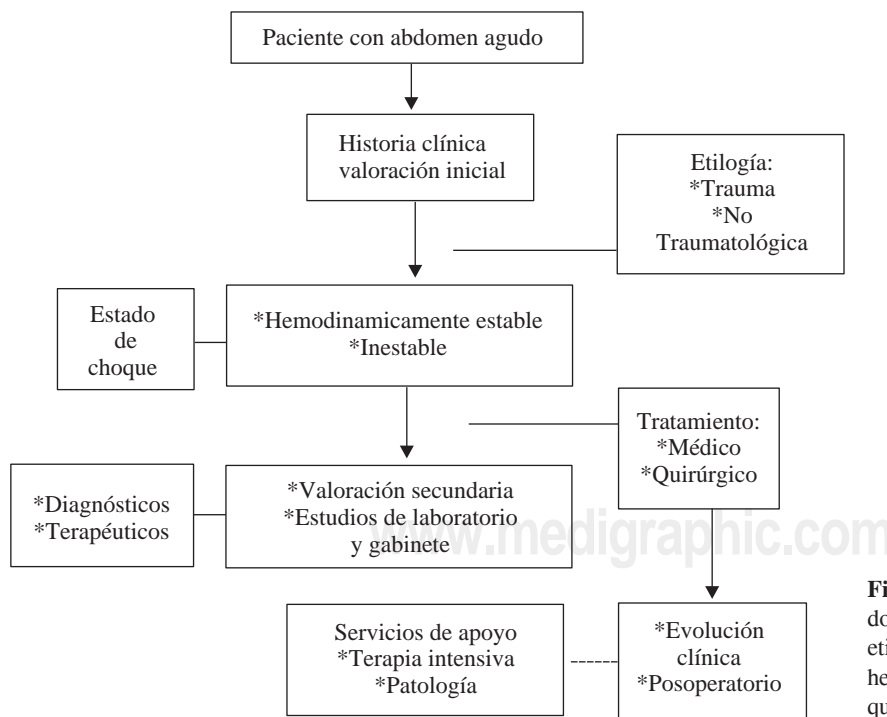
La historia clínica cuidadosa con un interrogatorio minucioso de las características del dolor y la investigación de antecedentes relevantes son muy importantes. De igual manera los síntomas acompañantes como la fiebre, el vómito se correlacionan con la etiología del abdomen agudo.

### Diagnóstico

El elemento fundamental es diferenciar el cuadro de abdomen agudo del dolor abdominal por otras causas y en seguida determinar si el proceso es de terapéutica médica o quirúrgica. Otros elementos

como la repercusión sistémica, los factores de riesgo (pacientes obesos, embarazadas, inmunocomprometidos, seniles etc.) se deben detectar y considerar, especialmente en los casos atípicos.

Los estudios de laboratorio y gabinete deben ser dirigidos a detectar la patología intraperitoneal, en esencia lo quirúrgico, desde lo más básico y no invasivo hasta lo más complejo y potencialmente invasivo (ej. lavado peritoneal, laparoscopia diagnóstica). Los estudios de laboratorio básico incluyen: Biometría hemática, química sanguínea de al menos tres elementos, tiempos de coagulación, examen de orina y en la mujer en edad fértil la prueba inmunológica de embarazo; para los cuadros del abdomen superior: amilasa, lipasa y pruebas de función hepática. Los estudios de gabinete deben iniciar como es tradición por una telerradiografía de tórax y placas simples del abdomen o para algunos casos el método Fast de algunos servicios de urgencias, especialmente en relación al trauma. El ultrasonido convencional, transvaginal o endoscópico, al igual que la tomografía computarizada son métodos de gran ayuda cuando no retrasan considerablemente el tratamiento quirúrgico, finalmente la laparoscopia y NOTES para casos selectivos.<sup>28,29</sup>



**Figura 1.** Ruta crítica del paciente con dolor abdominal agudo, de acuerdo a la etiología del padecimiento, su condición hemodinámica y tratamiento médico quirúrgico.



## Diagnóstico diferencial

Otro elemento fundamental es distinguir otras patologías que dieron origen al abdomen agudo o concomitantes con él, por lo que es conveniente repasar las principales patologías en relación a cada región del abdomen:

**Cuadrante superior derecho:** Pancreatitis aguda, hepatitis aguda, hepatomegalia congestiva aguda, neumonía con reacción pleural, pielonefritis aguda, angina de pecho, absceso hepático.

**Cuadrante superior izquierdo:** Pancreatitis aguda, aneurisma aórtico, colitis aguda, pielonefritis, neumonía, infarto agudo del miocardio. **Periumbilical:** Obstrucción intestinal, pancreatitis aguda, diverticulitis. **Cuadrante inferior derecho:** Enfermedad pélvica inflamatoria, salpingitis aguda, quiste de ovario complicado, embarazo ectópico roto, adenitis mesentérica, diverticulitis de Meckel, cálculo ureteral, ileitis terminal. **Cuadrante inferior izquierdo:** Diverticulitis, enfermedad pélvica inflamatoria, salpingitis aguda, quiste de ovario complicado, embarazo ectópico roto, tumor o cuerpo extraño en colon descendente, cálculo ureteral.

## Conclusión

El manejo del paciente con abdomen agudo debe ser rápido, eficaz y requiere de un tratamiento multidisciplinario, dependerá de la gravedad del padecimiento, por ejemplo se requiere del apoyo de la Unidad de Cuidados Intensivos, para la estabilidad hemodinámica y el manejo en el preoperatorio y en una gran proporción de los casos en el postoperatorio inmediato.<sup>2,30</sup>

La ruta crítica que debe seguirse en este tipo de patologías agudas se representa en la *figura 1*. Priorizando el manejo y permeabilidad de las vías aéreas, adecuada circulación y perfusión tisular. Completando los estudios de laboratorio y gabinete para definir en base a la historia clínica y exploración física el diagnóstico probable y tratamiento.

Este algoritmo representa el manejo básico en todo paciente que se recibe en un servicio de trauma o de urgencias médico-quirúrgicas, priorizando el ABC de la evaluación primaria y en caso necesario estabilización del estado de choque de acuerdo a cada paciente en particular.

## Referencias

1. Flasar MH, Goldberg E. Acute abdominal pain. *Med Clin North Amer* 2006; 90: 481-503.
2. Matthews JB, Hodin RA. Acute abdomen and appendix. In: Mulholland MW, Lillemoie KD. *Greenfield's Surgery. Scientific Principles and Practice*. Fourth Edition. Philadelphia: JB Lippincott; 2006: 1209-1222.
3. Hayes R. Abdominal pain: general imaging strategies. *Eur Radiol* 2004; 14 Suppl 4: L123-137.
4. Puylaert JB. Ultrasonography of the acute abdomen: gastrointestinal conditions. *Radiol Clin North Am* 2003; 41: 1227-1242.
5. Federle MP. CT of the acute (emergency) abdomen. *Eur Radiol* 2005; 15 Suppl 4: 100-104.
6. MacKersie AB, Lane MJ, Gerhardt RT, Claypool HA, Keenan S, Katz DS, Tucker JE. Nontraumatic acute abdominal pain: Unenhanced helical CT compared with three-view acute abdominal series. *Radiology* 2005; 237: 114-122.
7. Keyzer C, Zalzman M, Maertelaer VD, Coppens E, Bali MA, Gevenois PA, Van Gansbeke D. Comparison of US and unenhanced multi-detector row CT in patients suspected of having acute appendicitis. *Radiology* 2005; 236: 527-534.
8. Paterson-Brown S. Emergency laparoscopic surgery. *Br J Surg* 1993; 80: 279-283.
9. Golash V, Willson PD. Early laparoscopy as a routine procedure in the management of acute abdominal pain: a review of 1,320 patients. *Surg Endosc* 2005; 19: 882-885.
10. Riemann JF. Diagnostic laparoscopy. *Endoscopy* 2003; 35: 43-47.
11. Giday SA, Kantsevov SV, Kalloo AN. Principle and history of natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES). *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2006; 15: 373-377.
12. De la Fuente SG, Demaria EJ, Reynolds JD, Portenier DD, Pryor AD. New developments in surgery: Natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES). *Arch Surg* 2007; 142: 295-297.
13. Clayman RV, Box GN, Abraham JB, Lee HJ, Deane LA, Sargent ER, Nguyen NT, Chang K, Tan AK, Ponsky LE, McDougall EM. Rapid communication: transvaginal single-port NOTES nephrectomy: Initial laboratory experience. *J Endourol* 2007; 21: 640-644.
14. Alberdi JC. NOTES: A surgeon's perspective. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2001; 17: 605-610.
15. Riemann JF, Schmidt H, Schilling D, Kinze F, Eickhoff A, Weickert U, Schulz HJ, Riemann JF. Follow-up of patients with obscure gastrointestinal bleeding after capsule endoscopy and intraoperative enteroscopy. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 780-783.
16. Bundy DG, Byerley JS, Liles EA, Perrin EM, Katznelson J, Rice HE. Does this child have appendicitis? *JAMA* 2007; 298: 438-451.
17. Vasavada P. Ultrasound evaluation of acute abdominal emergencies in infants and children. *Radiol Clin North Am* 2004; 42: 445-456.
18. Lyon C, Clark DC. Diagnosis of acute abdominal pain in older patients. *Am Fam Physician* 2006; 74: 1537-1544.
19. Newton E, Mandavia S. Surgical complications of selected gastrointestinal emergencies: pitfalls in management of the acute abdomen. *Emerg Med Clin North Am* 2003; 2: 873-907.
20. Macari M. Intestinal ischemia versus intramural hemorrhage: CT evaluation. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 180: 177-184.



21. Athie CG, Guizar CB, Alcántara AV, Alcaraz GH, Montalvo E. Twenty-five years experience in the surgical treatment of perforation of the ileum by salmonella typhi at the General Hospital of Mexico City, Mexico. *Surgery* 1998; 123: 632-636.
22. Rodea RH, Athié GC, Guizar BC, Montalvo JE. Embarazo ectópico roto sin mortalidad: Acciones clave. *Cir Gen* 2006; 28: 144-147.
23. Montalvo JE, Guizar BC, Athie GC. Ruptured ectopic pregnancy. six years experience. *Cirujano General* 1999; 21: 136-139.
24. Guizar BC, Athie GC, Alcaraz HG, Rodea RH, Montalvo JE. Analysis of 8,732 cases of acute appendicitis in the general hospital of Mexico city. *Cirujano General* 1999; 21: 105-109.
25. Halkic N, Tempia-Caliera AA, Ksontini R, Suter M, Delaloye JF, Vuilleumier H. Laparoscopic management of appendicitis and symptomatic cholelithiasis during pregnancy. *Langenbecks Arch Surg* 2006; 391: 467-471.
26. Parangi S, Levine D, Henry A, Isakovitch N, Pories S. Surgical gastrointestinal disorders during pregnancy. *Am J Surg* 2007; 193: 223-232.
27. González RV, Marengo CCA, Chávez GA, González DS, Montalvo JE. Laparoscopic cholecystectomy: results of the experience At Hospital General of Mexico after nine years of implemented. *Rev Mex Cir Endoscop* 2002; 3: 71-73.
28. Rattner D, Kalloo A. ASGE/SAGES working group on natural orifice transluminal endoscopic surgery 2005. *Surg Endosc* 2006; 20: 329-333.
29. Flora ED, Wilson TG, Martin IJ, O'Rourke NA, Maddern GJ. A review of natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES) for intra-abdominal surgery: experimental models, techniques, and applicability to the clinical setting. *Ann Surg* 2008; 247: 583-602.
30. Mattox KL. The operating Theater for the acute care surgery. In: Britt LD. *Acute care surgery, principles and practice*. Springer 2007: 24-30.