

# Síndrome de isquemia-reperfusión asociado al trasplante hepático: una visión actualizada

A. Casillas-Ramírez<sup>a</sup>, I. Ben Mosbah<sup>a</sup>, R. Franco-Gou<sup>a</sup>, A. Rimola<sup>b</sup>, J. Roselló-Catafau<sup>a</sup> y C. Peralta<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Hepatología Experimental. Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC-IDIBAPS. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Unidad de Hepatología. Hospital Clínic. Barcelona. España.

## RESUMEN

La lesión por isquemia reperusión (I/R) es la causa principal tanto del mal funcionamiento inicial del injerto como del fallo primario en el trasplante hepático. La búsqueda de estrategias terapéuticas para prevenir la lesión por I/R ha conducido a la utilización de fármacos esperanzadores, aunque la gran mayoría de ellos no ha alcanzado una aplicación clínica. La terapia génica requiere mejorar las técnicas de transfección, evitar la toxicidad de vectores y una discusión ética antes de alcanzar el nivel clínico. El preconditionamiento isquémico (PC) es la primera estrategia terapéutica utilizada en la clínica para reducir la lesión por I/R en hepatectomías de tumores. Futuras investigaciones aportarán datos acerca de la efectividad del PC para reducir la lesión por I/R asociada al trasplante hepático, y aumentar la poca tolerancia de los injertos esteatósicos al síndrome de I/R para su utilización en el trasplante y aliviar, así, la carencia de órganos.

## ISCHEMIA-REPERFUSION SYNDROME ASSOCIATED WITH LIVER TRANSPLANTATION: AN UPDATE

Ischemia-reperfusion (I/R) injury is the main cause of both initial graft dysfunction and primary failure in liver transplantation. The search for therapeutic strategies to prevent I/R injury has led to research into promising drugs, although most have not been used clinically. Gene therapy requires better transfection techniques, avoiding vector toxicity, and ethical debate before being used clinically. Ischemic preconditioning is the first therapeutic strategy used in clinical practice to reduce I/R injury in hepatectomies for tumors. Future research will provide data on the effectiveness of ischemic preconditioning in reducing I/R injury associated with liver transplantation, and in reducing

the vulnerability of steatotic grafts to I/R syndrome so that they can be used in transplantation, thus relieving the organ shortage.

## INTRODUCCIÓN

La historia del trasplante hepático (TH) se remonta al año de 1963, cuando Thomas Starzl realizó el primer TH en un niño que padecía atresia biliar, el cual sólo sobrevivió 5 h. En el mismo año, 2 meses más tarde, Starzl practicó su segundo TH, esta vez en adultos, y se considera a éste como el primer TH exitoso de la historia. El paciente falleció a los 22 días del postoperatorio a causa de una embolia pulmonar.

El TH está indicado en las enfermedades hepáticas progresivas en las que no sean posibles otras medidas terapéuticas y en las que la supervivencia esperada al año sea inferior a la que se conseguiría con el trasplante<sup>1</sup>. Las indicaciones más comunes para el TH son la cirrosis secundaria a infección crónica por el virus de la hepatitis C y la cirrosis alcohólica. En niños, la indicación principal suele ser la atresia biliar. Otras enfermedades hepáticas susceptibles de ser tratadas con TH comprenden cirrosis causada por el virus de la hepatitis B, hepatitis autoinmune, colangitis esclerosante primaria, carcinoma hepatocelular, enfermedades metabólicas (como la enfermedad de Wilson o la hemocromatosis hereditaria), e insuficiencia hepática aguda y grave; las causas comunes son las reacciones por hipersensibilidad o idiosincrasia a fármacos, entre otras<sup>1,2</sup>. Si bien el TH es la mejor opción terapéutica para determinadas entidades patológicas, como las mencionadas anteriormente, la isquemia-reperfusión (I/R), inherente a todo TH, es la causa principal tanto del mal funcionamiento inicial como del fallo primario del injerto hepático<sup>3-5</sup>; este último es responsable del 81% de los retrasplantes durante la primera semana tras la intervención quirúrgica<sup>6</sup>. Y si esto ocurre en hígados sanos, aún son mayores los casos de disfunción primaria cuando el injerto es esteatósico, de ahí que la esteatosis sea la causa del mayor número de órganos no aptos para trasplante (54%), acentuando así la problemática del banco de órganos<sup>7</sup>. Por tanto, minimizar

Correspondencia: J. Roselló-Catafau.

Unidad de Hepatología Experimental. Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC-IDIBAPS.

Roselló, 171, 6.ª y 7.ª planta. 08036 Barcelona. España.

Correo electrónico: jrcbam@iibb.csic.es

Recibido el 22-6-2005; aceptado para su publicación el 6-7-2005.

los efectos adversos del síndrome de I/R podría aumentar el número de órganos disponibles para trasplante y el de pacientes que se recuperen exitosamente de un trasplante hepático. El primer paso para lograr este objetivo sería el completo entendimiento de los mecanismos involucrados en la lesión por I/R.

## FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Si bien la lesión por I/R se ha dividido en 2 fases, la lesión causada por la isquemia y la lesión debida a la reperfusión, la separación de los episodios celulares que ocurren en cada fase no es absoluta, ya que el daño celular en el órgano hipóxico se acentúa después de la restauración del aporte de oxígeno<sup>8</sup>, lo que sugiere que los episodios que suceden en la reperfusión son la consecuencia de los que se inician durante la isquemia. Además, se ha observado que la reperfusión de un hígado expuesto a un período de isquemia breve no induce ningún daño detectable, un hallazgo indicativo de que la reperfusión por sí sola no es perjudicial<sup>9-11</sup>.

Durante la isquemia, se interrumpe el aporte de oxígeno al órgano y se detiene la cadena respiratoria mitocondrial, lo que comporta una depleción en los valores de *adenosine triphosphate* (ATP)<sup>12</sup>. La degradación de ATP estimula la glucólisis anaeróbica con la consiguiente formación de ácido láctico. La acidosis resultante, además de alterar la cinética normal de las enzimas, supone un sistema menos efectivo para producir ATP y las células se ven privadas de la energía necesaria para mantener la homeostasis. El fallo en la homeostasis celular se caracteriza por la pérdida de gradiente de los iones de sodio y de calcio a través de las membranas celulares<sup>4,5,13</sup>. Este hecho provoca un edema intracelular y el consiguiente hinchamiento de las células de Kupffer (CK) y las células endoteliales (CE)<sup>14</sup>. Estos fenómenos inducen una alteración en los orgánulos citoplasmáticos y en la integridad de la membrana, y pueden desencadenar la muerte celular<sup>13</sup>. El hígado esteatósico es más vulnerable a los efectos nocivos derivados de la isquemia; en este sentido, numerosos estudios evidencian que en presencia de esteatosis los valores de ATP son significativamente más bajos comparados con hígados sanos<sup>7</sup>.

La reperfusión (recuperación del flujo sanguíneo) del hígado previamente isquémico inicia toda una serie de fenómenos inflamatorios en los que están implicados múltiples mediadores de la inflamación, plaquetas, leucocitos y el endotelio vascular, los cuales, al interaccionar, derivan en la lesión por reperfusión<sup>15,16</sup>. A título de ejemplo, entre los mediadores inflamatorios descritos en la lesión por I/R hepática destacan los radicales libres de oxígeno (RLO)<sup>17</sup>, interferón beta (IFN- $\beta$ )<sup>18</sup>, interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), *tumor necrosis factor beta* (TNF- $\beta$ ), *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF)<sup>19</sup>, *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1, IL-12<sup>20</sup>, IL-18<sup>21</sup>, *leukotriene B4* (LTB4), *12-hydroxyeicosatetraenoic acid* (12-HETE)<sup>22</sup> y *platelet activating factor*

(PAF)<sup>19</sup>. Además, también se ha demostrado la participación de IL con propiedades antiinflamatorias que funcionan como reguladores del proceso inflamatorio que se desarrolla en la I/R, como IL-6, IL-13<sup>19</sup> y IL-10<sup>20</sup>. Los mediadores inflamatorios son modulados a nivel transcripcional. Estudios sobre transducción de señales en I/R hepática han descrito un papel notorio para diferentes factores de transcripción como nuclear *factor kappa B* (NF- $\kappa$ B), activator protein 1 (AP-1)<sup>17</sup>, *peroxisome proliferator-activated receptor-alpha* (PPAR- $\alpha$ )<sup>23</sup>, *factor nuclear high mobility group box-1* (HMGB1)<sup>24</sup>, *signal transducer and activator of transcription* (STAT3)<sup>25</sup>, *signal transducer and activator of transcription 6* (STAT6)<sup>19</sup>, *hypoxia-inducible factor 1 complex* (HIF-1) y *heat shock factor* (HSF)<sup>17</sup>. La lesión por reperfusión también implica a las cinasas intracelulares que activan factores de transcripción, como SAPK, *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) o *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK)<sup>17</sup>.

Respecto a la acumulación de neutrófilos, se considera que este proceso está regulado por la participación de citocinas, factores del complemento, moléculas de adhesión y quimiocinas<sup>22</sup>, que permiten el reclutamiento, la adhesión y la trans migración de neutrófilos. Algunas moléculas de adhesión celular, conocidas por su papel en I/R hepática, comprenden E-selectina, P-selectina<sup>19</sup>, L-selectina<sup>16</sup>, integrinas  $\beta$ 1, integrinas  $\beta$ 2, *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) y *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1)<sup>22</sup>. De la misma manera, se ha sugerido la participación de quimiocinas, entre las que se han mencionado la IL-8 y sus homólogos<sup>20</sup>, el *cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1* (CINC)<sup>19</sup>, la *epithelial neutrophil activating protein-78* (ENA-78)<sup>8</sup>, la *macrophage inflammatory protein-1* (MIP-1) y 2<sup>8</sup>, la *keratinocyte-derived chemokine* (KC)<sup>19</sup> y el *monocyte chemoattractant-1* (MCP-1), 2, y 3<sup>8</sup>.

Por último, la disfunción microcirculatoria se origina a partir de una serie de episodios que involucra la interacción de células intravasculares (p. ej., neutrófilos) con células no parenquimales (como las CE y las CK) y que es mediada por la síntesis y liberación de moléculas de adhesión, citocinas, factores del complemento, RLO, óxido nítrico (NO) y endotelinas (ET)<sup>26,27</sup>.

Lo anteriormente expuesto evidencia la multitud de mediadores y factores implicados en la lesión por I/R hepática. Ilustrando lo anterior, en la figura 1 se indican algunos de los mecanismos involucrados. Además, las interrelaciones entre las vías de señalización participantes son muy complejas y aún no es posible hablar con total certeza de los episodios que suceden desde que se inicia la reperfusión hasta que tiene lugar la disfunción o el fallo primario del injerto hepático, pues las diversas investigaciones que abordan el tema no han logrado converger en sus resultados, tal vez en parte por la gran diversidad de modelos y diseños experimentales con los que se trabaja. En esta revisión nos centraremos en los diferentes resultados recogidos en la bibliografía acerca de las posibles fuentes generadoras de RLO, de los efectos y mecanismos de acción del NO, del papel de determinados mediadores proinflamatorios, como el TNF, y de determi-

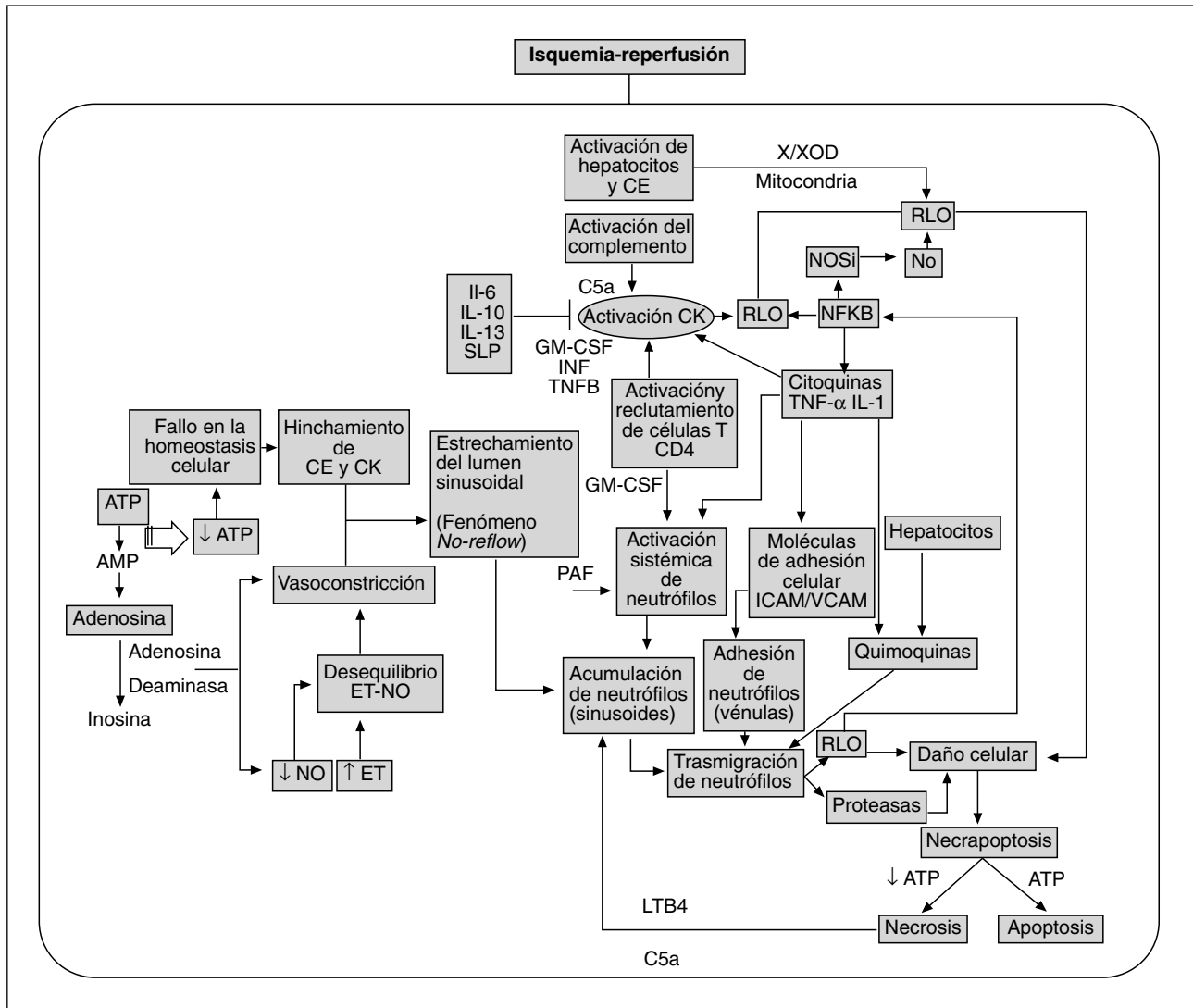


Fig. 1. Mecanismos involucrados en la patofisiología del síndrome por isquemia-reperfusión.

nados factores de transcripción como el NF-κB. Estos datos nos permitirán entender aún más el porqué la I/R hepática continúa siendo un problema sin resolver en la práctica clínica.

Respecto a los mecanismos responsables de RLO, los estudios realizados con inhibidores del sistema xantina/xantina oxidasa (X/XOD)<sup>28</sup> apuntaban a este sistema como el principal generador de RLO en hepatocitos<sup>29,30</sup>, implicándolo además en el daño pulmonar asociado al TH<sup>31</sup>. Por otro lado, otros resultados obtenidos en modelos experimentales de hígado perfundido aislado e isquemia caliente han puesto en tela de juicio la importancia del sistema X/XOD, e indican que la mitocondria podría ser la fuente principal de RLO<sup>32</sup>. De todas maneras, los datos obtenidos en un modelo murino de I/R caliente *in vivo* constatan que el papel de la mitocondria no es absoluto<sup>33</sup>. En la misma línea, otras investigaciones señalan que son los neutrófilos o las CK las principales fuentes generadoras de RLO<sup>34,35</sup>. Sin embargo, esta última hipótesis también

ha suscitado cierta controversia. La eliminación de las CK en TH no modificó los efectos nocivos de la I/R<sup>36</sup>, y los neutrófilos activados no son esenciales en el daño por reoxigenación<sup>8</sup>. La divergencia de resultados respecto a los mecanismos de generación de RLO en la I/R hepática es clara. Hay que destacar además que el estrés oxidativo en hepatocitos y la estimulación de CK después de la I/R depende del tiempo de isquemia al cual esté sometido el hígado, y también puede diferir entre isquemia a 4 y 37 °C<sup>37</sup>, probablemente conduciendo a diferentes mecanismos de desarrollo del daño hepático. Además, cabe destacar que en la lesión por reperusión es difícil establecer una distinción entre los mediadores que tienen un papel beneficioso en la lesión por I/R y los que causan efectos perjudiciales. Si bien numerosos estudios destacan el papel protector del NO para reducir la lesión y aumentar la supervivencia en procesos de I/R hepática<sup>38-40</sup>, los resultados obtenidos por otros autores no destacan ningún efecto del NO, e incluso refieren una acción perjudicial

de este mediador vasoactivo en el daño por I/R hepática<sup>41</sup>. Además, se han encontrado diferencias en los mecanismos de acción del NO, en función de si éste es endógeno o exógeno. En este sentido, mientras que el NO endógeno puede reducir la acumulación de neutrófilos, la suplementación exógena de NO no modifica este parámetro pero se asocia con una inhibición en la producción de ET<sup>42</sup>. Se habla además de un efecto dual del NO en la I/R hepática, en función de si el NO deriva de la óxido nítrico sintasa constitutiva (NOSc) o de la inducible (NOSi). Si bien la producción de NO derivada de la NOSc tendría efectos benéficos en la I/R hepática, se ha señalado que la producción de NO derivada de NOSi podría contribuir al daño hepático<sup>43</sup>. En este sentido, hay estudios que proponen que el NO derivado de la NOSi participa en la generación de RLO e induce la liberación de citocromo C y de caspasas, favoreciendo los procesos proapoptóticos<sup>44,45</sup>. Aún en este punto la controversia continúa, pues otros investigadores han sugerido que la actividad de NOSi es beneficiosa porque induce la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 e inactiva las caspasas<sup>46,47</sup>. Estos efectos diferenciales del NO se han constatado además con otros mediadores implicados en la lesión por I/R hepática. En el caso del TNF, si bien está bien establecido su papel perjudicial en la lesión por I/R hepática, tanto local como sistémica<sup>48</sup>, se ha observado que este mediador es vital en procesos de regeneración hepática<sup>49</sup>, presente en el TH con injertos de tamaño reducido (trasplante pediátrico y de donante vivo). Además, se ha visto recientemente en un modelo experimental de I/R hepática que la suplementación de TNF a dosis bajas es altamente eficaz frente al daño por I/R hepática<sup>49</sup>. Estos efectos diferenciales encontrados en los mediadores inflamatorios se pueden extrapolar además a los factores de transcripción. Es bien conocido que un aspecto común entre la mayoría de los mediadores implicados en la lesión por I/R hepática es su regulación transcripcional. En el caso del NF- $\kappa$ B, experimentos que bloquean la activación de NF- $\kappa$ B en I/R hepática conllevan una reducción en la acumulación de neutrófilos y en el daño hepatocelular<sup>50</sup>. Estos datos indican que el NF- $\kappa$ B puede ser un componente integral de la respuesta hepática inflamatoria. Sin embargo, otros resultados obtenidos en procesos de I/R hepática ponen de manifiesto que la activación de NF- $\kappa$ B es primordial en la regeneración hepática después de TH<sup>51</sup> y reduce la apoptosis y el daño asociados a la I/R hepática.

Se han encontrado también diferentes resultados respecto a la acumulación de neutrófilos. La teoría clásica propone que el aumento en la expresión de moléculas de adhesión, como ICAM-1 y P-selectina, son primordiales para la acumulación de neutrófilos y el consiguiente daño hepático asociado a la I/R<sup>16,27</sup>. Oponiéndose a esta teoría, también hay resultados que demuestran que la acumulación de neutrófilos en el hígado no depende de la sobrerregulación de ICAM-1<sup>52</sup>. En la misma línea, si bien un aumento en la expresión de P-selectina es importante para desencadenar la lesión pulmonar asociada a la I/R hepática, esta molécula de adhesión, al igual que el ICAM, no participa en la acumulación de neutrófilos en el hígado<sup>53</sup>. Es-

tos hallazgos apoyan la hipótesis de que durante la I/R hepática, los neutrófilos se acumulan en los sinusoides<sup>52</sup>, sin depender de las moléculas de adhesión<sup>54,55</sup>, y tal vez sean los factores mecánicos y las características de la vasculatura hepática los que expliquen este hecho<sup>56</sup>.

Además de los diferentes resultados encontrados en la bibliografía sobre los mecanismos, las posibles fuentes de mediadores inflamatorios implicados en la lesión por I/R hepática, y de los resultados diferenciales en cuanto a la acción de estos mediadores, también hay una cierta controversia sobre si la muerte celular asociada a la I/R hepática es por necrosis o por apoptosis. Si bien durante mucho tiempo se ha asumido implícitamente que la muerte celular necrótica y apoptótica son entidades diferentes, esta suposición puede no ser válida, lo que ha originado la aparición de un nuevo concepto llamado «necrapoptosis»<sup>57</sup>.

### ESTRATEGIAS PARA PREVENIR LA LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN ASOCIADA AL TRASPLANTE HEPÁTICO

A pesar de los avances en los tratamientos farmacológicos, en las soluciones de preservación, y en estrategias de terapia génica que han tenido como objetivo disminuir la lesión por I/R asociada al trasplante hepático, los resultados hasta el momento no han sido concluyentes. En la figura 2 se presentan algunas estrategias terapéuticas desarrolladas para prevenir el daño por I/R. En relación con los tratamientos farmacológicos, hay numerosos estudios experimentales centrados tanto en inhibir los efectos nocivos de la isquemia como la respuesta inflamatoria asociada a la reperfusión. Con esta finalidad, se han administrado fármacos, como la cloroquina<sup>58</sup> o la clorpromazina<sup>59,60</sup>, para prevenir las disfunciones mitocondriales y la degradación de fosfolípidos durante la isquemia hepática. Para inhibir las acciones de los RLO durante la reperfusión, se ha tratado con antioxidantes como tocoferol<sup>61</sup>, glutatión-éster (GSH-éster) o alopurinol<sup>63</sup> y se han administrado también anticuerpos dirigidos al TNF<sup>64</sup> para bloquear las acciones nocivas de esta citocina. Para reducir los trastornos microcirculatorios asociados con la I/R hepática, se han realizado tratamientos con dopamina<sup>65</sup> y ATP-MgCl<sub>2</sub><sup>66</sup>. Se han utilizado también fármacos como adenosina<sup>67</sup>, donadores de NO<sup>68</sup>, L-arginina<sup>69</sup> y anticuerpos anti-ICAM-1<sup>70</sup> y anti-P-selectina<sup>52</sup> para bloquear la acumulación de neutrófilos. Por otra parte, ninguno de estos tratamientos ha logrado frenar la lesión por I/R hepática. Hay que tener en cuenta las dificultades de frenar la inflamación asociada a este proceso, debido entre otros factores a los múltiples mediadores y tipos celulares implicados en esta respuesta inflamatoria. Además, hay que considerar las dificultades derivadas del tratamiento farmacológico. En este sentido, el GSH-éster no llega al lugar de acción a concentraciones óptimas ni en el momento adecuado<sup>71</sup>. La administración de anticuerpos anti-TNF provoca sólo una inactivación parcial de la proteína<sup>52</sup>. Pequeñas variaciones en la dosis de donadores de NO tienen

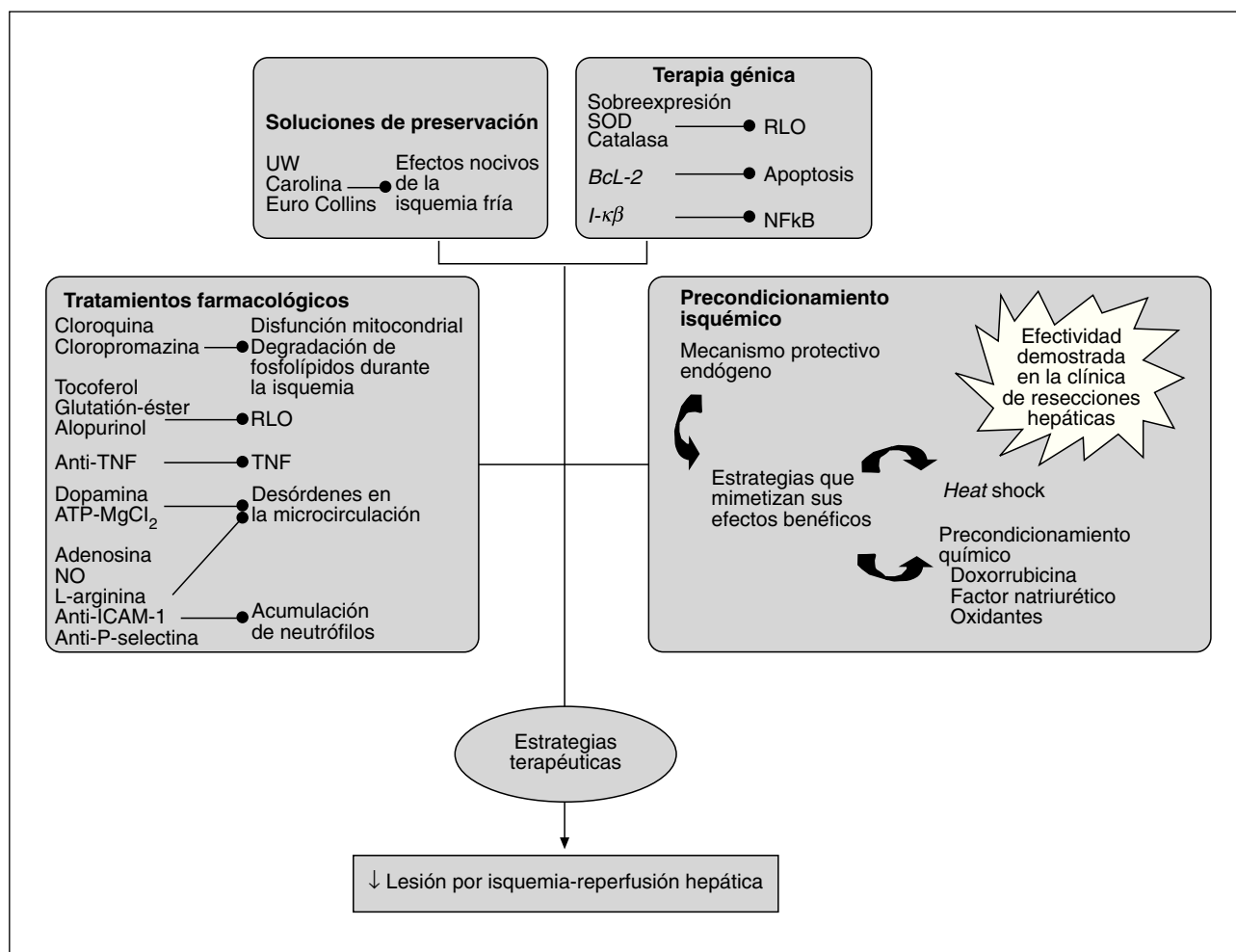


Fig. 2. Estrategias terapéuticas utilizadas para la prevenci6n del daño causado por el s6ndrome de isquemia-reperfusi6n.

efectos totalmente opuestos<sup>42</sup>. Adem6s, no hay que descartar los posibles efectos secundarios derivados de los fármacos, ya que en el caso de la dopamina<sup>72</sup>, adenosina<sup>73</sup> y donadores de NO<sup>74</sup> se han descrito efectos nocivos sistémicos. Y si esto ocurre en h6gados sanos, a6n son mayores los problemas para modular la lesi6n por I/R en h6gados esteat6sicos. Este tipo de h6gados generan RLO que son insensibles a la acci6n de antioxidantes como la super6xido dismutasa y la catalasa<sup>75</sup>. La diferencia en los mecanismos de acci6n entre h6gados sanos y esteat6sicos supone que los tratamientos efectivos en h6gados sanos pueden no serlo en presencia de esteatosis y, adem6s, la dosis de fármaco administrado puede ser diferente en ambos tipos de h6gados. Hallazgos como 6ste deben tenerse en cuenta en el momento de la aplicaci6n por igual de estrategias farmacol6gicas en I/R en h6gados sanos y esteat6sicos, pues los efectos pueden ser muy diferentes en cada caso. A t6tulo de ejemplo, la administraci6n de un donador de NO en un modelo de trasplante hepático experimental logró reducir el estr6s oxidativo en h6gados sanos, mientras que la suplementaci6n de NO, a la misma dosis, aument6 la vulnerabilidad de los injertos esteat6sicos al s6ndrome de I/R<sup>76</sup>. Por otra parte, tambi6n po-

dría haber fármacos que s6lo fueran efectivos en h6gados esteat6sicos. En I/R asociada al TH, se ha evidenciado en h6gados esteat6sicos un aumento en la expresi6n de la prote6na desacoplante-2 mitocondrial (UCP2) y una capacidad disminuida de sintetizar ATP en la reperfusi6n, lo que contribuye a la vulnerabilidad de los h6gados esteat6sicos al s6ndrome de I/R<sup>77</sup>. As6i pues, fármacos como la cerulenina, que pueden actuar sobre la UCP2 disminuyendo su expresi6n, logran aumentar el contenido de ATP en h6gados esteat6sicos<sup>78</sup>, pero tal estrategia tal vez no tendr6a ning6n efecto en h6gados sanos porque no se presenta sobreexpresi6n de UCP2<sup>79</sup>. Resultados similares se han obtenido con la carnitina<sup>80,81</sup>. Respecto a los avances en la mejor6a de las soluciones de preservaci6n, han ido apareciendo diferentes soluciones (Euro Collins, Carolina, Universidad de Wiscosin [UW]) con la finalidad de mantener al injerto en condiciones 6ptimas durante la isquemia fría. La m6s utilizada en la clínica ha sido la UW<sup>82</sup>. La diferencia de esta soluci6n con las restantes es que no contiene glucosa, lo cual evita la producci6n de lactato y los problemas de acidosis; en cambio, contiene adenosina, que inhibe la agregaci6n plaquetaria y la acumulaci6n de neutr6filos, y es un sustrato

para la síntesis de ATP<sup>82</sup> y contiene antioxidantes, como GSH y alopurinol, para evitar los efectos nocivos de los RLO<sup>83</sup>. Una de las limitaciones de la solución de UW es la presencia de hidroxietilamidón, proagregante de glóbulos rojos, que puede producir un lavado incompleto del injerto hepático con la consiguiente estasis venosa y respuesta inflamatoria<sup>84</sup>. Otra de las limitaciones es que muchas de las sustancias que se encuentran en la solución UW (alopurinol, lactobionato) no protegen bien por no estar en concentraciones adecuadas o por tener dificultades para llegar al lugar de acción. De hecho, se han realizado estudios en humanos que indican que a pesar de la presencia de alopurinol en UW, este antioxidante no ha logrado frenar los efectos nocivos del sistema generador de RLO, X/XOD<sup>85</sup>.

En relación con las estrategias de terapia génica centradas en el estrés oxidativo para reducir la lesión por I/R hepática, se han realizado pretratamientos con superóxido dismutasa y catalasa utilizando como vehículo adenovirus, liposomas o polientilenglicol<sup>86,87</sup>. Para inhibir la apoptosis, se ha sobreexpresado el gen *Bcl-2*, utilizando principalmente como vehículo adenovirus<sup>86</sup>. Se ha intentado modular la acción del NF-κB tratando con formas mutantes de I-κB<sup>88</sup>. Por otra parte, los problemas de la terapia génica pasan por la toxicidad de vectores, por la dificultad en conseguir una expresión óptima de la proteína en el momento y lugar adecuado, y por la dificultad de conseguir mutantes adecuados (en el caso de NF-κB), debido a las controversias respecto a la activación de NF-κB<sup>89-91</sup>.

A partir del momento en que se describió la efectividad del preconditionamiento isquémico, consistente en aplicar al hígado breves períodos de I/R previo a la isquemia sostenida<sup>92</sup>, se han realizado numerosos trabajos con la finalidad de buscar estrategias que puedan mimetizar sus efectos beneficiosos. Una de estas estrategias es el *heat shock*, que consiste en inducir un aumento en la temperatura corporal antes de la isquemia hepática<sup>93</sup>. El preconditionamiento químico con dextrorubicina<sup>94</sup> factor natriurético<sup>95</sup> o con oxidantes<sup>96</sup> reduce la lesión hepática en diferentes modelos experimentales de I/R. Sin embargo, las limitaciones de estas estrategias es su posible aplicación clínica, ya sea por la dificultad que ello supondría, por problemas de toxicidad y por los efectos secundarios descritos<sup>96-98</sup>.

Si bien todas estas estrategias (tratamientos farmacológicos, mejoría de las soluciones de preservación, terapia génica, *heat shock*, preconditionamiento químico) no han podido tener su proyección en la clínica, las investigaciones acerca de la efectividad del PC en modelos experimentales de I/R hepática han sido la base para que esta estrategia quirúrgica pueda ser aplicada en la clínica para reducir la lesión por I/R hepática normotérmica asociada con las resecciones hepáticas de tumores, tanto en hígados sanos como en esteatóticos. Si bien los resultados sobre la efectividad del PC en la clínica fue demostrada por primera vez por Clavien<sup>99,100</sup>, serán necesarias futuras investigaciones para establecer si esta estrategia quirúrgica puede ser igualmente útil en el TH.

## AGRADECIMIENTOS

Este manuscrito ha sido posible gracias a la concesión de los proyectos SAF 2005-00385 y BFI 2003-00912 y al contrato Ramón y Cajal (Dra. C. Peralta) concedidos por el Ministerio de Educación y Ciencia (Madrid). Asimismo, los autores agradecen al Ministerio de Sanidad y Consumo el apoyo recibido (proyecto V2003-REDC03G-O).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Prieto M, Clemente G, Casafont F, et al. Consensus document on indications for liver transplantation, 2002. Asociación Española para el Estudio del Hígado. Gastroenterol Hepatol. 2003; 26:355-75.
2. Southern PB, Davies MH. Indication and assessment for liver transplantation. Clin Med. 2002;2:313-6.
3. Shaw BW Jr. Auxiliary liver transplantation for acute liver failure. Liver Transpl Surg. 1995;1:194-200.
4. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. Transplantation. 1992;53:957-78.
5. Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. J Hepatol. 1996;25:774-80.
6. Quinta memoria de resultados del Registro Español de Trasplante Hepático, 1984-2001.
7. Selzner M, Clavien PA. Fatty liver in liver transplantation and surgery. Semin Liver Dis. 2001;21:105-13.
8. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. J Gastroenterol Hepatol. 2003;18:891-902.
9. Gao W, Washington MK, Bentley RC, Clavien PA. Antiangiogenic agents protect liver sinusoidal lining cells from cold preservation injury in rat liver transplantation. Gastroenterology. 1997;113:1692-700.
10. Clavien PA, Harvey PR, Sanabria JR, et al. Lymphocyte adherence in the reperfused rat liver: mechanisms and effects. Hepatology. 1993;17:131-42.
11. Iu S, Harvey PR, Makowka L, Petrunka CN, Ilson RG, Strasberg SM. Markers of allograft viability in the rat. Relationship between transplantation viability and liver function in the isolated perfused liver. Transplantation. 1987;44:562-9.
12. Ohkohchi N, Sakurada M, Endoh T, et al. Role of free radicals and energy synthesis on primary graft nonfunction in liver transplantation. Transplant Proc. 1991;23:2416-9.
13. Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. Gastroenterology. 1995;108: 252-75.
14. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. Am J Pathol. 1994;145:1421-31.
15. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. Am J Surg. 2001;181:160-6.
16. Banga NR, Homer-Vanniasinkam S, Graham A, et al. Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. Br J Surg. 2005;92:528-38.
17. Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. J Mol Med. 1999; 77:577-92.
18. Day YJ, Marshall MA, Huang L, et al. Protection from ischemic liver injury by activation of A2A adenosine receptors during reperfusion: inhibition of chemokine induction. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004;286:G285-G293.
19. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003;284:G15G-26G.
20. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. Hepatology. 2000;32:169-73.
21. Takeuchi D, Yoshidome H, Kato A, et al. Interleukin 18 causes hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing anti-inflammatory cytokine expression in mice. Hepatology. 2004; 39:699-710.

22. Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 1998; 5:402-8.
23. Okaya T, Lentsch AB. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  regulates postischemic liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286:606G-12G.
24. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med.* 2005;201:1135-43.
25. Tacchini L, Fusar-Poli D, Sironi M, Mantovani A, Bernelli-Zazzera A. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in rat liver after heat shock and reperfusion stress. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:316-23.
26. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol.* 1993; 264:801G-9G.
27. Cutrin JC, Perrelli MG, Cavalieri B, et al. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33:1200-8.
28. Elion GB, Kovensky A, Hitchings GH. Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol.* 1966;15:863-80.
29. Adkison D, Hollwarth ME, Benoit JN, et al. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1986;548:101-7.
30. Hamer I, Wattiaux R, Wattiaux-De Coninck S. Deleterious effects of xanthine oxidase on rat liver endothelial cells after ischemia/reperfusion. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1269:145-52.
31. Fernández L, Heredia N, Grande L, et al. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology.* 2002;36:562-72.
32. Jaeschke H, Mitchell JR. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;160:140-7.
33. Grattagliano I, Vendemiale G, Lauterburg BH. Reperfusion injury of the liver: role of mitochondria and protection by glutathione ester. *J Surg Res.* 1999;86:2-8.
34. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol.* 1991;260:355G-62.
35. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during *in vivo* reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukoc Biol.* 1992; 52:377-82.
36. Imamura H, Sutto F, Brault A, Huet PM. Role of Kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology.* 1995;109:189-97.
37. Mochida S, Arai M, Ohno A, et al. Oxidative stress in hepatocytes and stimulatory state of Kupffer cells after reperfusion differ between warm and cold ischemia in rats. *Liver.* 1994; 14:234-40.
38. Liu P, Yin K, Nagele R, Wong PY. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxynitrite generation, but augments neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284:1139-46.
39. Pannen BH, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology.* 1998;27:755-64.
40. Cottart CH, Do L, Blanc MC, et al. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology.* 1999;29:809-13.
41. Jaeschke H, Schini VB, Farhood A. Role of nitric oxide in the oxidant stress during ischemia/reperfusion injury of the liver. *Life Sci.* 1992;50:1797-804.
42. Peralta C, Rull R, Rimola A, et al. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation.* 2001; 71:529-36.
43. Shah V, Kamath PS. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liver Transpl.* 2003;9:1-11.
44. Billiar TR. The delicate balance of nitric oxide and superoxide in liver pathology. *Gastroenterology.* 1995;108:603-5.
45. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;282:1075-9.
46. Torok NJ, Higuchi H, Bronk S, Gores GJ. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9. *Cancer Res.* 2002;62:1648-53.
47. Genaro AM, Hortelano S, Álvarez A, Martínez 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;95:1884-90.
48. 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;30:1481-9.
49. 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; 37:118-28.
50. Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology.* 1999;30:203-8.
51. Bradham CA, Schemmer P, Stachlewitz RF, Thurman RG, Brenner DA. Activation of nuclear factor-kappaB during orthotopic liver transplantation in rats is protective and does not require Kupffer cells. *Liver Transpl Surg.* 1999;5:282-93.
52. Chosay JG, Essani NA, Dunn CJ, Jaeschke H. Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of liver during endotoxin-induced injury. *Am J Physiol.* 1997;272:1195G-200G.
53. Peralta C, Fernández L, Panes J, et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology.* 2001; 33:100-13.
54. Jaeschke H, Farhood A, Fisher MA, Smith CW. Sequestration of neutrophils in the hepatic vasculature during endotoxemia is independent of beta 2 integrins and intercellular adhesion molecule-1. *Shock.* 1996;6:351-6.
55. Essani NA, Fisher MA, Simmons CA, et al. Increased P-selectin gene expression in the liver vasculature and its role in the pathophysiology of neutrophil-induced liver injury in murine endotoxin shock. *J Leukoc Biol.* 1998;63:288-96.
56. McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res.* 1996;32:752-63.
57. Lemasters JJ. V. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol.* 1999;276:1G-6G.
58. Kayawake S, Narbaitz R, Kako KJ. Effects of chloroquine and nifedipine on the phospholipid content and enzyme activity in the subcellular fraction of ischemic rat liver. *Basic Res Cardiol.* 1982;77:140-57.
59. Churchill TA, Green CJ, Fuller BJ. The importance of calcium-related effects on energetics at hypothermia: effects of membrane-channel antagonists on energy metabolism of rat liver. *Cryobiology.* 1995;32:477-86.
60. Farber JL, Martin JT, Chien KR. Irreversible ischemic cell injury. Prevention by chlorpromazine of the aggregation of the intramembranous particles of rat liver plasma membranes. *Am J Pathol.* 1978;92:713-32.
61. Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology.* 2001; 34:13-8.
62. Peralta C, Bulbena O, Xaus C, et al. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation.* 2002;73:1203-11.
63. Fernández L, Heredia N, Grande L, et al. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology.* 2002;36: 562-72.
64. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, et al. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest.* 1990;85:1936-43.

65. Hasselgren PO. Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg Gynecol Obstet*. 1987;164:187-96.
66. Chaudry IH. ATP-MgCl<sub>2</sub> and liver blood flow following shock and ischemia. *Prog Clin Biol Res*. 1989;299:19-31.
67. Peralta C, Hotter G, Closa D, et al. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology*. 1997;25:934-7.
68. Serafin A, Rosello-Catafau J, Prats N, et al. Ischemic preconditioning increases the tolerance of Fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am J Pathol*. 2002;161:587-601.
69. Koti RS, Yang W, Dashwood MR, Davidson BR, Seifalian AM. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transpl*. 2002;8:1182-91.
70. 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;57:368-74.
71. Polyak MM, Arrington BO, Kapur S, Stubenbord WT, Kinkhabwala M. Glutathione supplementation during cold ischemia does not confer early functional advantage in renal transplantation. *Transplantation*. 2000;70:202-5.
72. Shimada Y, Yamamoto F, Yamamoto H, Newling R. Is the use of catecholamine before ischemic arrest safe? Effect of catecholamine on rat heart ischemia/reperfusion injury. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999;47:299-312.
73. Casella G, Leibig M, Schiele TM, et al. Are high doses of intracoronary adenosine an alternative to standard intravenous adenosine for the assessment of fractional flow reserve? *Am Heart J*. 2004;148:590-5.
74. Lamarque D, Whittle BJ. Role of oxygen-derived metabolites in the rat gastric mucosal injury induced by nitric oxide donors. *Eur J Pharmacol*. 1995;277:187-94.
75. Yang S, Zhu H, Li Y, et al. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys*. 2000; 378: 259-68.
76. Carrasco-Chaumel E, Roselló-Catafau J, Bartrons R, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase and nitric oxide in rat steatotic liver transplantation. *J Hepatol*. En prensa 2006.
77. Cheng G, Polito CC, Haines JK, et al. Decrease of intracellular ATP content downregulated UCP2 expression in mouse hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308:573-80.
78. Chavin KD, Fiorini RN, Shafizadeh S, et al. Fatty acid synthase blockade protects steatotic livers from warm ischemia reperfusion injury and transplantation. *Am J Transplant*. 2004; 4:1440-7.
79. Chavin KD, Yang S, Lin HZ, et al. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem*. 1999;274:5692-700.
80. Yonezawa K, Tolba RH, Wetter A, et al. L-carnitine could not improve hepatic warm ischemia-reperfusion injury despite ameliorated blood flow. *J Surg Res*. 2005;125:16-22.
81. Tolba RH, Putz U, Decker D, Dombrowski F, Lauschke H. L-carnitine ameliorates abnormal vulnerability of steatotic rat livers to cold ischemic preservation. *Transplantation*. 2003; 76: 1681-6.
82. Busuttill RW, Tanaka K. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transpl*. 2003;9:651-63.
83. Vajdova K, Graf R, Clavien PA. ATP-supplies in the cold-preserved liver: a long-neglected factor of organ viability. *Hepatology*. 2002;36:1543-52.
84. Morariu AM, Vd Plaats A, V Oeveren W, et al. Hyperaggregating effect of hydroxyethyl starch components and University of Wisconsin solution on human red blood cells: a risk of impaired graft perfusion in organ procurement? *Transplantation*. 2003;76:37-43.
85. Pesonen EJ, Linder N, Raivio KO, et al. Circulating xanthine oxidase and neutrophil activation during human liver transplantation. *Gastroenterology*. 1998;114:1009-15.
86. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology*. 2003;125:917-36.
87. Mari M, Bai J, Cederbaum AI. Adenovirus-mediated overexpression of catalase in the cytosolic or mitochondrial compartment protects against toxicity caused by glutathione depletion in HepG2 cells expressing CYP2E1. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301:111-8.
88. Okaya T, Lentsch AB. Hepatic expression of S32A/S36A IkappaBalpha does not reduce postischemic liver injury. *J Surg Res*. 2005;124:244-9.
89. Somia N, Verma IM. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet*. 2000;1:91-9.
90. Wheeler MD, Katuna M, Smutney OM, et al. Comparison of the effect of adenoviral delivery of three superoxide dismutase genes against hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hum Gene Ther*. 2001;12:2167-77.
91. Chaisson ML, Brooling JT, Ladiges W, Tsai S, Fausto N. Hepatocyte-specific inhibition of NF-kappaB leads to apoptosis after TNF treatment, but not after partial hepatectomy. *J Clin Invest*. 2002;110:193-202.
92. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74:1124-36.
93. Matsumoto K, Honda K, Kobayashi N. Protective effect of heat preconditioning of rat liver graft resulting in improved transplant survival. *Transplantation*. 2001;71:862-8.
94. Ito K, Ozasa H, Sanada K, Horikawa S. Doxorubicin preconditioning: a protection against rat hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology*. 2000;31:416-9.
95. Bilzer M, Jaeschke H, Vollmar AM, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol*. 276:1137G-44.
96. Peralta C, Leon OS, Xaus C, et al. Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: antioxidant-prooxidant balance. *Free Radic Res*. 1999;31:191-6.
97. Olson RD, Mushlin PS. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *FASEB J*. 1990;4:3076-86.
98. Fried T, Aronoff GR, Benabe JE, et al. Renal and hemodynamic effects of atrial natriuretic peptide in patients with cirrhosis. *Am J Med Sci*. 1990;299:2-9.
99. 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.
100. 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;238:843-52.