



Revisión de conjunto

Fisiopatología de la lesión hepática por isquemia-reperfusión

José Ángel Ildelfonso* y Javier Arias-Díaz

Departamento de Cirugía, Hospital Clínico San Carlos, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 23 de abril de 2009

Aceptado el 10 de noviembre de 2009

On-line el 8 de enero de 2010

Palabras clave:

Isquemia hepática
Lesión por reperfusión
Células de Kupffer
linfocitos T
Neutrófilos
Citocinas
Especies reactivas de oxígeno
Óxido nítrico

Keywords:

Liver ischemia
Reperfusion injury
Kupffer cells
T lymphocytes
Neutrophils
Cytokines
Reactive oxygen species
Nitric oxide

R E S U M E N

El fenómeno de isquemia-reperfusión subyace a la lesión hepática que acontece en situaciones clínicas tales como la cirugía de resección hepática, el trasplante hepático y los estados de shock. Esta lesión se ha atribuido clásicamente a la acción deletérea conjunta de neutrófilos y especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, diversos estudios llevados a cabo en la última década han mostrado un papel cada vez más relevante de los linfocitos T en los fenómenos de isquemia-reperfusión, que activan el reclutamiento de células inflamatorias y causan daño en los tejidos afectados. El objeto de esta revisión es mostrar los mecanismos moleculares y celulares implicados en la fisiopatología de esta lesión.

© 2009 AEC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Pathophysiology of liver ischemia—Reperfusion injury

A B S T R A C T

Hepatic ischemia-reperfusion injury is an underlying complication that occurs in clinical conditions such as hepatic resection surgery, liver transplantation and the states of shock. Such injury has classically been attributed to the joint deleterious action of both neutrophils and reactive oxygen species. However, there is increasing evidence that T lymphocytes are also key players in the acute reperfusion injury of diverse organs. They seem to act mainly by promoting the recruitment of inflammatory cells. The purpose of this review is to summarize the molecular and cellular mechanisms that participate in the pathophysiology of liver reperfusion injury.

© 2009 AEC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: joseangelildelfonso@hotmail.com (J.Á. Ildelfonso)

Introducción

La isquemia-reperfusión (I-R) hepática es causa de una significativa morbimortalidad en 3 situaciones principales:

1. En caso de resecciones hepáticas mayores (acompañadas en muchas circunstancias de una reducción completa del flujo sanguíneo mediante la maniobra de Pringle)^{1,2}.
2. En el trasplante hepático, llevado a cabo en hígados que han tenido un período variable de isquemia fría, con temperaturas entre 1-4 °C durante la preservación del injerto^{3,4}. La lesión por I-R está estrechamente relacionada con el desarrollo de fallo primario del injerto (ocurre en menos del 5% de los trasplantes) y con la disfunción primaria de éste (ocurre en el 10-30% de los casos)⁵ debido a lesión celular y de la matriz extracelular⁶, lo que ocasiona una mayor incidencia de rechazo inmunitario y favorece la pérdida del hígado trasplantado^{7,8}.
3. Cuando se producen situaciones que originan hipoxia sistémica o bien aquellas que implican un bajo flujo sanguíneo, da como resultado una insuficiente perfusión hepática. Dentro de este grupo se pueden incluir las siguientes entidades: shock séptico, hipovolémico o cardiogénico⁹, en cirugía cardiovascular con circulación extracorpórea¹⁰, cirugía laparoscópica^{11,12} y en el síndrome compartimental abdominal¹³.

Los 2 tipos celulares más afectados por la lesión isquémica son los siguientes: a) los hepatocitos, con mayor sensibilidad a la isquemia caliente, y b) las células endoteliales sinusoidales a la isquemia fría, de tal forma que después de 48 h de preservación del hígado seguidas de perfusión, el 40% de las células endoteliales no son viables, lo que ocasiona daño sinusoidal y las consiguientes alteraciones en la microcirculación, lo que da como resultado lesión hepatocitaria y disfunción del órgano¹⁴.

Como consecuencia de la hipoxia, se altera la función de la cadena respiratoria mitocondrial y se reducen las enzimas mitocondriales, por lo que se produce la inhibición del proceso de fosforilación oxidativa con la subsiguiente reducción en la síntesis del ATP¹⁵.

Esta reducción del ATP celular ocasiona alteraciones en el transporte de iones a través de la membrana. La inhibición del ATP-asa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ provoca la entrada de sodio intracelular y se acumula en la célula, con el correspondiente edema celular y muerte¹⁶. Además se produce un aumento en el calcio citosólico, lo que provoca la activación de las fosfolipasas de la membrana celular y se produce la degradación de los fosfolípidos y la disrupción de esta membrana¹⁷. Por tanto, la acumulación de calcio intracelular está estrechamente implicada en el desarrollo de la lesión isquémica y se considera de crucial importancia en la evolución a daño irreversible¹⁸. Este aumento de calcio desempeña un importante papel en la producción de radicales libres de oxígeno (O_2) consecutivos a la perfusión, mediante la activación de la xantina oxidoreductasa¹⁹.

La lesión de las células del hígado, después de cualquier tipo de isquemia, se produce fundamentalmente en el

período de perfusión, cuando se restablece el aporte de O_2 y elementos sanguíneos.

Durante los últimos 20 años se ha mantenido la discusión sobre los mecanismos moleculares de la lesión por perfusión. Se aceptó que cualquier estrés oxidativo postisquémico conducía a la muerte celular por peroxidación lipídica. Sin embargo, la peroxidación lipídica es cuantitativamente insuficiente para explicar la grave lesión celular durante la perfusión²⁰.

Etapas lesionales en el daño hepático por perfusión

En la fisiopatología de la lesión por I-R está implicada una compleja red de mecanismos intrahepáticos y extrahepáticos. La evidencia experimental muestra que existen 2 fases distintas en la lesión hepática por perfusión:

1. *Fase precoz o aguda*: comprende en el tiempo las primeras 3 a 6 h después de la perfusión. El principal acontecimiento en esta fase es la activación de las células de Kupffer^{21,22}. Esta activación se lleva a cabo por la acción previa de componentes activados del sistema del complemento, el reclutamiento y la activación de los linfocitos T CD4^{+23} .
2. *Fase tardía o subaguda*: se caracteriza por infiltración masiva de neutrófilos, alcanza su máximo a las 18-24 h de la perfusión. Estos neutrófilos activados liberan especies reactivas de O_2 (ERO) y proteasas, causantes ambos del estrés oxidativo y de la lesión hepatocelular que se produce en esta fase de la lesión por perfusión^{24,25}, que supera en gravedad a la de la fase precoz. El secuestro de polimorfonucleares (PMN) en el hígado tras I-R es tan acusado que la reducción aguda de su recuento periférico se ha propuesto como marcador intraoperatorio precoz de la lesión por perfusión del injerto hepático²⁶.

El reclutamiento de PMN se debe a una compleja serie de mecanismos secundarios a la isquemia, tanto en el parénquima hepático como en sus vasos, que alteran las características adherentes de los PMN. Entre estos cambios pueden desempeñar un papel importante:

- a) La liberación de factores quimiotácticos tales como las ERO por parte del endotelio o los hepatocitos²⁷ y por parte de los propios PMN activados²⁸, que perpetuarían de este modo el quimiotactismo de células proinflamatorias.
- b) La producción de mediadores inflamatorios tales como el factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa²⁸⁻³⁰, la interleucina (IL)-1³¹ y el factor activador plaquetario³² por parte de las células de Kupffer o por los propios hepatocitos³³.
- c) Cambios en la expresión por parte de las células endoteliales de antígenos de superficie tales como moléculas de adhesión intercelular y complejo mayor de histocompatibilidad clase II³⁴.
- d) Lesión del lecho microvascular, que crean fenómenos de «ausencia de reflujo», que pueden atrapar PMN y prolongar la situación de isquemia³⁵.

Por otro lado, es indudable que los PMN representan un papel central en la I-R. La activación endotelial producida por

citocinas y ERO aumenta la adherencia endotelial hacia PMN, lo que favorece la producción local de proteasas y más ERO que alteran la microcirculación e incrementan la lesión^{36,37}.

Aunque se han diseñado diversos estudios con el fin de desentrañar los mecanismos de selección de PMN tras la I-R hepática, este fenómeno sigue sin conocerse por completo.

Mecanismos moleculares de la lesión por reperfusión

Lesión hepática inducida por factor de necrosis tumoral α

En el hígado el TNF- α desempeña un papel dual, ya que no sólo actúa como un mediador de muerte celular, sino que también induce proliferación hepatocitaria y regeneración hepática³⁸.

La inhibición de la señal del TNF- α por antisuero anti-TNF o mediante inactivación genética del receptor 1 del TNF atenúa la lesión hepática por reperfusión y prolonga la supervivencia en ratones. Varias vías de señalización intracelulares se inducen después de la I-R, incluyendo el factor nuclear κ -B y la Jun N-terminal Kinase (JNK). Se ha demostrado que al bloquear la producción hepática de ERO por sobreexpresión de superóxido dismutasa-1 se puede prevenir casi por completo la activación de la JNK hepática y la producción de la correspondiente lesión, lo que indica un papel importante de las ERO en la activación de la JNK y la lesión por I-R^{29,39}. Por tanto, después de la I-R hepática, las células de Kupffer generarían ERO, las que, a su vez, activarían la JNK y aumentaría la secreción de varias quimiocinas y citocinas incluyendo el TNF- α . Este TNF liberado por las células de Kupffer puede a su vez activar a los receptores de TNF de los hepatocitos para inducir a la JNK y a las cinasas de I κ B y la producción de más ERO. Mientras que las ERO y la JNK producen la muerte celular de los hepatocitos, la activación de las cinasas de I κ B favorece la infiltración leucocitaria del hígado³⁰.

Recientes estudios que utilizan hígados perfundido ex vivo indican que, en las situaciones clínicas habitualmente asociadas a hiperproducción hepática de TNF- α , el causante más probable de la liberación endógena de esta citocina sería el cambio en el flujo sanguíneo a través del lecho vascular hepático, más que la isquemia o reperfusión en sí mismas. Además, este incremento en el TNF- α se ha visto asociado de hecho a una mejora transitoria en la función hepática⁴⁰ e indicaría que la disfunción hepática secundaria a la reperfusión se debería a mecanismos moleculares alternativos, probablemente la generación de ERO. Por tanto, a pesar de la abundancia de resultados experimentales al respecto, el verdadero papel del TNF- α en la lesión hepática por I-R permanece aún por definirse.

Especies reactivas de oxígeno en la lesión hepática por isquemia-reperfusión

Aunque el O₂ es la molécula más importante para el mantenimiento de la vida, es también la fuente principal para la formación de radicales libres debido a su alta disponibilidad. Los radicales biológicamente relevantes son

el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico (NO). En condiciones normales alrededor del 1 al 3% del O₂ que se metaboliza en la mitocondria se convierte en anión superóxido⁴¹.

Otras especies son intermedias en el metabolismo de O₂ y del NO pero no son radicales, ya que no contienen electrones desapareados. Estas especies intermedias junto con los radicales libres se denominan, respectivamente, ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN)⁴².

Los ejemplos más representativos de ERO no radicales son el peróxido de hidrógeno y el ácido hipocloroso. En el caso de las ERN el no radical más representativo es el peroxinitrito⁴³.

Las ERO y las ERN son la causa de la lesión hepática inducida por I-R, al menos en parte, con concomitante consumo de antioxidantes endógenos^{25,44}.

Bajo condiciones de estrés oxidativo, la mitocondria es el principal lugar de producción de grandes cantidades de superóxido. Este estrés puede conducir, en su fase final, a la formación de poros de permeabilidad transitoria mitocondrial y provocar la rotura de la membrana mitocondrial y la muerte celular⁴⁵.

El acúmulo de neutrófilos activados dentro del parénquima hepático causa daño tisular a través de la producción de ERO y la liberación, por los gránulos azurófilos, de proteasas, fundamentalmente elastasa y catepsina G. En condiciones normales, el NADPH (fosfato de nicotinamida adenosín dinucleótido) oxidada existe como subunidades inactivas localizadas en la membrana celular y en el citoplasma. La activación celular origina translocación de las subunidades citosólicas a la membrana celular y da como resultado un complejo multimérico que exhibe actividad oxidasa. La enzima activa oxida el NADPH y el electrón liberado reduce el O₂ molecular, con lo que se forma un anión superóxido⁴⁶. La reducción del anión superóxido origina peróxido de hidrógeno que puede difundir al interior de los hepatocitos y generar estrés oxidativo, a menos que la glutatión peroxidasa que usa al glutatión como donante de electrones lo detoxifique.

Por otra parte, la mieloperoxidasa secretada por los gránulos azurófilos de los neutrófilos genera ácido hipocloroso, que, después de difundir al interior de los hepatocitos, puede formar clorinato de tirosina, residuo de proteínas intracelulares o generar otras proteínas modificadas por ácido hipocloroso³⁶.

En mamíferos, el sistema xantina-oxidasa (XO) se considera una de las mayores fuentes de generación de ERO tras lesión por I-R⁴⁷ y es muy abundante tanto en el hígado como en el intestino⁴⁸. Durante la fase hipóxica de la I-R se acumula hipoxantina debido a la depleción del ATP, ya que disminuye el nivel total de energía. En un proceso paralelo, la hipoxia activa las enzimas proteolíticas que convierten a la xantina-deshidrogenasa en XO⁴⁹. Los crecientes niveles de XO oxidan la hipoxantina a urato una vez que se recupera el flujo sanguíneo en la fase de reperfusión. En esta reacción molecular, el O₂ se transforma en radicales superóxidos⁵⁰.

Aunque la mayor parte de la XO se encuentra en las células endoteliales, se ha comprobado la existencia de XO en otras zonas del organismo, lo que contribuye a la formación de ERO en lugares distales al sitio inicial de la lesión por I-R. La importancia del papel que desempeña la XO circulante se

pone de manifiesto por el efecto protector que ejercen los scavengers (barrenderos) de los radicales libres, tales como la enzima superóxido dismutasa y la catalasa⁵¹.

Por último, se estima que los peroxisomas son causantes del 10-30% del consumo de O₂ total celular en el hígado y son importantes lugares de producción de ERO. Tanto los sistemas productores de ERO (XO y sistema de hidroxilación del citocromo P450) como los sistemas antioxidantes (catalasa/enzima superóxido dismutasa) se localizan en los peroxisomas^{52,53}, y estos orgánulos podrían desempeñar un papel significativo en la modulación del estado redox de la célula⁵⁴.

En la lesión hepática por I-R las ERO son causantes de las siguientes acciones:

1. Aumento de la expresión de genes proinflamatorios (TNF-alfa, IL-1, IL-8 o moléculas de adhesión celular)^{46,55}.
2. Inducción de los factores de transcripción: factor nuclear kappa-B y activador de proteína-1^{56,57}.
3. Lesión celular directa mediante oxidación y degradación proteica, peroxidación lipídica y lesión del ADN²⁵.
4. Inducción directa y regulación de la muerte celular, tanto apoptótica como necrótica⁵⁸.
5. Inactivación de antiproteasas²⁵.
6. Inducción de genes protectores de estrés en los hepatocitos⁵⁹.
7. Formación de mediadores implicados en la regulación del flujo sanguíneo sinusoidal y la regeneración hepática⁶⁰.

El NO es un radical sintetizado mediante oxidación de la L-arginina por la nitrógeno sintasa (NOS). Existen 2 isoformas de NOS en el hígado: la NOS endotelial (eNOS) y la NOS inducible (iNOS). La eNOS se expresa constitutivamente, y su actividad es dependiente del calcio y la calmodulina⁶¹. Las células endoteliales, los hepatocitos y las células de Kupffer sintetizan la iNOS y su actividad es independiente del calcio. La iNOS no se encuentra constitutivamente presente en el hígado normal, pero puede inducirse por mediadores proinflamatorios tales como citocinas y lipopolisacárido o durante I-R, shock, traumatismo o infección, y dan lugar a la producción de grandes cantidades de NO.

Bajo condiciones fisiológicas solamente la eNOS está presente en el hígado y los niveles bajos de NO producido regulan la perfusión hepática, previenen la adhesión plaquetaria y la trombosis, el acúmulo de células PMN y la secreción de mediadores inflamatorios⁶². El NO induce vasodilatación a nivel sinusoidal y presinusoidal y mantiene un equilibrio con vasoconstructores tales como la endotelina⁶³.

La inducción de iNOS puede tener tanto efectos tóxicos como protectores. Los efectos dependen del tipo de agresión, el nivel y la duración de la expresión de iNOS y la producción simultánea de anión superóxido⁶⁴.

En la I-R hepática la expresión del ARN mensajero de iNOS comienza una hora después de la reperusión, con actividad iNOS aumentada 5 h posreperusión⁶⁵. Diversos estudios han mostrado que, mediante la inhibición de iNOS con un inhibidor específico, podría prevenirse la lesión hepática por I-R en el hígado de la rata^{66,67}.

Algunos de los resultados publicados sobre el efecto de iNOS en la lesión hepática por I-R son contradictorios.

Mientras unos estudios indican que la expresión de iNOS tiene efectos perjudiciales sobre la función hepática⁶⁸, otros autores indican que es beneficiosa⁶⁹, e incluso que no tiene efecto alguno⁷⁰.

Papel de los linfocitos en la lesión hepática por isquemia-reperusión

Se calcula que un hígado humano contiene alrededor de 10¹⁰ linfocitos, que se encuentran tanto dispersos entre los hepatocitos como en los tractos portales. Existe evidencia de un papel patogénico de estos linfocitos pasajeros en la lesión por reperusión tras isquemia fría⁷¹. Sin embargo, no está claro el papel de los linfocitos residentes frente a los linfocitos periféricos ni la interrelación entre éstos. Se sabe que los linfocitos circulantes de la rata poseen propiedades similares a los PMN humanos, en el sentido de liberar proteasas y ERO⁷². Se ha observado adherencia de linfocitos circulantes a los sinusoides hepáticos precozmente tras la reperusión, posiblemente reclutados a través de un aumento en la expresión de moléculas de adhesión por parte del endotelio⁷³, y a estos linfocitos se les ha atribuido un papel importante en el deterioro de la función hepática tras períodos prolongados de isquemia fría⁷². Además, ratas esplenectomizadas previamente a la isquemia hepática muestran disminución en la infiltración por PMN y protección del hígado frente a los efectos de la reperusión⁷⁴.

Existe abundante información acerca de cómo las células T y B pueden interaccionar durante la respuesta inmunitaria y se ha observado una participación de los linfocitos B en la lesión por I-R en el músculo esquelético⁷⁵, el intestino⁷⁶ y el riñón^{77,78}. Sin embargo, es en el año 1997 cuando se produce una aportación que abre una nueva frontera en el conocimiento de la fisiopatología de la lesión por I-R. Zwacka et al⁷⁹ describieron que la fase aguda se inicia con la activación previa de los linfocitos T CD4⁺, y que es este hecho el que pone en marcha toda la sucesión de acontecimientos que se producen en esta primera etapa lesional y que a su vez desencadena la subsiguiente fase subaguda. Mediante la utilización de ratones desnudos («nude»), genéticamente definidos con déficit de linfocitos T, se observó una significativa reducción de esta respuesta inflamatoria en el ratón nu/nu, comparado con el ratón BALB/c a los que se les ha inyectado las cepas BALB/c generadoras de tumores, linfocito T competente, y se comprobaron los niveles séricos inferiores de aminotransferasa glutámico pirúvica y menor porcentaje de necrosis hepatocelular e infiltración neutrofilica en los primeros. En el mismo estudio se pudo comprobar que el efecto protector se reproducía con depleción de linfocitos T CD4⁺, pero no se observó este efecto cuando la depleción afectó a los linfocitos T CD8⁺. Además, la entrada en el hígado de los linfocitos T CD4⁺ después de la isquemia ocurrió dentro de la primera hora de la reperusión, lo que indica que este tipo celular actúa como mediador de procesos iniciales en la activación de la cascada inflamatoria subaguda. Este efecto no se vio con la entrada en el hígado de las células T CD8⁺, lo que indicó que las células T CD4⁺ eran un importante mediador en la respuesta inflamatoria inducida por la I-R.

Los autores del estudio descrito⁷⁹ avanzaron una hipótesis acerca de cómo se sucederían los acontecimientos tras I-R hepática, que lograra explicar los hallazgos obtenidos. En primer lugar, el propio estímulo de la lesión por I-R produciría la directa activación de los linfocitos T CD4⁺ residentes en el hígado. Una vez activados, los linfocitos pueden segregar una serie de citocinas, tales como IFN- γ (interferón gamma), TNF- β (factor de necrosis tumoral beta) y GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), que tanto directa como indirectamente (a través de las citocinas secundarias secretadas por las células de Kupffer) activarían los neutrófilos para infiltrar el hígado. El estímulo de la I-R podría activar directamente las células de Kupffer dentro del hígado, que a su vez activarían a las células T CD4⁺ a través de las citocinas secretadas y, por tanto, existiría una activación recíproca entre las células de Kupffer y los linfocitos T CD4⁺ durante la I-R hepática⁸⁰.

Posteriormente han ido apareciendo diversos trabajos que confirman la importancia de los linfocitos T CD4⁺ en el reclutamiento de neutrófilos en la lesión hepática por I-R. Le Moine et al⁷¹ encontraron que los linfocitos T residentes en el hígado desempeñan un papel fundamental en los acontecimientos precoces después de la reperfusión de hígados preservados en frío. Anselmo et al⁸¹ observaron la reducción de la lesión hepática por I-R a través de la inhibición de la infiltración de los linfocitos T en isquemia caliente mediante el tratamiento previo con FTY720 (2-amino-2-[2-(4-octifenil)etil]-1,3-hidrocloruro de propanediol).

Caldwell et al⁸² observaron que después de la I-R, los linfocitos T CD4⁺ se reclutaron muy rápidamente en el hígado, se produjo el pico máximo dentro de la primera hora de la reperfusión y se mantuvo un número aumentado de linfocitos T CD4⁺ después de 4 h, lo que indica atrapamiento o infiltración de éstas células en el hígado. Sin embargo, no encontró evidencia de reclutamiento de linfocitos T CD8⁺ en ningún momento de la I-R, como, por otra parte, ya habían constatado otros autores⁷⁹.

Clásicamente los linfocitos T CD4 se han diferenciado funcionalmente en células Th1 (que producen INF- γ , linfotoxina y TNF- α) y Th2 (que producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13)^{83,84}. Posteriormente se ha añadido a estas subpoblaciones una nueva denominada Th17^{85,86}, con efectos sobre la infiltración de PMN. Esta subpoblación se ha implicado sobre todo en la defensa de superficies epiteliales frente a patógenos y desempeña presumiblemente un papel secundario en la lesión hepática por reperfusión. Existen datos que indican que un patrón inflamatorio de predominio Th1 incrementa la lesión por reperfusión, mientras que el patrón Th2 muestra un efecto protector frente a ésta⁸⁷; es pues el equilibrio Th1/Th2 el que determina en gran medida las consecuencias de la I-R⁸⁸.

Conclusión

La lesión hepática por I-R representa un proceso global que afecta a diversas vías, tanto moleculares como celulares. La inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias y de ERO seguirán siendo estrategias prioritarias en el desarrollo

de tratamientos contra la lesión por I-R hepática, si bien deberán reconsiderarse algunos aspectos.

Un delicado equilibrio entre células linfoides con función activadora de los procesos inflamatorios y otras con capacidad para inhibirlos parece desempeñar un papel decisivo en la lesión secundaria a la reperfusión de diversos órganos, incluyendo el hígado. Los estudios encaminados a definir de una forma precisa esta sucesión de acontecimientos tendrán una aplicación clínica de vital importancia, ya que permitirán diseñar estrategias de protección que potencien y mejoren las ya existentes, facilitarán la prevención de esta lesión y evitarán sus graves consecuencias.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Financiación

La ayuda BFU2007-65520 del Ministerio de Ciencia e Innovación ha financiado en parte este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pringle J. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Annals of Surgery*. 1908;48:541-9.
2. Liu DL, Jeppsson B, Hakansson CH, Odselius R. Multiple-system organ damage resulting from prolonged hepatic inflow interruption. *Archives of Surgery*. 1996;131:442-447.
3. 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.
4. Deschenes M, Belle SH, Krom RA, Zetterman RK, Lake JR. Early allograft dysfunction after liver transplantation: A definition and predictors of outcome. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Transplantation*. 1998;66:302-10.
5. 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.
6. Huet P-M, Nagaoka MR, Desbiens G, Tarrab E, Brault A, Bralet M-P, et al. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology*. 2004;39:1110-9.
7. Fellstrom B, Akuyrek LM, Backman U, Larsson E, Melin J, Zezina L. Postischemic reperfusion injury and allograft arteriosclerosis. *Transplantation Proceedings*. 1998;30:4278-80.
8. Busquets J, Serrano T, Figueras J, Ramos E, Torras J, Rafecas A, et al. Influence of donor postreperfusion changes on graft evolution after liver transplant. *Transplantation Proceedings*. 2002;34:252-3.
9. Yamakawa Y, Takano M, Patel M, Tien N, Takada T, Bulkley GB. Interaction of platelet activating factor, reactive oxygen species generated by xanthine oxidase, and leukocytes in the generation of hepatic injury after shock/resuscitation. *Annals of Surgery*. 2000;231:387-98.
10. Okano N, Miyoshi S, Owada R, Fujita N, Kadoi Y, Saito S, et al. Impairment of hepatosplanchnic oxygenation and increase of serum hyaluronate during normothermic and mild hypother-

- mic cardiopulmonary bypass. Anesthesia and Analgesia. 2002;95:278-86 [tabla de contenidos].
11. Glantzounis GK, Tselepis AD, Tambaki AP, Trikalinos TA, Manataki AD, Galaris DA, et al. Laparoscopic surgery-induced changes in oxidative stress markers in human plasma. *Surgical Endoscopy*. 2001;15:1315-9.
 12. Glantzounis GK, Tsimaris I, Tselepis AD, Thomas C, Galaris DA, Tsimoyiannis EC. Alterations in plasma oxidative stress markers after laparoscopic operations of the upper and lower abdomen. *Angiology*. 2005;56:459-65.
 13. Rezende-Neto JB, Moore EE, Masuno T, Moore PK, Johnson JL, Sheppard FR, et al. The abdominal compartment syndrome as a second insult during systemic neutrophil priming provokes multiple organ injury. *Shock*. 2003;20:303-308.
 14. Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: Mechanisms and novel therapeutic strategies. *Journal of Hepatology*. 2000;32:508-15.
 15. González-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *The Journal of Clinical Investigation*. 1993;91:456-64.
 16. Blum H, Osbakken MD, Johnson Jr RG. Sodium flux and bioenergetics in the ischemic rat liver. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1991;18:348-57.
 17. Dhar DK, Takemoto Y, Nagasue N, Uchida M, Ono T, Nakamura T. FK506 maintains cellular calcium homeostasis in ischemia-reperfusion injury of the canine liver. *The Journal of Surgical Research*. 1996;60:142-6.
 18. Farber JL. The role of calcium in cell death. *Life Sciences*. 1981;29:1289-95.
 19. Ishii K, Suita S, Sumimoto H. Effect of verapamil on conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat liver. *Research in Experimental Medicine*. 1990;190:389-99.
 20. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal & Liver Physiology*. 2003;284:G15-G26.
 21. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *The American Journal of Physiology*. 1991;260:G355-G362.
 22. 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.
 23. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look. *Experimental & Molecular Pathology*. 2003;74:86-93.
 24. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *New England Journal of Medicine*. 1989;320:365-76.
 25. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. [Resumen] [86 refs]. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2000;15:718-24.
 26. Ardizzone G, Stratta C, Valzan S, Crucitti M, Gallo M, Cerutti E. Acute blood leukocyte reduction after liver reperfusion: A marker of ischemic injury. *Transplantation Proceedings*. 2006;38:1076-7.
 27. Galaris D, Barbouti A, Korantzopoulos P. Oxidative stress in hepatic ischemia-reperfusion injury: The role of antioxidants and iron chelating compounds. *Current Pharmaceutical Design*. 2006;12:2875-90.
 28. Taniguchi M, Uchinami M, Doi K, Yoshida M, Sasaki H, Tamagawa K, et al. Edaravone reduces ischemia-reperfusion injury mediators in rat liver. *Journal of Surgical Research*. 2007;137:69-74.
 29. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell Jr DA. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *The Journal of Clinical Investigation*. 1990;85:1936-43.
 30. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of liver injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: Role of IKK, JNK, and ROS pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal & Liver Physiology*. 2006;290:G583-9.
 31. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *The Journal of Surgical Research*. 1994;57:253-8.
 32. Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology*. 1992;16:1236-40.
 33. Husted TL, Lentsch AB. The role of cytokines in pharmacological modulation of hepatic ischemia/reperfusion injury. *Current Pharmaceutical Design*. 2006;12:2867-73.
 34. Scoazec JY, Durand F, Degott C, Delautier D, Bernuau J, Belghiti J, et al. Expression of cytokine-dependent adhesion molecules in postreperfusion biopsy specimens of liver allografts. *Gastroenterology*. 1994;107:1094-102.
 35. Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: Evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology*. 1992;15:507-14.
 36. Jaeschke H. Mechanisms of liver injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *American Journal of Physiology*. 2006;290:G1083-8.
 37. Ramaiah SK JH. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicologic Pathology*. 2007;35:757-66.
 38. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*. 2003;125:1246-57.
 39. Lehmann TG, Wheeler MD, Schwabe RF, Connor HD, Schoonhoven R, Bunzendahl H, et al. Gene delivery of Cu/Zn-superoxide dismutase improves graft function after transplantation of fatty livers in the rat. *Hepatology*. 2000;32:1255-64.
 40. Pevni D FI, Schwartz D, Schwartz I, Chernichovski T, Kramer A, Ben-Gal Y, et al. New evidence for the role of TNF-alpha in liver ischaemic/reperfusion injury. *Eur J Clin Invest*. 2008;38:649-55.
 41. Nohl H, Gille L, Kozlov A, Staniek K. Are mitochondria a spontaneous and permanent source of reactive oxygen species? *Redox Report*. 2003;8:135-41.
 42. Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: A review. *Liver Transplantation*. 2005;11:1031-47.
 43. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1992;298:446-51.
 44. Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology*. 1999;117:200-10.
 45. Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *The American Journal of Physiology*. 1997;272:C1286-94.
 46. 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.
 47. Saugstad OD, Aasen AO. Plasma hypoxanthine concentrations in pigs. A prognostic aid in hypoxia. *European Surgical Research. Europäische Chirurgische Forschung*. 1980;12:123-9.

48. Saugstad OD. Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: Reoxygenation injury. *Pediatrics*. 1996;98:103-7.
49. Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *The Journal of Biological Chemistry*. 1969;244:3855-63.
50. Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *Journal of Molecular Medicine*. 1999;77:577-92.
51. Adkison D, Hollwarth ME, Benoit JN, Parks DA, McCord JM, Granger DN. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1986;548:101-7.
52. Wanders RJ, Denis S. Identification of superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1992;1115:259-62.
53. Simpson AE. The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *General Pharmacology*. 1997;28:351-9.
54. Pahan K, Smith BT, Singh AK, Singh I. Cytochrome P-450 2E1 in rat liver peroxisomes: Downregulation by ischemia/reperfusion-induced oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 1997;23:963-71.
55. Liu TZ, Lee KT, Chern CL, Cheng JT, Stern A, Tsai LY. Free radical-triggered hepatic injury of experimental obstructive jaundice of rats involves overproduction of proinflammatory cytokines and enhanced activation of nuclear factor kappaB. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 2001;31:383-90.
56. Zwacka RM, Zhang Y, Zhou W, Halldorson J, Engelhardt JF. Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and nuclear factor kappaB independently of IkappaB degradation. *Hepatology*. 1998;28:1022-30.
57. Harada N, Iimuro Y, Nitta T, Yoshida M, Uchinami H, Nishio T, et al. Inactivation of the small GTPase Rac1 protects the liver from ischemia/reperfusion injury in the rat. *Surgery*. 2003;134:480-91.
58. Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology*. 2002;122:202-10.
59. Bauer M, Bauer I. Heme oxygenase-1: Redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2002;4:749-58.
60. Paxian M, Rensing H, Rickauer A, Schonhofen S, Schmeck J, Pannen BH, et al. Kupffer cells and neutrophils as paracrine regulators of the heme oxygenase-1 gene in hepatocytes after hemorrhagic shock. *Shock*. 2001;15:438-45.
61. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radical Research Communications*. 1991;15:277-84.
62. Mittal MK, Gupta TK, Lee FY, Sieber CC, Groszmann RJ. Nitric oxide modulates hepatic vascular tone in normal rat liver. *The American Journal of Physiology*. 1994;267:G416-22.
63. McCuskey RS. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver*. 2000;20:3-7.
64. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological Reviews*. 2001;53:135-59.
65. Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, et al. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999;261:917-922.
66. Chida N, Hirasawa Y, Ohkawa T, Ishii Y, Sudo Y, Tamura K, et al. Pharmacological profile of FR260330, a novel orally active inducible nitric oxide synthase inhibitor. *European Journal of Pharmacology*. 2005;509:71-6.
67. Tsuchihashi S, Kaldas F, Chida N, Sudo Y, Tamura K, Zhai Y, et al. FK330, a novel inducible nitric oxide synthase inhibitor, prevents ischemia and reperfusion injury in rat liver transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2006;6:2013-22.
68. Meguro M, Katsuramaki T, Nagayama M, Kimura H, Isobe M, Kimura Y, et al. A novel inhibitor of inducible nitric oxide synthase (ONO-1714) prevents critical warm ischemia-reperfusion injury in the pig liver. *Transplantation*. 2002;73:1439-46.
69. Hsu C-M, Wang J-S, Liu C-H, Chen L-W. Kupffer cells protect liver from ischemia-reperfusion injury by an inducible nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Shock*. 2002;17:280-5.
70. Hines IN, Kawachi S, Harada H, Pavlick KP, Hoffman JM, Bharwani S, et al. Role of nitric oxide in liver ischemia and reperfusion injury. *Molecular & Cellular Biochemistry*. 2002;234-235:229-37.
71. Le Moine O, Louis H, Demols A, Desalle F, Demoor F, Quertinmont E, et al. Cold liver ischemia-reperfusion injury critically depends on liver T cells and is improved by donor pretreatment with interleukin 10 in mice. *Hepatology*. 2000;31:1266-74.
72. Clavien PA, Harvey PR, Sanabria JR, Cywes R, Levy GA, Strasberg SM. Lymphocyte adherence in the reperfused rat liver: Mechanisms and effects. *Hepatology*. 1993;17:131-42.
73. Shigematsu T, Wolf RE, Granger DN. T-lymphocytes modulate the microvascular and inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirculation*. 2002;9:99-109.
74. Okuaki Y, Miyazaki H, Zeniya M, Ishikawa T, Ohkawa Y, Tsuno S, et al. Splenectomy-reduced hepatic injury induced by ischemia/reperfusion in the rat. *Liver*. 1996;16:188-94.
75. Weiser MR, Williams JP, Moore Jr FD, Kobzik L, Ma M, Hechtman HB, et al. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *The Journal of Experimental Medicine*. 1996;183:2343-2348.
76. Williams JP, Pechet TT, Weiser MR, Reid R, Kobzik L, Moore Jr FD, et al. Intestinal reperfusion injury is mediated by IgM and complement. *Journal of Applied Physiology*. 1999;86:938-42.
77. Burne-Taney MJ, Ascon DB, Daniels F, Racusen L, Baldwin W, Rabb H. B cell deficiency confers protection from renal ischemia reperfusion injury. *Journal of Immunology*. 2003;171:3210-5.
78. Burne-Taney MJ, Yokota-Ikeda N, Rabb H. Effects of combined T- and B-cell deficiency on murine ischemia reperfusion injury. *American Journal of Transplantation*. 2005;5:1186-93.
79. Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF. CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *The Journal of Clinical Investigation*. 1997;100:279-289.
80. Hanschen M ZS, Krombach F, Khandoga A. Reciprocal activation between CD4+ T cells and Kupffer Cells during hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation*. 2008;86:710-8.
81. Anselmo DM, Amersi FF, Shen X-D, Gao F, Katori M, Lassman C, et al. FTY720 pretreatment reduces warm hepatic ischemia reperfusion injury through inhibition of T-lymphocyte infiltration. *American Journal of Transplantation*. 2002;2:843-9.
82. Caldwell CC, Okaya T, Martignoni A, Husted T, Schuster R, Lentsch AB. Divergent functions of CD4+ T lymphocytes in acute liver inflammation and injury after ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal & Liver Physiology*. 2005;289:G969-76.
83. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;383:787-93.
84. González-Rey E, Chorny A, Delgado M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:52-63.

-
85. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: An effector CD4T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 2006;24:677-88.
86. Reiner SL. Development in motion: Helper T cells at work. *Cell*. 2007;129:33-6.
87. Márques VP, Goncalves GM, Feitoza CQ, Cenedeze MA, Fernandes Bertocchi AP, Damiao MJ, et al. Influence of TH1/TH2 switched immune response on renal ischemia-reperfusion injury. *Nephron*. 2006;104:e48-56.
88. Arias-Díaz J, Ildefonso JA, Muñoz JJ, Zapata A, Jiménez E. Both tacrolimus and sirolimus decrease Th1/Th2 ratio, and increase regulatory T lymphocytes in the liver after ischemia/reperfusion. *Lab Invest*. 2009;89:433-45.