



# Estrategias para proteger el injerto esteatósico en el trasplante hepático

Araní Casillas Ramírez

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



# **Estrategias para proteger el injerto esteatósico en el trasplante hepático**

Tesis Doctoral presentada por

Araní Casillas Ramírez

para optar al título de

DOCTORA EN BIOMEDICINA POR LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Director de Tesis:

Dra. Carmen Peralta Uroz

Tutor:

Dr. Ramon Bartrons Bach

2011

## 1. El hígado

### 1.1 Generalidades

El hígado es una glándula accesoria del aparato gastrointestinal, representa del 2 al 5% del peso corporal en adulto y está situado en el lado superior derecho de la cavidad abdominal, por debajo del diafragma. Es un órgano de importancia vital con múltiples y complejas funciones (**Tabla 1**). Además del papel del hígado en la detoxificación de productos de desecho del metabolismo, también actúa regulando el metabolismo energético al procesar los nutrientes que provienen de la digestión a fin de distribuirlos al resto de los tejidos. Otras funciones importantes del hígado comprenden: la síntesis y secreción de bilis; la síntesis de proteínas y lipoproteínas plasmáticas y factores de coagulación; la detoxificación de fármacos y toxinas; y además, funciones metabólicas como son la síntesis de glucógeno, la gluconeogénesis y también el almacenamiento de glucógeno y de algunas vitaminas y lípidos.<sup>1-3</sup>

Funciones principales del hígado	
<b>Metabolismo de carbohidratos</b>	Captación de glucosa Síntesis y almacenamiento de glucógeno Glucogenolisis y gluconeogénesis
<b>Metabolismo lipídico</b>	Oxidación de ácidos grasos Síntesis de lipoproteínas, colesterol, triglicéridos y fosfolípidos Cetogénesis
<b>Metabolismo proteico</b>	Degradación de aminoácidos Síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y urea
<b>Metabolismo del grupo hemo</b>	Síntesis del grupo hemo y de porfirinógenos
<b>Formación y secreción de bilis</b>	
<b>Inactivación de diversas sustancias tales como tóxicos, esteroides y otras hormonas</b>	
<b>Síntesis de proteínas plasmáticas</b>	Albúmina y Proteínas de fase aguda
<b>Inmunidad</b>	A través de las Células de Kupffer

**Tabla 1.** Resumen de algunas de las funciones más importantes del hígado.

Como la mayoría de las glándulas exocrinas, el hígado está dividido en lóbulos y lobulillos más pequeños mediante una serie de tabiques de tejido conjuntivo. El parénquima hepático está constituido por grupos de células epiteliales, hepatocitos y por un sistema ramificado de conductos. Se puede observar un patrón repetido de áreas más o menos hexagonales en las que los cordones de hepatocitos se disponen de forma radial alrededor de una vena central. En los ángulos de estas zonas poligonales hay una pequeña área triangular formada por tejido conjuntivo que contiene un conducto biliar, una rama de la arteria hepática y una rama de la vena porta. Este complejo se denomina triada portal. Las ramas laterales de estos vasos confluyen en los sinusoides hepáticos, que ocupan los espacios que quedan entre los cordones de hepatocitos y drenan en la vena central. (Figura 1) Por lo tanto, las células hepáticas están expuestas a un gran volumen de sangre que fluye por los sinusoides. Por otro lado, la bilis es secretada de forma continua hacia una red de canalículos biliares situados en el interior de los cordones de hepatocitos y fluye hacia los conductos biliares situados en las triadas portales.<sup>1-2</sup>

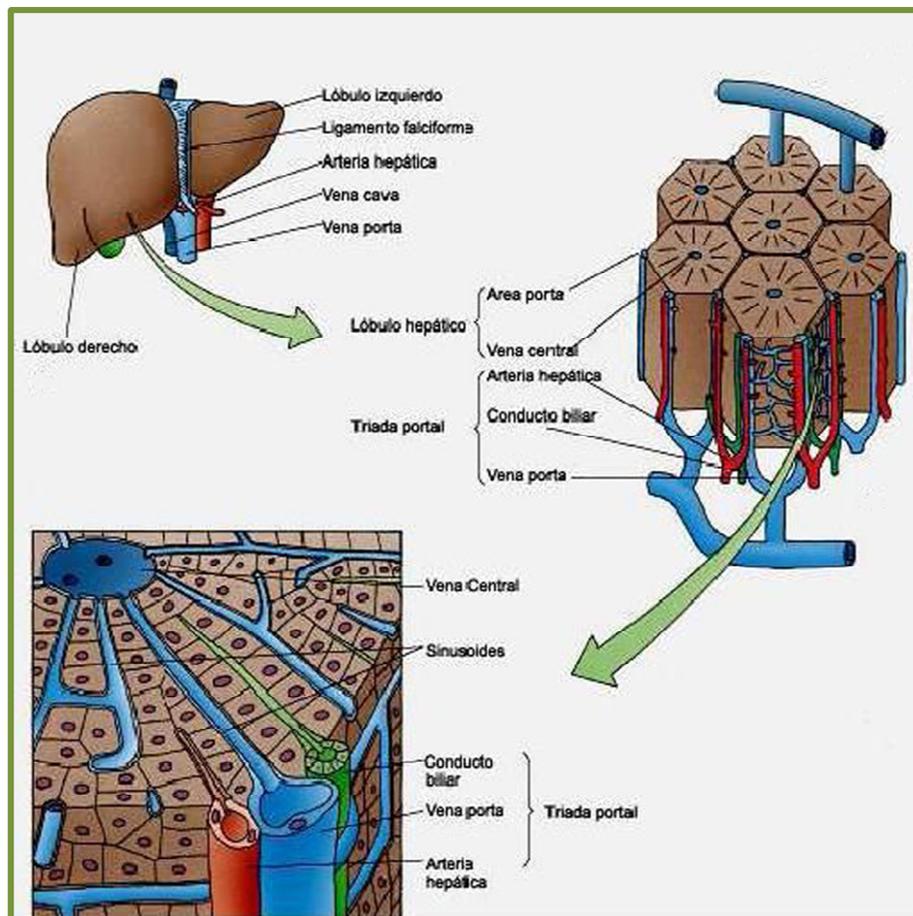


Figura 1. Estructura histológica del hígado.

Actualmente se considera que la unidad estructural y funcional del hígado es el acino hepático (Figura 2). El acino hepático consiste en un área romboidal de hepatocitos cuyo centro es una triada portal y los extremos son dos venas centrales.<sup>1-3</sup> A medida que la sangre arterial se acerca más a las venas centrales, la sangre disminuye su calidad nutritiva, por lo que se distinguen tres zonas en cada acino: La zona 1 linda con el centro del acino y es la primera en recibir oxígeno; la

zona 2 se encuentra en el medio y la zona 3 al lado de la vena centrolobulillar, donde hay mayor proporción de CO<sub>2</sub> y sustancias de desecho, y es la región más expuesta a las toxinas.<sup>1</sup>

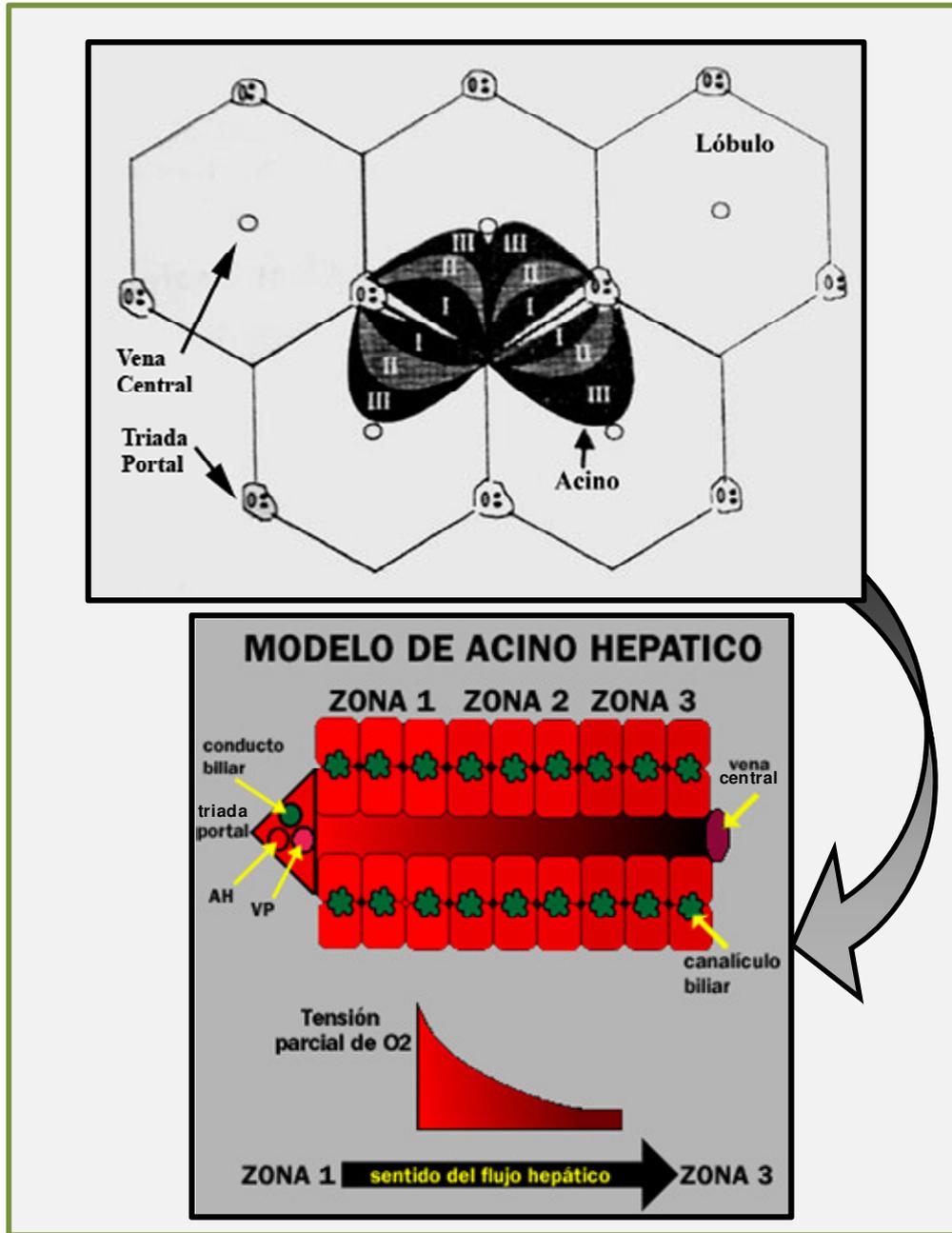


Figura 2. El acino hepático.

A diferencia de cualquier otro órgano, el hígado recibe sangre de dos vías diferentes: la vena porta (aproximadamente 75% del aporte sanguíneo del hígado), que transporta la sangre proveniente del intestino, páncreas y bazo con un bajo contenido de oxígeno y rica en sustancias absorbidas por el intestino, hormonas y otros elementos que se producen en el intestino, bazo y en el páncreas; y la arteria hepática (aproximadamente el 25% del aporte sanguíneo hepático), que transporta sangre rica en oxígeno procedente del corazón (Figura 3). Tanto la sangre proveniente de la vena porta como de la arteria hepática, finalmente alcanzará los sinusoides hepáticos, que es el lugar donde tiene lugar el intercambio entre la sangre y los hepatocitos. Los sinusoides hepáticos tienen una

anchura superior a la de los capilares sanguíneos, y aunque su pared está formada por células endoteliales, hay zonas que permiten el acceso directo del plasma sanguíneo a los hepatocitos. Cada célula de los cordones hepáticos dispuestos radialmente está en contacto, al menos por un costado, con la sangre que fluye por los sinusoides. La sangre de los sinusoides hepáticos sale desde la rama de la vena porta a la entrada de los sinusoides hacia la vena central del lobulillo hepático, que desemboca en las vénulas hepáticas y finalmente en la vena cava inferior justo por debajo del diafragma.<sup>1-3</sup>

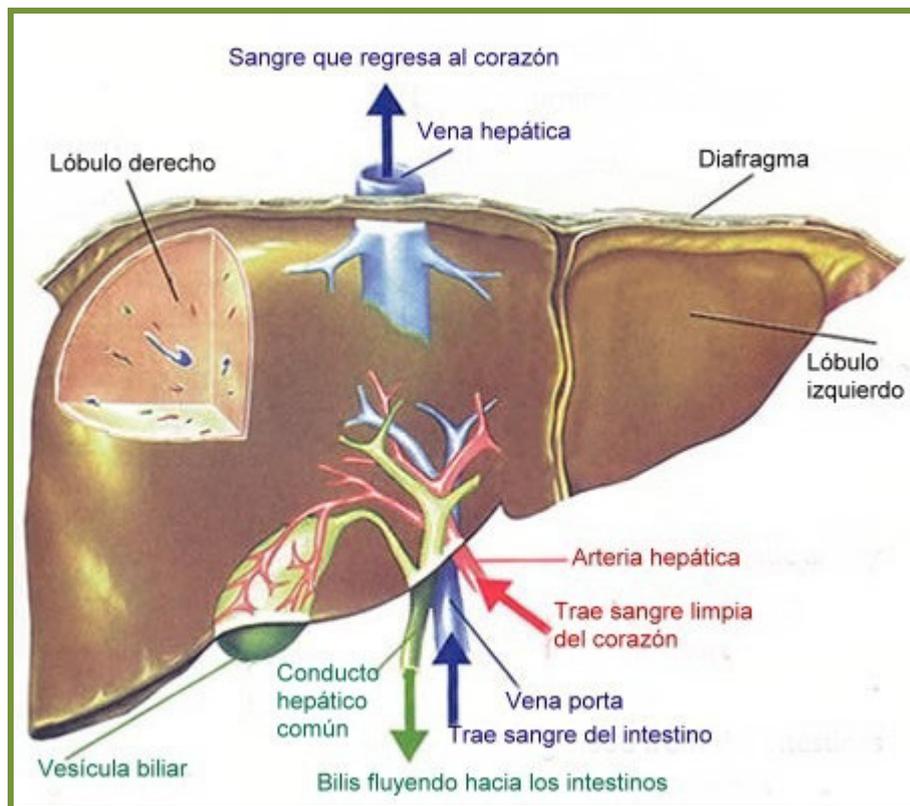


Figura 3. Irrigación sanguínea del hígado.

## 1.2 Células hepáticas

### Hepatocitos

Los hepatocitos son las células que forman el parénquima hepático. A nivel metabólico son una de las células más complejas que existen, y algunas de sus funciones más importantes incluyen: la obtención, almacenamiento y liberación a la circulación sanguínea de un gran número de nutrientes, entre ellos los glúcidos, las proteínas y los lípidos; la síntesis de proteínas plasmáticas, lipoproteínas, ácidos grasos, colesterol, fosfolípidos y glucosa; y la detoxificación de compuestos tóxicos para el organismo.<sup>2</sup>

A causa de la alta tasa metabólica, los hepatocitos tienen un gran número de orgánulos citoplasmáticos. Entre ellos destacan a) el retículo endoplasmático donde se sintetizan proteínas, se realiza el metabolismo lipídico, el metabolismo de la glucosa y la degradación del grupo hemo; b) el aparato de Golgi, donde tiene lugar la síntesis de proteínas, la glicosilación de proteínas, el reciclaje de receptores y la secreción de bilis; c) y las mitocondrias, donde tiene lugar la fosforilación oxidativa y la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP).<sup>3</sup>

### **Células endoteliales**

Las células endoteliales constituyen la pared de los sinusoides hepáticos y están separadas de los hepatocitos por el espacio de Disse. Entre las células endoteliales sinusoidales existen poros o fenestraciones de gran tamaño, de manera que permiten el intercambio de fluidos y macromoléculas entre los sinusoides y el espacio de Disse.<sup>1-3</sup> Las células endoteliales participan activamente en la inflamación, de manera que frente a determinados estímulos pueden liberar diversos mediadores como son interleuquinas y óxido nítrico (NO).<sup>2</sup>

### **Células de Kupffer**

Las células de Kupffer forman la mayor población de macrófagos del organismo, y se encuentran situadas en la superficie de las células endoteliales, emitiendo prolongaciones que se extienden hacia la luz de los sinusoides y entre las células endoteliales subyacentes. Las células de Kupffer pueden reconocer y fagocitar eritrocitos envejecidos o lesionados, y eliminan de la sangre los bacilos que intentan introducirse en la circulación portal después de su paso por los intestinos. La activación de las células de Kupffer puede estar provocada por diferentes estímulos, entre ellos las endotoxinas. Una vez activadas, generan mediadores citotóxicos como son citoquinas, radicales libres de oxígeno (RLO) y proteasas.<sup>2</sup>

### **Células estrelladas**

Las células estrelladas, también conocidas como células de Ito, están localizadas en el espacio de Disse, en estrecho contacto con las células endoteliales, y constituyen el principal almacén de vitamina A del organismo. Las células estrelladas además sintetizan proteínas de la matriz extracelular, son mediadores importantes de procesos de reparación del tejido hepático en diversas patologías hepáticas y poseen capacidad para promover y amplificar la respuesta inflamatoria.<sup>2</sup>

## **2. El trasplante hepático**

El hígado se puede ver afectado por un gran número de enfermedades de fase aguda o crónica que impidan que realice correctamente sus funciones. En ocasiones estas enfermedades son tan graves que limitan la capacidad del hígado para mantener la homeostasis del organismo. El trasplante hepático está indicado en las enfermedades hepáticas progresivas en las que no sean posibles otras medidas terapéuticas, y en las que la supervivencia esperada sea inferior a la que se conseguiría con el trasplante.<sup>5-6</sup> El trasplante hepático ha evolucionado de ser un procedimiento experimental con éxito moderado antes de 1980, hasta convertirse en una operación estándar con tasas de supervivencia muy altas para pacientes que anteriormente tenían mal pronóstico ante una enfermedad hepática avanzada e irreversible. Los avances más importantes que han contribuido a esta evolución son la introducción de nuevos fármacos inmunosupresores, la mejora de la técnica quirúrgica y los avances producidos en la preservación del injerto, sobre todo a raíz de la utilización de la solución de Universidad de Wisconsin (UW) como solución de preservación hepática.<sup>6-8</sup>

No obstante y pese a todos los avances que han contribuido al establecimiento del trasplante hepático como una técnica rutinaria en la práctica clínica, hay todavía bastantes dificultades por resolver. En la actualidad hay un cierto número de pacientes que mueren esperando un hígado

donante. Si bien es cierto que la tasa de donaciones en España es la más alta del mundo, el número de candidatos a trasplante excede al de donantes.<sup>9</sup> Por lo tanto, es muy importante optimizar los recursos disponibles en este campo. Este problema se puede abordar desde dos puntos: por un lado aumentar en lo posible el número de injertos disponibles para ser trasplantados; y por el otro lado intervenir para que el injerto trasplantado funcione correctamente evitando así, recurrir al retrasplante lo que supondría el desaprovechamiento de un órgano (**Figura 4**).

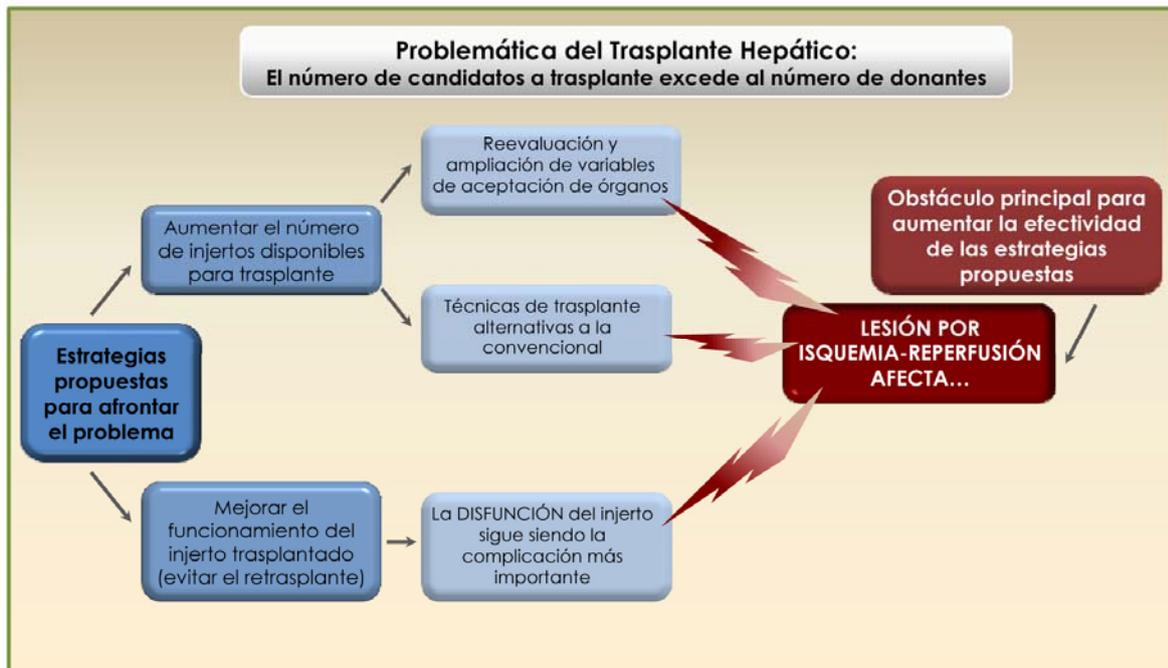


Figura 4. Problemática del trasplante hepático.

## 2.1 Estrategias para aumentar el número de donantes

### Técnicas de trasplante hepático alternativas a la convencional

Con la intención de practicar el trasplante hepático a un mayor número de pacientes, se han optimizado diversas técnicas de trasplante alternativas a la convencional.<sup>3,10</sup> Algunas de ellas se realizan actualmente en la práctica clínica, como son la técnica de Split, el trasplante dominó y el trasplante hepático de donante vivo.

**Técnica de Split.** La técnica de Split o bipartición hepática permite la realización de dos trasplantes hepáticos a partir de un único hígado donante. La frecuencia de esta técnica ha aumentado en los últimos años con resultados satisfactorios. En su inicio esta técnica fue desarrollada por equipos de cirugía pediátrica ante la escasez de donantes de este sector de la población y la necesidad de un escaso volumen hepático, que en líneas generales no sobrepasaba el 20% de la masa hepática de un hígado adulto. De esta forma esta técnica se comenzó a realizar utilizando un mismo injerto que se implantaba en un receptor pediátrico y en otro adulto. Con posterioridad se comenzó a utilizar esta técnica para realizar el trasplante a dos receptores adultos, uno de ellos de peso inferior a 60 kg.<sup>11-13</sup>

**Trasplante dominó.** El trasplante dominó consiste en utilizar como injerto el hígado de un receptor cuya indicación para el trasplante es la polineuropatía amiloidótica familiar.<sup>14,15</sup> La polineuropatía amiloidótica familiar es una enfermedad metabólica crónica, en la que el hígado posee una

estructura y función correcta salvo la síntesis anómala de una proteína denominada transferrina, que provoca el depósito de sustancia amiloide en varios órganos, pero sobre todo en el sistema nervioso autónomo. Los síntomas comienzan a manifestarse entre la segunda y tercera década de la vida, aunque en algunos casos tarda incluso 75 años en aparecer. La utilización de estos injertos procedentes de un donante con polineuropatía amiloidótica familiar estaría indicada en receptores de edad avanzada o en aquellos con tumores hepáticos de mal pronóstico en los que la supervivencia esperada tras el trasplante sea menor que el tiempo de desarrollo de los síntomas de polineuropatía amiloidótica familiar.<sup>16,17</sup>

**Donante vivo.** La técnica del trasplante de donante vivo consiste en la utilización como injertos de segmentos hepáticos que provienen de un donante vivo. Al principio, esta técnica fue utilizada para receptores pediátricos<sup>18</sup> y en 1994 se realizó el primer trasplante hepático procedente del lóbulo derecho de un donante vivo.<sup>19</sup> Actualmente esta modalidad quirúrgica representa una alternativa válida y segura en centros con experiencia en cirugía hepática llegando a representar el 25% del total de los trasplantes realizados.<sup>20</sup> Uno de los beneficios de los injertos de tamaño reducido a partir de donante vivo es obtener un injerto de buena calidad con un tiempo isquémico corto, ya que la cirugía del donante puede ser programada para coincidir en tiempo con la cirugía del receptor. Por otro lado, el mayor problema concerniente a la aplicación del trasplante hepático de donante vivo es la disparidad del tamaño del injerto, lo cual implica una posterior regeneración del injerto hepático de tamaño reducido.<sup>21-24</sup>

### **Reevaluación y ampliación de las variables de aceptación de órganos**

La falta de órganos disponibles para trasplante hepático ha conducido a los centros hospitalarios a ampliar los criterios de aceptación de un órgano para ser trasplantado. Este es el caso de donantes con hipertensión arterial o diabetes mellitus.<sup>3,25-29</sup> Además actualmente se consideran la aceptación de órganos que antes se desechaban para trasplante hepático por presentar un alto riesgo de desarrollar disfunción tras la intervención. Este tipo de órganos son denominados órganos subóptimos o marginales y comprenden injertos de donantes de edad avanzada, de donantes a corazón parado, e injertos hepáticos esteatósicos. Los hígados marginales presentan una mayor susceptibilidad a la lesión por I/R, la cual es inherente a todo tipo de trasplante hepático. Cuando se utilizan para el trasplante injertos hepáticos procedentes de donantes de más de 70 años de edad, la supervivencia del receptor es baja.<sup>30</sup> Además, estos donantes presentan un índice de esteatosis mayor, lo cual exacerba el daño inducido por I/R. El donante a corazón parado fue en el inicio del trasplante hepático la única fuente de órganos hasta que se aceptó el concepto de muerte cerebral. Actualmente se distinguen dos tipos de donantes a corazón parado, controlados y no controlados. Muchos centros descartan el uso de los donantes no controlados (en los que el fallecimiento del donante ocurre en una situación fuera del control hospitalario) puesto que en este tipo de donantes no se puede conocer con exactitud el tiempo en el que el órgano permanece en el interior del organismo sin irrigación sanguínea antes de su extracción (tiempo de isquemia caliente) y las distintas experiencias en trasplante no son muy alentadoras.<sup>31-33</sup> Sin embargo, numerosos estudios muestran que el trasplante de hígado procedente de donantes controlados (en los que el fallecimiento del donante tiene lugar bajo control hospitalario y por lo tanto en los que se puede minimizar el tiempo de isquemia caliente) da lugar a resultados semejantes a los obtenidos con donantes cadavéricos aunque con un mayor riesgo de complicaciones biliares.<sup>34-41</sup> Por lo tanto, la

experiencia en trasplante de hígado con donantes a corazón parado es todavía muy limitada. La utilización de injertos hepáticos esteatósicos para trasplante conlleva un mayor riesgo de disfunción o fallo del injerto comparado con injertos hepáticos sin esteatosis. La esteatosis hepática agrava el problema de la falta de órganos ya que se sabe que entre todos los hígados que no son considerados como aptos para trasplante por sus condiciones patológicas, más del 50% son hígados esteatósicos, de ahí que la esteatosis sea la causa del mayor número de órganos no aptos para trasplante, acentuando así la problemática del banco de órganos.<sup>30</sup>

## **2.2 Disfunción y retrasplante hepático**

Todos los avances llevados a cabo en los últimos años han permitido mejorar significativamente el pronóstico del trasplante hepático, aumentando la supervivencia de los receptores y han convertido al trasplante hepático en la terapia de elección en niños y adultos con enfermedades hepáticas avanzadas sin tratamiento alternativo. De todas formas, pese a las mejoras introducidas, la disfunción del injerto sigue siendo la complicación más importante tras un trasplante hepático.

Cuando esta disfunción ocurre inmediatamente posterior al trasplante hepático, sin causa alguna conocida, se habla de disfunción primaria del injerto (DPI).<sup>42,43</sup> La DPI se puede subdividir en dos grupos: “pobre función inicial del injerto”, que hace referencia a los hígados que logran mantener una función suficiente para evitar la muerte del paciente, y el “fallo primario del injerto (FPI), que engloba a los hígados que no logran mantener con vida al paciente a menos que éste sea retrasplantado.

La lesión por isquemia-reperfusión (I/R) es la causa más común de FPI.<sup>44,45</sup> El tratamiento de elección para el FPI es el retrasplante. El FPI es la segunda causa de retrasplante después de las complicaciones técnicas y el rechazo inmunológico, siendo responsable del 81% de los retrasplantes durante la primera semana después del trasplante hepático.<sup>30</sup> Aunque el retrasplante es factible si se obtiene otro hígado compatible, este hecho supone el desaprovechamiento de hígados para trasplante, acentuando aun más el problema de la falta de órganos.

## **3. La lesión por I/R hepática**

### **3.1 Introducción**

La isquemia hepática ocurre cuando el hígado se ve privado temporalmente de flujo sanguíneo. Al restablecerse el flujo sanguíneo al hígado (reperfusión) se agrava la lesión inducida por la isquemia (lesión por I/R). La lesión por I/R fue reconocida como un desorden patológico clínicamente relevante por Toledo-Pereyra et al. en 1975 realizando estudios en trasplante hepático experimental.<sup>46</sup>

En la práctica clínica tiene lugar la isquemia normotérmica y la isquemia fría, dependiendo de la temperatura a la cual está sometido el hígado cuando tiene lugar la isquemia hepática. Así pues se habla de isquemia normotérmica si el hígado se mantiene a 37°C durante el tiempo en el cual se ve privado del flujo sanguíneo. La lesión por I/R normotérmica es clínicamente relevante en cirugía hepática, trasplante hepático, shock hipovolémico, algunos tipos de daño tóxico hepático,

enfermedad veno-oclusiva y síndrome de Budd-Chiari. Por otro lado, la isquemia fría hace referencia a la situación en la cual el hígado es sometido a una temperatura de 4° C cuando se ve privado de forma temporal del aporte sanguíneo. La lesión por I/R fría ocurre durante la preservación del hígado antes del trasplante y se aplica intencionalmente para reducir la actividad metabólica del injerto mientras el órgano espera a ser implantado. Existen muchas similitudes entre la patología y los mecanismos patogénicos de la lesión por isquemia normotérmica y fría, pero también hay diferencias en los tipos celulares implicados. En los años 80s se demostró que la I/R fría específicamente causaba daño a las células endoteliales sinusoidales. La lesión en las células endoteliales favorece la adhesión leucocitaria y de plaquetas, lo cual induce fallos en la microcirculación hepática. En numerosos modelos experimentales se ha demostrado que el grado de lesión en las células endoteliales se correlaciona con la duración de la isquemia fría. A diferencia de lo que ocurre en condiciones de isquemia fría, la I/R normotérmica afecta a todos los tipos celulares hepáticos, tales como hepatocitos, células endoteliales, macrófagos, leucocitos adherentes y plaquetas.<sup>47</sup>

### **3.2 Relevancia clínica de la lesión por I/R en el trasplante hepático**

El procedimiento estándar para el trasplante hepático se inicia con la extracción del hígado del donante. Antes de su extracción el hígado es perfundido con la solución de preservación UW, a una temperatura de 4°C. En este momento comienza la fase de isquemia fría. A continuación el hígado es extraído del donante y colocado en solución de preservación a bajas temperaturas (2-4°C), con la finalidad de ralentizar al máximo el metabolismo hepático hasta su posterior implante en el receptor. Este periodo de isquemia fría suele durar en la práctica clínica de 6 a 8 horas. Tras este periodo de isquemia fría, el órgano es sometido a un periodo de isquemia normotérmica, que se prolonga desde que el órgano es situado en la cavidad abdominal del receptor hasta que se restablece el flujo sanguíneo en el hígado trasplantado. Este periodo de isquemia normotérmica corresponde al tiempo empleado en realizar la anastomosis de los vasos sanguíneos hepáticos en la intervención quirúrgica. Al restablecerse el flujo sanguíneo en el órgano comienza la fase de reperfusión.<sup>44</sup>

En el trasplante hepático, diversos factores podrían agravar la lesión por I/R. La mayoría de estos factores son controlables eligiendo el injerto adecuado, pero la creciente demanda de trasplantes hepáticos hace necesario el uso de hígados que no son óptimos para ser trasplantados, llamados injertos subóptimos o marginales y que son más susceptibles a los efectos de la I/R.<sup>48,49</sup> De la misma manera, existen factores intraoperatorios que pueden contribuir a la lesión por I/R que tienen que ver con la técnica quirúrgica y hacen referencia a la duración del periodo de isquemia fría y normotérmica sufrida por el injerto, así como con el reducido flujo sanguíneo desde la vena porta o la arteria hepática. La gravedad de la lesión por I/R también tiene que ver con la duración del procedimiento, episodios de hipotensión intraoperatorios y el grado de isquemia esplácnica. Además de lo anterior, la insuficiencia renal en el receptor, la realización de retrasplante, y la politransfusión se han considerado como factores de riesgo por algunos autores.<sup>50</sup> Las alteraciones metabólicas que tienen lugar durante el trasplante (aumento de lactato, citrato, hiperpotasemia, radicales libres de oxígeno, etc.) que se inician al final de la fase de disección y se incrementan tras la reperfusión serán mayores cuanto peor sea la situación general del receptor, y podrían ser causa de disfunción hepática, ya que muchas de estas sustancias deben ser metabolizadas por el nuevo

hígado. También puede ser causa de disfunción hepática los problemas técnicos intraoperatorios que ocasionan una isquemia normotérmica prolongada.<sup>51-56</sup>

La lesión por I/R persiste como una complicación seria en la práctica clínica ya que está asociada con el riesgo de disfunción del injerto y fallo hepático después de la cirugía en el trasplante hepático; además de la insuficiencia pulmonar y del fallo multiorgánico que en ocasiones acompañan a estos cuadros.<sup>30,57,58</sup> Además, pese a los esfuerzos realizados por aumentar la donación de órganos y a pesar de las estrategias adoptadas que han permitido aumentar el número de órganos disponibles para ser trasplantados, éstas siguen siendo insuficientes para resolver el problema de la falta de órganos. El principal obstáculo para que las estrategias que tienen como objetivo aumentar el número de donantes sean más efectivas es la lesión por I/R. Las técnicas de trasplante hepático alternativas a la convencional de todas maneras conllevan un inherente periodo de I/R y con ello, sus posibles efectos adversos. Por otro lado, para que los órganos marginales puedan ser utilizados para trasplante en la práctica clínica de manera rutinaria, sería necesario reducir el alto riesgo de disfunción o fallo que presentan los órganos marginales tras la intervención quirúrgica y ello depende en gran medida de reducir la mayor susceptibilidad que presentan este tipo de órganos a la lesión por I/R (**Figura 4**). Por lo tanto minimizar los efectos adversos de la lesión por 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 implicados en la lesión por I/R.<sup>30,59</sup>

### 3.3 Patofisiología de la lesión hepática por I/R

Si bien, en la literatura, la lesión por I/R se ha dividido en dos fases, la lesión causada por la isquemia y la lesión debida a la reperfusión, la separación de los eventos 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, lo que sugiere que los eventos que suceden en la reperfusión, son la consecuencia de aquellos que se inician durante la isquemia. Además se ha visto que la reperfusión de un hígado expuesto a un periodo de isquemia breve no induce ningún daño detectable, un hallazgo indicativo de que la reperfusión por sí sola no es perjudicial.<sup>59</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 niveles de ATP. 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, resulta ser 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. Este hecho trae como consecuencia edema intracelular y el consiguiente hinchamiento de las células de Kupffer y células endoteliales. Estos fenómenos inducen una alteración en los orgánulos citoplasmáticos y en la integridad de la membrana, pudiendo desencadenar en la muerte celular.<sup>59</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 interactuar derivan en la

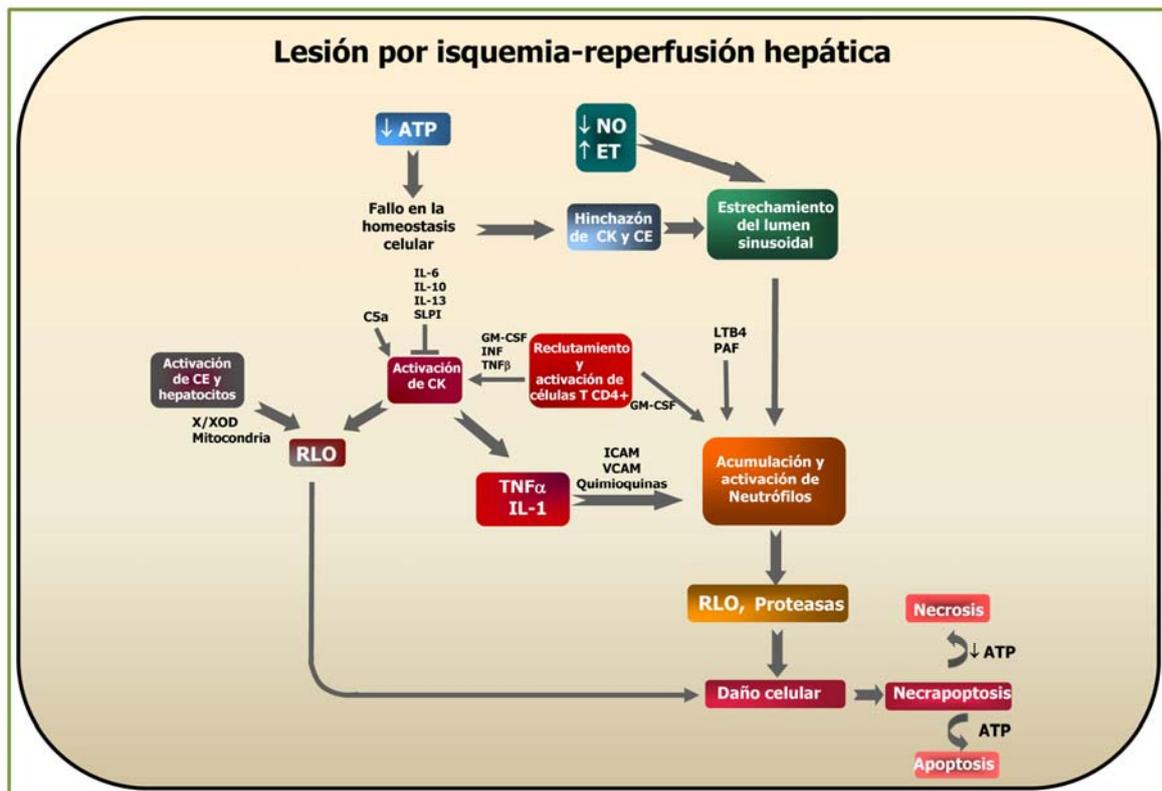
lesión por reperfusión. A título de ejemplo, entre los mediadores inflamatorios descritos en la lesión por I/R hepática destacan los RLO, interferón beta (INF $\beta$ ), interferón gamma (INF $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuquina (IL-1), interleuquina 12 (IL-12), interleuquina 18 (IL-18), Leucotrieno B4 (LTB4), Ácido 12-Hidroxicicosatetraenoico (12-HETE), y el factor activador de plaquetas (PAF). Además, también se ha demostrado la participación de interleukinas con propiedades antiinflamatorias que funcionan como reguladores del proceso inflamatorio que se desarrolla en la I/R, tales como interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 13 (IL-13), e interleuquina 10 (IL-10). 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 factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), proteína activadora 1 (AP-1), receptor activador de la proliferación de peroxisomas alfa (PPAR $\alpha$ ), factor nuclear proteína de alta movilidad del grupo B1 (HMGB1), transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6), factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), y factor de transcripción de choque térmico (HSF). La lesión por reperfusión también implica a las quinasas intracelulares que activan factores de transcripción, como proteínas quinasa activadas por estrés (SAPK), quinasa c-Jun N-terminal (JNK) o proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK).<sup>59</sup>

Referente a la acumulación de neutrófilos, se considera que este proceso está regulado por la participación tanto de citoquinas, factores del complemento, moléculas de adhesión y quimioquinas que permiten el reclutamiento, adhesión y transmigración de neutrófilos. Algunas moléculas de adhesión celular conocidas por su papel en I/R hepática comprenden E-selectina, P-selectina, L-selectina, integrinas  $\beta$ 1, integrinas  $\beta$ 2, molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1). De la misma manera, se ha sugerido la participación de quimioquinas, entre las que se han mencionado la interleuquina 8 (IL-8) y sus homólogos, el quimioatrayente de neutrófilos inducido por citoquinas 1 (CINC), la proteína activadora de neutrófilos derivada del epitelio 78 (ENA-78), la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP) 1 y 2, la quimioquina derivada de queratinocitos (KC) y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP) 1, 2, y 3.<sup>59</sup>

Por último, la disfunción microcirculatoria resulta de una serie de eventos que involucra la interacción de células intravasculares (por ejemplo neutrófilos) con células no parenquimales, (como las células endoteliales y las células de Kupffer) y que es mediada por la síntesis y liberación de moléculas de adhesión, citoquinas, factores del complemento, RLO, NO y endotelinas (ET).<sup>59</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 5** 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 eventos que suceden desde que se inicia la reperfusión hasta que tiene lugar el malfuncionamiento o 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. A continuación nos centraremos en los diferentes resultados existentes en la literatura 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 factor de necrosis tumoral (TNF), de determinados factores de transcripción como el NFκB, y de algunas kinasas intracelulares como las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK). Estos datos nos permitirán entender aún más el por qué la I/R hepática continúa siendo un problema sin resolver en la práctica clínica.



**Figura 5.** Algunos de los mecanismos involucrados en la patofisiología de la lesión por I/R hepática. La deficiencia energética inducida por la isquemia resulta en el fallo del transporte activo transmembranal y consecuentemente se produce hinchazón de las células de Kupffer (CK) y de las células endoteliales (CE). Este hecho, en conjunto con el desequilibrio en la producción de NO y ET contribuye al estrechamiento del lumen sinusoidal. Esto conduce tanto a una acumulación de neutrófilos como a una disminución en la perfusión. La activación de las CK resulta en la liberación de RLO, TNF $\alpha$  e IL-1. Adicionalmente, los RLO pueden producirse a partir del sistema X/XOD y de la mitocondria. La liberación de citoquinas a través de la inducción de moléculas de adhesión (ICAM and VCAM) y de la quimioquina CXC conduce a la acumulación y activación de neutrófilos. Estos neutrófilos se extravasan entonces, causando daño parequimal a través de la producción de RLO y proteasas. De la misma manera, la activación del factor del complemento C5a prepara y activa a las CK; los linfocitos T CD4+ residentes y los recién acumulados en el hígado pueden producir GM-CSF, interferon (INF) y TNF- $\beta$ , los cuales amplifican la activación de las CK y promueven el reclutamiento de neutrófilos en el hígado; el PAF puede preparar a los neutrófilos para la generación de superóxido mientras que el LTB4 puede contribuir a la amplificación de la respuesta de los neutrófilos. Adicionalmente, factores anti-inflamatorios tales como IL-6, IL-10, IL-13 y el inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI) atenúan el daño por perfusión. Finalmente, la teoría de la necroapoptosis postula que un proceso puede empezar con una señal común de muerte celular y culminar en muerte celular necrótica o en apoptosis, dependiendo del grado de disminución del ATP celular.

### Mecanismos responsables de la producción de radicales libres de oxígeno

Referente a los mecanismos responsables de RLO, estudios realizados con inhibidores del sistema xantina/xantina oxidasa (X/XOD) tales como el alopurinol, apuntaban a este sistema como el principal generador de RLO en hepatocitos implicándolo además en el daño pulmonar asociado al

trasplante hepático. Por otro lado, otros resultados obtenidos en modelos experimentales de hígado perfundido aislado e isquemia normotérmica han puesto en tela de juicio la importancia del sistema X/XOD, e indican que la mitocondria podría ser la fuente principal de RLO. Sin embargo, algunos datos ponen en duda la relevancia patofisiológica del estrés oxidativo intracelular (RLO generados por el sistema X/XOD o por las mitocondrias) durante la reperfusión. Datos obtenidos en un modelo murino de I/R normotérmica in vivo, constatan que la mitocondria no parece participar activamente en el estrés oxidativo inducido por la reperfusión. Además, otros estudios han demostrado que un aumento en el estrés oxidativo después de 30 y 60 minutos de isquemia fue atenuado a través de la inactivación de las células de Kupffer, pero no por una dosis alta de alopurinol. Similarmente, otras investigaciones señalan que son los neutrófilos, o las células de Kupffer las principales fuentes generadoras de RLO. Sin embargo esta última hipótesis también se ha sometido a la controversia. La eliminación de las células de Kupffer en el trasplante hepático no modificó los efectos nocivos de la I/R y los neutrófilos activados no son esenciales en el daño por reoxigenación.<sup>30</sup>

La divergencia de resultados respecto a los mecanismos de generación de RLO en la I/R hepática es clara. Con el objeto de clarificar la importancia del sistema X/XOD frente a la mitocondria, debe tomarse en cuenta las diferencias existentes en los modelos experimentales evaluados, incluyendo los tiempos de isquemia. De esta manera, el sistema X/XOD desempeña un papel crucial en el daño hepático por I/R solamente en condiciones en las cuales ocurre una formación importante de XOD, como por ejemplo a las 16 h de isquemia fría. Sin embargo, este sistema de generación de RLO no parece ser crucial a periodos isquémicos más cortos tales como 6 h de isquemia fría. Hay que tener en cuenta además, que incluso después de periodos prolongados de isquemia, en los cuales existe una relevante formación de XOD, esta enzima puede estar desempeñando un papel minoritario comparado con la mitocondria.<sup>30</sup>

Por otro lado, también deben considerarse los fármacos usados para inhibir el sistema X/XOD, ya que, el alopurinol por ejemplo, parece tener más de un mecanismo de acción. El alopurinol no es solamente un inhibidor potente de la XOD, sino que también parece mejorar la disfunción mitocondrial inducida por la isquemia. De la misma manera, es de importancia señalar que la implicación de los hepatocitos y/o de las células de Kupffer como fuentes productoras de RLO depende del periodo de isquemia y de la temperatura (4° C y a 37° C) a la cual se somete el hígado durante la isquemia, lo cual probablemente conduce a diferentes mecanismos de daño en la lesión por I/R.<sup>30</sup>

### **Óxido nítrico**

En la lesión por I/R es difícil establecer una distinción entre mediadores que tienen un papel beneficioso de aquellos cuyo papel es perjudicial. Algunos autores han observado que el NO ejerce un efecto beneficioso frente al daño por I/R en diferentes órganos, tejidos y células, mientras que otros estudios no destacan efecto alguno del NO, e incluso reportan una acción perjudicial de este mediador vasoactivo en el daño por I/R hepática. Estos efectos diferenciales del NO se pueden explicar por las diferencias en las enzimas productoras de NO, en los modelos experimentales de I/R hepática utilizados y en la dosis y el tiempo en que se administran los diferentes moduladores farmacológicos de NO.<sup>30</sup>

En este contexto, algunos estudios sugieren que aunque la producción de NO derivada de la sintasa del óxido nítrico sintasa constitutiva (NOS<sub>c</sub>) tendría efectos beneficiosos en I/R hepática, la producción de NO derivada de la óxido nítrico sintasa inducible (NOS<sub>i</sub>), podría contribuir al daño hepático. El NO derivado de la isoforma NOS<sub>c</sub>, constitutivamente expresada, puede disminuir los desórdenes de la microcirculación durante las primeras horas de reperfusión. En contraste, el NO derivado de la NOS<sub>i</sub> no puede ser generado hasta varias horas después de la reperfusión debido a que esta isoforma requiere inducción transcripcional. El exceso en la producción de NO derivada de la NOS<sub>i</sub> tal vez ya no sea beneficioso a la microcirculación a ese tiempo de reperfusión pero los niveles excesivos de NO pueden ser perjudiciales ya que se pueden combinar con los RLO y generar peroxinitrito. Además, hay estudios que proponen que el NO derivado de la NOS<sub>i</sub> induce la liberación de citocromo c y de caspasas favoreciendo los procesos proapoptóticos. Sin embargo, también existen controversias en relación al papel del NO derivado de la NOS<sub>i</sub> ya que otros investigadores han sugerido que el NO derivado de la NOS<sub>i</sub> es beneficioso porque induce la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 e inactiva caspasas.<sup>30</sup>

Además, para entender los diferentes resultados en relación al papel del NO en la lesión por I/R hepática, es importante clarificar si la fuente de NO es endógena o exógena. En este sentido, mientras que se ha demostrado que el NO endógeno puede reducir la acumulación de neutrófilos, la suplementación exógena de NO no modificó este parámetro pero se asoció con una inhibición en la producción de ET.<sup>30</sup>

### **TNF y NFκB**

Los efectos diferenciales del NO, se han constatado además con otros mediadores implicados en la lesión por I/R hepática. En la I/R hepática, el TNF es protector o perjudicial dependiendo del tipo celular y de las condiciones experimentales o patológicas. El TNF puede estimular la muerte celular o puede inducir efectos hepatoprotectores a través de mediadores antioxidantes, anti-apoptóticos y proliferativos. Por ejemplo, hay estudios que evidencian el papel perjudicial del TNF en la lesión por I/R hepática tanto local como sistémica, pero también se ha constatado su papel clave en procesos de regeneración hepática, procesos inherentes en el trasplante hepático con injertos de tamaño reducido (trasplante pediátrico y de donante vivo). Además, la suplementación de TNF, a dosis bajas es altamente eficaz frente al daño por I/R hepática.<sup>30</sup>

Estos efectos diferenciales en los mediadores inflamatorios, explicados hasta el momento, se pueden extrapolar también a los factores de transcripción implicados en la lesión por I/R hepática. A título de ejemplo, el NFκB puede regular diferentes vías de señalización y por ello tiene el potencial de ser tanto pro- como anti-apoptótico. Actualmente no está claro si en la I/R hepática, los efectos beneficiosos del NFκB frente a la apoptosis prevalecen o no frente a su papel perjudicial en la inflamación. La inhibición del NFκB en I/R hepática reduce la acumulación de neutrófilos y el daño hepatocelular. Estos datos sugieren la implicación del NFκB en la respuesta inflamatoria asociada a la I/R hepática. Sin embargo, otros resultados evidencian que la activación de NFκB es primordial en la regeneración hepática, reduce la apoptosis y el daño por I/R asociado al trasplante hepático.<sup>30</sup>

### MAPKs

Las MAPKs que incluyen la ERK 1/2, la p38 MAPK y la JNK, convierten estímulos extracelulares en señales intracelulares. Generalmente, la ERK 1/2 es estimulada por factores de crecimiento, y de hecho la vía clásica de la ERK está asociada con proliferación. En contraste, la activación de p38 MAPK y de p46/p54 JNK se asocia a diversos tipos de estrés y citoquinas proinflamatorias.<sup>60</sup>

En el contexto de la lesión hepática por I/R, numerosos estudios apuntan que la activación de p38 MAPK y JNK induce apoptosis y necrosis.<sup>60-66</sup> Sin embargo, otras investigaciones indican que la activación de las MAPKs aumenta la tolerancia de los hepatocitos y las células endoteliales frente al insulto isquémico.<sup>67-70</sup> Por otro lado, aunque la activación de la ERK 1/2 se asocia a proliferación celular, también existen estudios que indican su implicación en el daño hepático por I/R.<sup>71,72</sup> Estas diferencias en el papel de las MAPKs en la lesión por I/R hepática dependen de las condiciones experimentales de estudio y de las isoformas de MAPKs que se activan tras la I/R ya que pueden tener efectos totalmente opuestos.<sup>69</sup>

### Acumulación de neutrófilos

La activación de neutrófilos está implicada en la disfunción microvascular y el daño parenquimal asociado a la I/R hepática. Actualmente, se desconoce cómo se acumulan los neutrófilos en el hígado. La teoría clásica propone que el aumento en la expresión de moléculas de adhesión, tales como ICAM-1 y P-selectina son primordiales para la acumulación de neutrófilos y el consiguiente daño hepático asociado a la I/R. Oponiéndose a esta teoría, también hay resultados que demuestran que la acumulación de neutrófilos observada en el hígado después de la I/R no depende de la sobreexpresión de ICAM-1 o P-selectina.<sup>30</sup>

Para explicar si la acumulación de neutrófilos depende o no de las moléculas de adhesión, hay que tener en cuenta la teoría propuesta por Jaeschke. Esta teoría propone que aunque la P-selectina y el ICAM-1 parecen ser relevantes en la adherencia de los neutrófilos en las vénulas postsinusoidales, los neutrófilos relevantes en el daño por I/R se acumulan en los sinusoides. En estos capilares, la acumulación de neutrófilos no depende de B2 integrinas, de ICAM-1 ni de selectinas. En estos sinusoides, los neutrófilos se acumulan gracias a factores mecánicos como la vasoconstricción, el daño y el edema de las células que forman la pared vascular, y una reducida flexibilidad de la membrana del neutrófilo contribuyen a la acumulación de neutrófilos sin la necesidad de un aumento en la expresión en las moléculas de adhesión como el ICAM-1.<sup>30</sup>

En la etapa de reperfusión, si el daño vascular es considerable, se elimina la barrera de células endoteliales y los neutrófilos tienen entonces acceso directo a los hepatocitos. Sin embargo, si las células endoteliales están dañadas pero aún están presentes, puede requerirse entonces la transmigración. En estas condiciones, terapias anti-ICAM pueden reducir pero no previenen la lesión por I/R. Respecto al papel de la P-selectina, las células endoteliales no contienen cuerpos de Weibel Palade ni tampoco sobrerregulan transcripcionalmente niveles importantes de P-selectina. Por otra parte, durante la I/R, un cierto número de intervenciones dirigidas contra selectinas reducen la acumulación hepática de neutrófilos y el daño celular. A causa de que estos hallazgos no pueden ser explicados a través de la prevención del rolling dependiente de P-selectina en los sinusoides, se ha sugerido que la mayoría de los modelos de I/R hepática incluyen algún grado de

isquemia intestinal, la cual conduce a la acumulación de neutrófilos en órganos remotos incluyendo al hígado. Así, pues el bajo número de neutrófilos en el hígado tras el bloqueo farmacológico de las selectinas puede ser un efecto secundario debido a la protección que ejerce la terapia anti-selectina en el daño intestinal por reperfusión.<sup>30</sup>

### **Muerte celular**

Además de los diferentes resultados encontrados en la literatura sobre el papel de los mediadores inflamatorios implicados en la lesión por I/R y sus mecanismos de acción, también existen controversias en el tipo de muerte celular asociada a la I/R hepática. Algunos investigadores han evidenciado que la mayor parte del daño parenquimal es causada por alteraciones necróticas masivas. En contraste, otros han demostrado que la inhibición específica de la apoptosis previene el daño parenquimal y aumenta la supervivencia tras periodos prolongados de isquemia. Si bien durante mucho tiempo se ha asumido que la muerte celular necrótica y apoptótica son entidades diferentes, esta suposición puede no ser válida actualmente.<sup>30</sup> A continuación se revisará brevemente la información básica acerca de las vías de señalización de muerte celular en los hepatocitos, con el propósito de entender la vía común que conduce tanto a necrosis como a apoptosis.

La apoptosis ocurre a través de dos vías principales. La primera, referida como vía intrínseca (mitocondrial), es activada por una variedad de factores de estrés como por ejemplo, daño al DNA, activación de p53, privación de factores de crecimiento, o desórdenes metabólicos. La segunda, es la vía extrínseca que se activa a través de receptores de muerte celular (**Figura 6**). Es bien conocido que uno de los más importantes reguladores de la vía intrínseca es la familia de proteínas Bcl-2. La familia Bcl-2 incluye miembros pro-apoptóticos tales como Bax, Bak, Bad, Bid y miembros anti-apoptóticos como Bcl-2, Bcl-XL y Bcl-W. Tras la señal de muerte celular, las proteínas pro-apoptóticas sufren modificaciones post-transcripcionales que derivan en su activación y traslocación a la mitocondria. Entonces, la membrana mitocondrial exterior se vuelve permeable, conduciendo a la liberación de Citocromo C, el cual promueve la activación de la Caspasa 9, que a su vez activa a la Caspasa 3, desencadenando finalmente la apoptosis.<sup>30</sup>

En la vía extrínseca, una variedad de mediadores incluyendo TNF $\alpha$ , ligando Fas, y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) se unen primeramente a sus respectivos receptores de muerte celular, lo cual causa oligomerización del receptor y la asociación de varias proteínas adaptadoras, incluyendo la proteína de dominio de muerte asociada a Fas, la proteína de dominio de muerte asociada al receptor de TNF- $\alpha$ , y el factor asociado al receptor de TNF- $\alpha$ . La proteína de dominio de muerte asociada a Fas y la proteína de dominio de muerte asociada al receptor de TNF- $\alpha$  promueven la activación proteolítica de la Procaspasa 8 para convertirse en Caspasa 8 con actividad catalítica. En hepatocitos la Caspasa 8 interactúa con la vía intrínseca y rompe Bid, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2, generando la forma truncada tBid. tBid se transloca a la mitocondria, causando permeabilización mitocondrial y liberación de los efectores mitocondriales de apoptosis, tales como Citocromo C.<sup>30</sup>

En los hepatocitos la señalización dependiente de TNF $\alpha$  y de Fas induce el inicio de la transición a la permeabilidad mitocondrial (MPT). La MPT ocurre a partir de la apertura de un poro en la membrana interior mitocondrial, conocido como poro de transición a la permeabilidad. La MPT

conlleva a edema mitocondrial, ruptura de la membrana exterior mitocondrial, y liberación del Citocromo C y otras proteínas mitocondriales.<sup>30</sup>

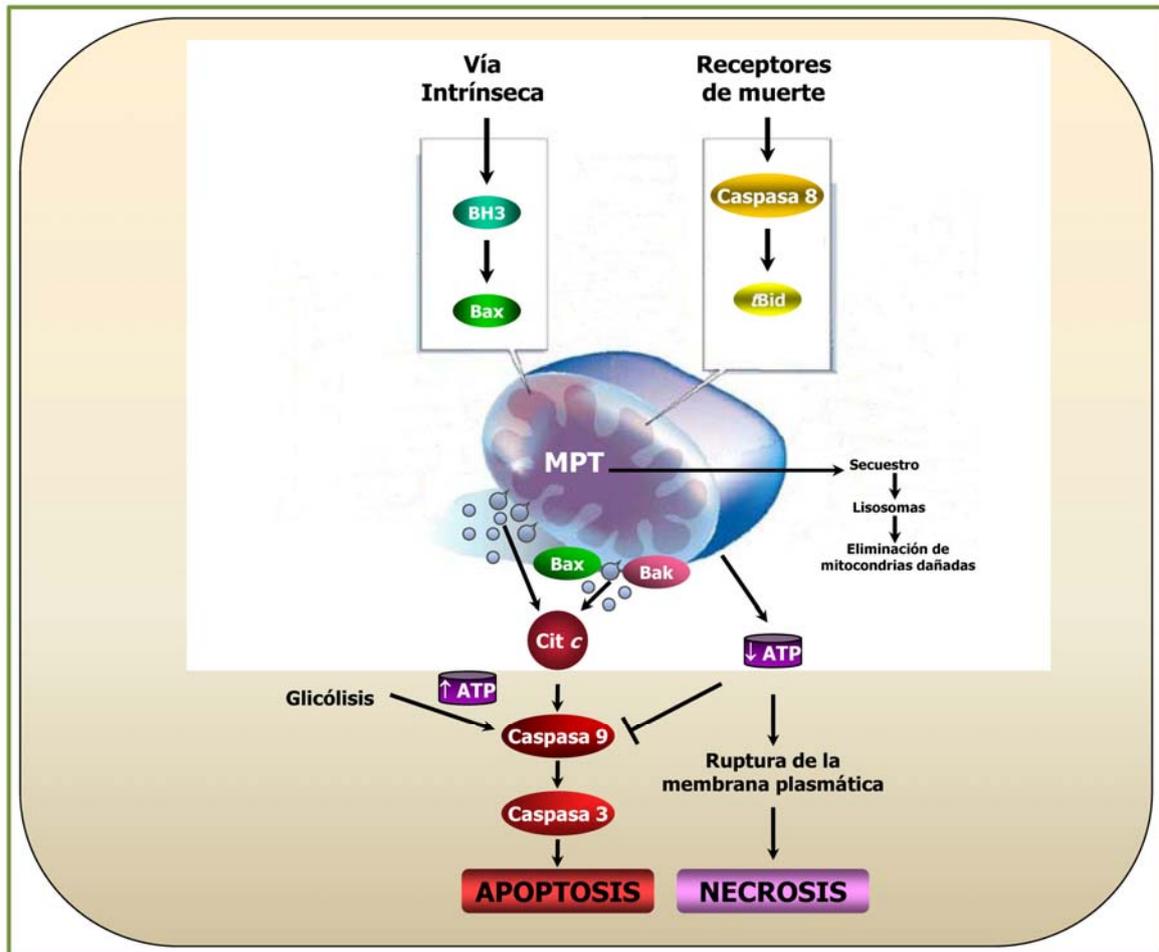


Figura 6. Necrosis y Apoptosis en la I/R hepática.

Se pueden considerar otros mecanismos de liberación del Citocromo C. En algunos modelos experimentales, la interacción de tBid con Bax o Bak, forma canales en la membrana mitocondrial exterior liberando citocromo c y otras proteínas. Si el inicio de la MPT ocurre en relativamente pocas mitocondrias, estos orgánulos son secuestrados en autofagosomas para su digestión por lisosomas, un proceso que elimina las mitocondrias dañadas y potencialmente tóxicas. Cuando la MPT involucra a más mitocondrias, el edema mitocondrial conduce a la ruptura de de la membrana exterior mitocondrial y la liberación del Citocromo C. Siempre que el ATP se encuentre disponible a partir de la glicólisis y haya mitocondrias aun intactas, el Citocromo C activa Caspasas y otras enzimas ejecutoras de apoptosis. Cuando la MPT es abrupta e involucra a la mayoría de las mitocondrias, el ATP se depleciona, lo cual bloquea la activación de las Caspasas. La reducción de ATP culmina con la ruptura de la membrana plasmática y el inicio de la muerte celular por necrosis (Figura 6). Así pues, el término “Necrapoptosis” se utiliza para describir un proceso que empieza con una señal de muerte celular común y el cual culmina ya sea en lisis celular (muerte celular necrótica) o en reabsorción celular programada (apoptosis), dependiendo de factores tales como la disminución de los niveles celulares de ATP.<sup>30</sup>

## 4. El hígado esteatósico

### 4.1 Definición y prevalencia

Un hígado sin esteatosis posee aproximadamente un contenido de grasa de un 5% de su peso total. La acumulación de grasa es considerada patológica cuando el contenido de grasa hepática, consistente principalmente en triglicéridos, excede el 5% del peso del hígado. La esteatosis hepática se puede caracterizar cuantitativamente y cualitativamente.<sup>73</sup> La evaluación cuantitativa se basa en el porcentaje de hepatocitos que muestran vacuolas lipídicas en su citoplasma. Normalmente se clasifica como leve cuando menos de un 30% de los hepatocitos contienen grasa, moderada si contienen grasa entre un 30% y un 60% de los hepatocitos, y severa si contienen vacuolas lipídicas más de un 60% de los hepatocitos. La evaluación cualitativa divide la esteatosis en dos tipos: macrovesicular, cuando los hepatocitos contienen una única vacuola grande que suele desplazar el núcleo del hepatocito hacia la periferia, y microvesicular, si el hepatocito contiene múltiples vacuolas pequeñas. Las circunstancias más habituales asociadas a esteatosis hepática son la obesidad, la diabetes y la ingesta de alcohol.<sup>74</sup> La esteatosis hepática es la enfermedad crónica del hígado más común en el mundo y afecta a todos los grupos raciales, étnicos y de edad. Aunque la prevalencia global todavía permanece por ser determinada, varios estudios han reportado una prevalencia del 10% al 20% en la población delgada, 60% a 74% entre la población obesa y más de 90% en los obesos mórbidos. Aproximadamente 3% de los niños delgados están afectados y la prevalencia se incrementa hasta un 53% entre los niños obesos. Se espera que la prevalencia de esteatosis hepática en la población, se incremente dramáticamente en un futuro cercano debido al aumento de la obesidad entre la población de los países occidentales.<sup>73</sup>

### 4.2 Importancia de la esteatosis hepática en la cirugía hepática

Los pacientes con enfermedades del parénquima hepático presentan un riesgo alto de mortalidad y morbilidad postquirúrgica a causa de características patogénicas subyacentes que pueden afectar la recuperación del hígado y la regeneración hepática. El hígado graso o la esteatosis hepática es un hallazgo histológico común en biopsias de hígado humano, y se estima que más del 20% de los pacientes programados para resección hepática presentan algún grado de esteatosis.<sup>73</sup> En posibles donantes de hígado, la prevalencia de esteatosis hepática es del 26%.<sup>75</sup> El hígado esteatósico supone un riesgo añadido en la cirugía hepática ya que estos hígados toleran peor que los no esteatósicos la lesión por I/R. La presencia de esteatosis moderada aumenta la incidencia de fallo primario y disminuye la supervivencia del paciente después de un trasplante hepático.<sup>73</sup> Sin embargo, en muchos casos es necesario recurrir a estos injertos debido a que el aumento en la demanda de órganos para trasplante no puede cubrirse con hígados en estado óptimo para ser trasplantados. Además, la esteatosis hepática agrava el problema de la falta de órganos ya que se sabe que entre todos los hígados que no son aptos para trasplante por sus condiciones patológicas, más del 50% son hígados esteatósicos, de ahí que la esteatosis sea la causa del mayor número de órganos no aptos para trasplante, acentuando así la problemática del banco de órganos.<sup>59,75</sup> Dado el aumento en la prevalencia de esteatosis que se espera en la población y por lo tanto en la cirugía hepática, es evidente la necesidad de desarrollar estrategias protectivas para minimizar los efectos adversos de la lesión por I/R en los hígados esteatósicos. Esto disminuiría por lo tanto el riesgo de disfunción o fallo primario tras la cirugía hepática y se aumentaría el número de injertos

disponibles para ser trasplantados. Para lograrlo, es imprescindible el estudio de los mecanismos que conducen a la mayor susceptibilidad de un hígado esteatósico ante la lesión por I/R.

### 4.3 Lesión por I/R en el hígado esteatósico

Como se ha mencionado anteriormente, los hígados esteatósicos toleran peor que los no esteatósicos la lesión por I/R.<sup>30,74,75</sup> Sin embargo, las causas de la mayor susceptibilidad de los hígados esteatósicos frente a la lesión por I/R no están totalmente definidas. La literatura recoge como posibles causas los eventos que se describen a continuación (**Figura 7**).

#### Alteraciones en la microcirculación

Las alteraciones en la microcirculación se han propuesto como un factor importante en la tolerancia reducida de los hígados grasos a la lesión por I/R. La acumulación de grasa en el citoplasma de los hepatocitos está asociada con un aumento en el volumen celular, que puede resultar en una obstrucción parcial o total del espacio sinusoidal hepático.<sup>76</sup> En humanos se ha demostrado que en el hígado graso se produce un descenso de aproximadamente el 50% del flujo sanguíneo, lo que podría inducir un estado de hipoxia crónica.<sup>77,78</sup> También se ha observado en modelos animales que el espacio sinusoidal de los hígados grasos está disminuido en un 50% comparado con hígados no esteatósicos.<sup>79-82</sup> Este descenso en el flujo sanguíneo es seguramente secundario al estrechamiento de la luz sinusoidal que conlleva una inadecuada perfusión con las soluciones de preservación durante la extracción del hígado. La luz sinusoidal se ve además afectada por glóbulos de grasa liberados durante la preservación del injerto y por microtrombos de fibrina y elementos celulares que están en la sangre después de la reperfusión.<sup>79,82</sup> Estas alteraciones en la microcirculación podrían amplificar los efectos negativos producidos por la I/R; de esta forma, el edema celular y la adherencia de leucocitos que ocurre durante una I/R en combinación con la reducción del espacio sinusoidal pueden contribuir a causar una lesión hepática grave.

#### Estrés oxidativo

Estudios realizados en ratas Zucker sometidas a isquemia normotérmica indican que los hígados esteatósicos presentan menos tolerancia frente al estrés oxidativo con respecto a los hígados no esteatósicos.<sup>83</sup> En diferentes modelos de hígado graso sometidos a isquemia normotérmica o a trasplante hepático se muestra que la mayor susceptibilidad de los hígados esteatósicos frente a la lesión por I/R puede deberse a la elevada sensibilidad de este tipo de hígado a los RLO.<sup>83-88</sup> Durante la reperfusión la generación mitocondrial de RLO aumenta considerablemente, esto conduce a que las estructuras mitocondriales se vean expuestas al ataque de los RLO generados tanto fuera como dentro de estos orgánulos, conduciendo eventualmente a la disfunción mitocondrial y al fallo en la síntesis de ATP.<sup>89-91</sup> Es bien conocido que los hígados esteatósicos sintetizan menos ATP tras la reperfusión.<sup>89</sup> Además, diversos estudios muestran que durante la reperfusión se produce un aumento en la peroxidación lipídica en los hígados esteatósicos, con respecto a los hígados no esteatósicos. La causa de este aumento en la peroxidación lipídica podría ser debido a que en los hígados esteatósicos hay una mayor cantidad de substrato fácilmente oxidable.<sup>92</sup> En condiciones basales, los sistemas antioxidantes del hígado son suficientes para contrarrestar la peroxidación lipídica que se produce en el hígado. Sin embargo, en hígados esteatósicos sometidos a I/R, la peroxidación de lípidos se ve muy incrementada y los sistemas antioxidantes del hígado se ven sobresaturados. La disminución de fosfolípidos como consecuencia

de la peroxidación lipídica conduce a la alteración de la membrana plasmática.<sup>93</sup> Además los productos de la peroxidación lipídica, como por ejemplo el malondialdehído, podrían actuar como atrayentes de neutrófilos e inducir necrosis celular.<sup>94,95</sup>

Diversos trabajos se han enfocado en minimizar el estrés oxidativo al que son sometidos los hígados esteatósicos.<sup>84,87,88</sup> No obstante, los datos obtenidos en los estudios en los que se administraban antioxidantes han sido contradictorios. Algunos de estos estudios en ratas Zucker obesas, modelo bien caracterizado de obesidad inducida por dieta, indican que la administración de tocoferol, que tiene propiedades antioxidantes, aumenta la tolerancia del hígado esteatósico a la isquemia caliente. Por otro lado, estudios experimentales en hígados esteatósicos inducidos mediante dieta deficiente en colina-metionina, mostraron que la administración de precursores de glutatión (GSH), como la N-acetilcisteína, pueden ayudar a restaurar la integridad hepatocitaria en los hígados esteatósicos pero sin bloquear los RLO. Además, en hígados esteatósicos inducidos por dieta o por alcohol, se producen RLO insensibles a la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa y que están implicados en la vulnerabilidad de este tipo de hígados a la lesión por I/R.<sup>84,87-89</sup>

### **Metabolismo energético**

Diversos estudios muestran que tras varias horas de isquemia normotérmica o fría los hígados esteatósicos presentan una depleción de los niveles de ATP mayor que la sufrida por los hígados no esteatósicos.<sup>96-97</sup> Por el contrario, en otros estudios llevados a cabo en un modelo de isquemia hepática normotérmica se observaron niveles semejantes de ATP en ambos tipos de hígados durante la isquemia, pero se observó que tras la reperfusión, los hígados esteatósicos presentaban una recuperación del metabolismo energético más lenta.<sup>98</sup> Según estos datos, la esteatosis no afecta directamente al metabolismo energético de los hepatocitos durante la isquemia, pero reduce la capacidad de las mitocondrias de generar ATP al iniciarse la reperfusión tanto en la isquemia normotérmica como en la isquemia fría.<sup>96, 99-106</sup> Diversos autores postulan que la presencia de grasa en el hepatocito produce diversas alteraciones en las mitocondrias que se hacen mucho más evidentes tras un proceso de I/R y que dan lugar a la sobreproducción de RLO y a un significativo deterioro del metabolismo energético tras el trasplante, siendo ambos factores responsables de la poca tolerancia que presentan los hígados esteatósicos a la lesión por I/R.<sup>96, 99,102, 105, 107,108</sup>

### **Acumulación de neutrófilos**

El exceso de grasa en un hígado esteatósico produce alteraciones en la fluidez de las membranas debido a la menor presencia de colesterol y de ácidos grasos poliinsaturados en las mismas.<sup>109</sup> La alteración en las membranas del endotelio sinusoidal de los hígados grasos, junto con el mayor deterioro que sufren las células endoteliales tras la isquemia fría en este tipo de hígado, podría derivar en un aumento en la adhesión y activación de los neutrófilos en la reperfusión, y por tanto a un aumento de la infiltración de neutrófilos en el tejido hepático.<sup>99, 109,110</sup>

Se ha reportado la implicación de los neutrófilos en la mayor vulnerabilidad de los hígados grasos frente a la lesión por I/R hepática especialmente en hígados grasos inducidos por alcohol; por otra parte, en otros modelos de esteatosis hepática los neutrófilos no parecen ser los responsables de la menor tolerancia que presentan los hígados grasos a la I/R.<sup>83, 110-112</sup> En este sentido, se observó la misma acumulación de neutrófilos en hígados esteatósicos y sin infiltración grasa en ratas Zucker

sometidas a I/R hepática normotérmica. Esto se confirmó también en otros modelos de esteatosis hepática tales como el inducido por la ingesta de una dieta rica en colesterol.<sup>113,114</sup> En un modelo experimental de trasplante hepático en ratas Zucker se ha demostrado que el bloqueo de integrinas y selectinas, moléculas implicadas en la adhesión de los neutrófilos al endotelio sinusoidal, redujo la lesión hepática y aumentó la supervivencia de las ratas tras el trasplante hepático.<sup>115-117</sup>

### **Activación de las células de Kupffer**

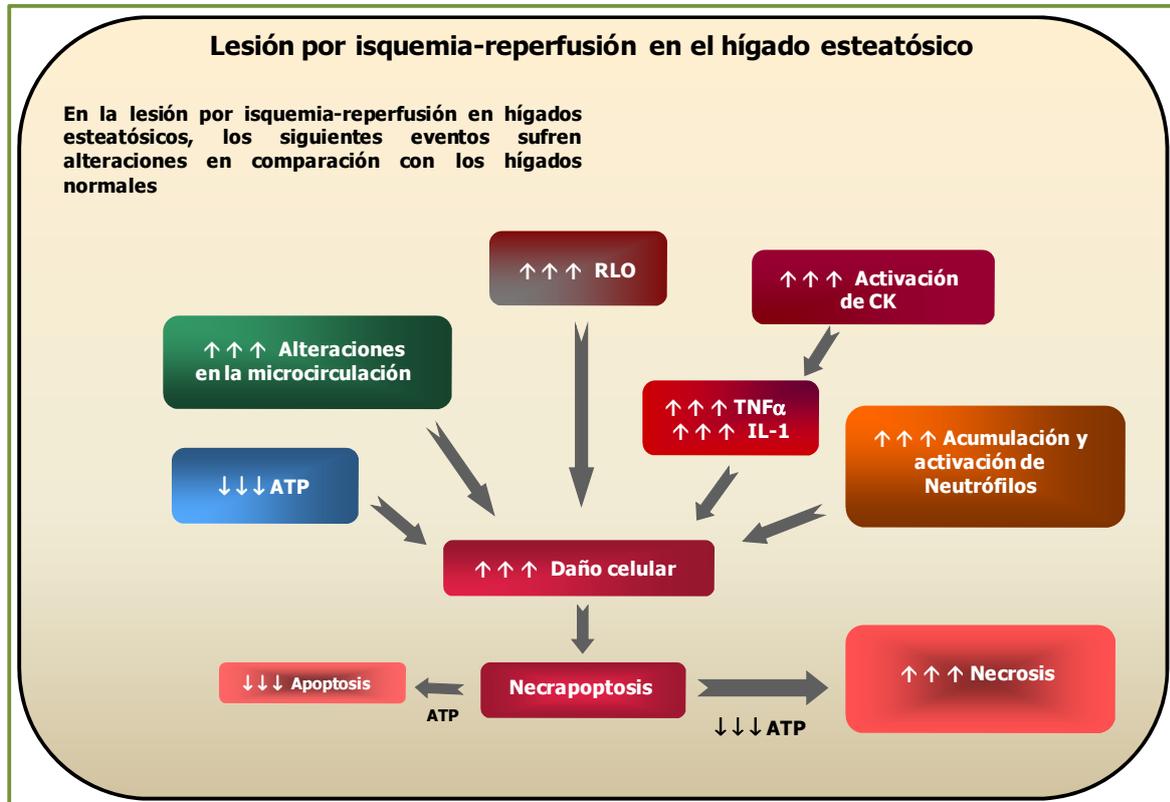
En los hígados grasos se ha demostrado un aumento en el número y en la actividad fagocítica de las células de Kupffer, lo cual puede contribuir a aumentar la lesión por I/R en ese tipo de hígado.<sup>79</sup> Las células de Kupffer son una fuente muy importante de RLO y citoquinas como el TNF- $\alpha$  e IL-1 durante la etapa de reperfusión. Se ha demostrado la implicación de las células de Kupffer en la lesión por I/R asociada al trasplante hepático, ya que la administración de cloruro de gadolinio, un inhibidor de la activación de las células de Kupffer, produjo un descenso en los parámetros de lesión hepática y aumentó la producción de bilis.<sup>118</sup>

### **Mecanismo de muerte celular**

Una característica clave del daño isquémico en el hígado no esteatósico es la apoptosis, una forma activa de muerte celular que requiere energía. Durante la apoptosis, las células innecesarias son transformadas en cuerpos apoptóticos más pequeños y son eliminadas con un mínimo de respuesta inflamatoria. El porcentaje de hepatocitos apoptóticos después de I/R correlaciona con el daño hepático y con la supervivencia de los animales de experimentación.<sup>75, 84, 97, 119, 120</sup> Además, varias estrategias antiapoptóticas han demostrado ser altamente protectoras frente al daño isquémico en hígados no esteatósicos.<sup>84</sup> Por otro lado, se ha demostrado que los hígados esteatósicos presentan alteraciones en la vía de señalización que conduce a apoptosis. Estudios realizados en ratas de la cepa Zucker han señalado que los hígados esteatósicos sometidos a I/R normotérmica presentan un grado reducido y un retraso en el desarrollo de la apoptosis en comparación con hígados no esteatósicos en las mismas condiciones. En cambio, se produce una necrosis masiva en los hígados esteatósicos, y un mínimo de necrosis en los hígados no esteatósicos. En la necrosis se produce rotura inespecífica de los orgánulos celulares y la membrana citoplasmática y conlleva la liberación del contenido citoplasmático que contribuye a agravar la lesión inflamatoria hepática.<sup>75, 121, 122</sup> En consonancia con lo anterior, estrategias terapéuticas basadas en la inhibición de la apoptosis, que reducen el daño isquémico en hígados no esteatósicos, no son capaces de proteger en presencia de esteatosis.<sup>30, 84</sup> El hecho de que se produzca uno u otro tipo de muerte celular podría estar asociado, entre otras cosas, con la disponibilidad de ATP de la célula, ya que la apoptosis es un proceso dependiente de ATP. El deterioro del metabolismo energético que presentan los hígados grasos tras la I/R hepática podría explicar el fallo de la apoptosis en este tipo de hígados y el predominio de la lesión por necrosis como forma de muerte celular.<sup>75, 121, 122</sup>

Todo lo anteriormente mencionado en el presente apartado, pone de manifiesto que las diferencias en los mecanismos de muerte celular y en los mecanismos implicados en la lesión por I/R en hígados esteatósicos con respecto a los hígados no esteatósicos explican las dificultades para prevenir efectivamente la lesión por I/R en los hígados esteatósicos. De esta manera, estrategias terapéuticas que son efectivas en hígados no esteatósicos pueden no serlo en presencia de esteatosis, o la dosis efectiva de los fármacos a administrar puede diferir entre los dos tipos de

hígados. Por otro lado, también puede haber fármacos que podrían ser efectivos solamente en hígados esteatósicos.



**Figura 7.** Lesión por I/R en hígados esteatósicos. Durante la lesión por I/R en comparación con los hígados normales, los hígados esteatósicos presentan mayores alteraciones a nivel de la microcirculación hepática, producción incrementada de RLO, depleción de los niveles de ATP mayor que la que sufren los hígados no esteatósicos, aumento en la acumulación de neutrófilos así como también en la actividad fagocítica de las CK. Además de esto, hay un predominio de la necrosis sobre la apoptosis como forma de muerte celular en hígados esteatósicos sometidos a I/R. Todo lo anteriormente mencionado podría contribuir a la mayor susceptibilidad que presentan los hígados esteatósicos a la lesión por I/R en comparación con los hígados normales.

## 5. Estrategias terapéuticas para disminuir la lesión por I/R

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 el disminuir la lesión por I/R asociada al trasplante hepático, los resultados hasta el momento no han sido concluyentes. En la **Figura 8** se presentan algunas estrategias terapéuticas desarrolladas para prevenir el daño por I/R.

### 5.1 Estrategias farmacológicas

Numerosos estudios experimentales se han centrado 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 o la clorpromazina 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, glutatión éster (GSH-éster), o alopurinol, y se han administrado también anticuerpos dirigidos al TNF para bloquear las acciones nocivas de esta citoquina. Para reducir los desórdenes

microcirculatorios asociados a la I/R hepática se han realizado tratamientos con dopamina y ATP-MgCl<sub>2</sub>. Se han utilizado también fármacos como adenosina, donadores de NO, L-arginina, y anticuerpos anti-ICAM-1 y anti-P-selectina para bloquear la acumulación de neutrófilos. Sin embargo, ninguno de estos tratamientos ha logrado frenar la lesión por I/R hepática.<sup>30</sup>

Debe tenerse 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, también deben considerarse 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. La administración de anticuerpos anti-TNF provoca sólo una inactivación parcial de la proteína. Pequeñas variaciones en la dosis de donadores de NO tienen efectos totalmente opuestos. Además, no hay que descartar los posibles efectos secundarios derivados de los fármacos, ya que en el caso de la dopamina, adenosina y donadores de NO se han descrito efectos nocivos sistémicos.<sup>30</sup>

Si esto ocurre en hígados sanos, aún son mayores los problemas para modular la lesión por I/R en hígados esteatósicos. Este tipo de hígados generan RLO que son insensibles a la acción de antioxidantes como la SOD y la catalasa. La diferencia en los mecanismos de acción entre hígados sanos y esteatósicos supone que tratamientos efectivos en hígados sanos pueden no serlo en presencia de esteatosis y además la dosis de fármaco a administrar puede ser diferente en ambos tipos de hígado. Hallazgos como este deben tenerse en cuenta al momento de la aplicación por igual de estrategias farmacológicas en I/R en hígados sanos y esteatósicos pues los efectos pueden ser muy diferentes en cada caso. A título de ejemplo, la administración de un donador de NO en un modelo de trasplante hepático experimental logró reducir el estrés oxidativo en hígados sanos, mientras que la suplementación de NO, a la misma dosis, aumentó la vulnerabilidad de los injertos esteatósicos al síndrome de I/R. Por otra parte, también podrían existir fármacos que sólo fueran efectivos en hígados esteatósicos. En I/R asociada al trasplante hepático, se ha evidenciado en hígados esteatósicos un aumento en la expresión de la proteína desacoplante-2 mitocondrial (UCP2) y una capacidad disminuida de sintetizar ATP en la reperfusión, lo que contribuye a la vulnerabilidad de los hígados esteatósicos al síndrome de I/R. Así pues, fármacos como la cerulenina que pueden actuar sobre la UCP2 disminuyendo su expresión, logran aumentar el contenido de ATP en hígados esteatósicos pero tal estrategia tal vez no tendría ningún efecto en hígados sanos porque no se presenta sobreexpresión de UCP-2. Resultados similares se han obtenido con la carnitina.<sup>30</sup>

## 5.2 Soluciones de preservación

Desde su introducción por Belzer et al. a finales de los 80s, la solución UW se ha convertido en la más utilizada en la práctica clínica para la preservación de la mayoría de los órganos en trasplante. La diferencia de esta solución con las restantes es que no contiene glucosa lo cual evita la producción de lactato y los problemas de acidosis, en cambio contiene adenosina que inhibe la agregación plaquetaria, la acumulación de neutrófilos, y es un substrato para la síntesis de ATP, y contiene antioxidantes como GSH y alopurinol para evitar los efectos nocivos de los RLO. La inclusión de algunos componentes en la solución UW ha sido tanto defendida como criticada. Por ejemplo, variantes simplificadas de la solución UW en las cuales se ha omitido la adenosina han

mostrado tener potencial protector similar o aun mayor durante la preservación fría del hígado. Otra de las limitaciones de la solución de UW es la presencia de hidroxietilamidón, que previene el edema intersticial pero también es un proagregante de glóbulos rojos que puede producir un lavado incompleto del injerto hepático con el consiguiente estasis venoso y respuesta inflamatoria. Además de lo anterior, 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 sitio de acción. De hecho, hay estudios en humanos indicando 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>30</sup>

Existen otras alternativas de soluciones de preservación, y cada una de ellas está diseñada para ofrecer alguna ventaja con respecto a la solución de UW. Por ejemplo, la solución Histidina-Triptófano-Cetoglutarato (HTK) presenta una viscosidad más baja y omite el almidón en su composición. Esto posiblemente podría proveer un lavado inicial del órgano más rápido durante la recuperación del órgano, resultando en un enfriamiento más rápido y en un mejor lavado del órgano para eliminar más eficazmente los glóbulos rojos del órgano a trasplantar. En un ensayo clínico aleatorio, se comparó a la solución UW con la solución HTK en trasplante hepático con injertos procedentes de donante cadavérico y se observaron parámetros similares de supervivencia del receptor y del injerto, así como también en daño y función hepática de los injertos trasplantados. Además, en este estudio la incidencia de complicaciones fue significativamente mayor en los hígados preservados en HTK. Celsior, otra solución comercialmente disponible, tiene una composición más alta en sodio y más baja en potasio y omite el almidón en su composición. El bajo contenido en potasio disminuye la hiperpotasemia tras la reperfusión del órgano y al no contener almidón su viscosidad es muy baja. La comparación entre la solución UW y la solución Celsior ha mostrado resultados similares en cuanto a eficacia y seguridad para la preservación de injertos hepáticos. Una solución UW-Polietilenglicol (PEG) llamada Instituto George Lopez (IGL-1) combina la inversión de la concentración de los iones  $K^+$  y  $Na^+$  y la sustitución del hidroxietilamidón por PEG. Con esta solución de preservación, se ha demostrado una mejora en la microcirculación y una reducción en el daño hepático por I/R en trasplante hepático experimental; sin embargo la superioridad de esta solución todavía no ha sido demostrada en humanos. En definitiva, todavía no se han demostrado diferencias fundamentales en los resultados clínicos de estudios aleatorios que comparen las diferentes soluciones de preservación existentes, y por lo tanto no puede hacerse ninguna recomendación al respecto.<sup>123,124</sup>

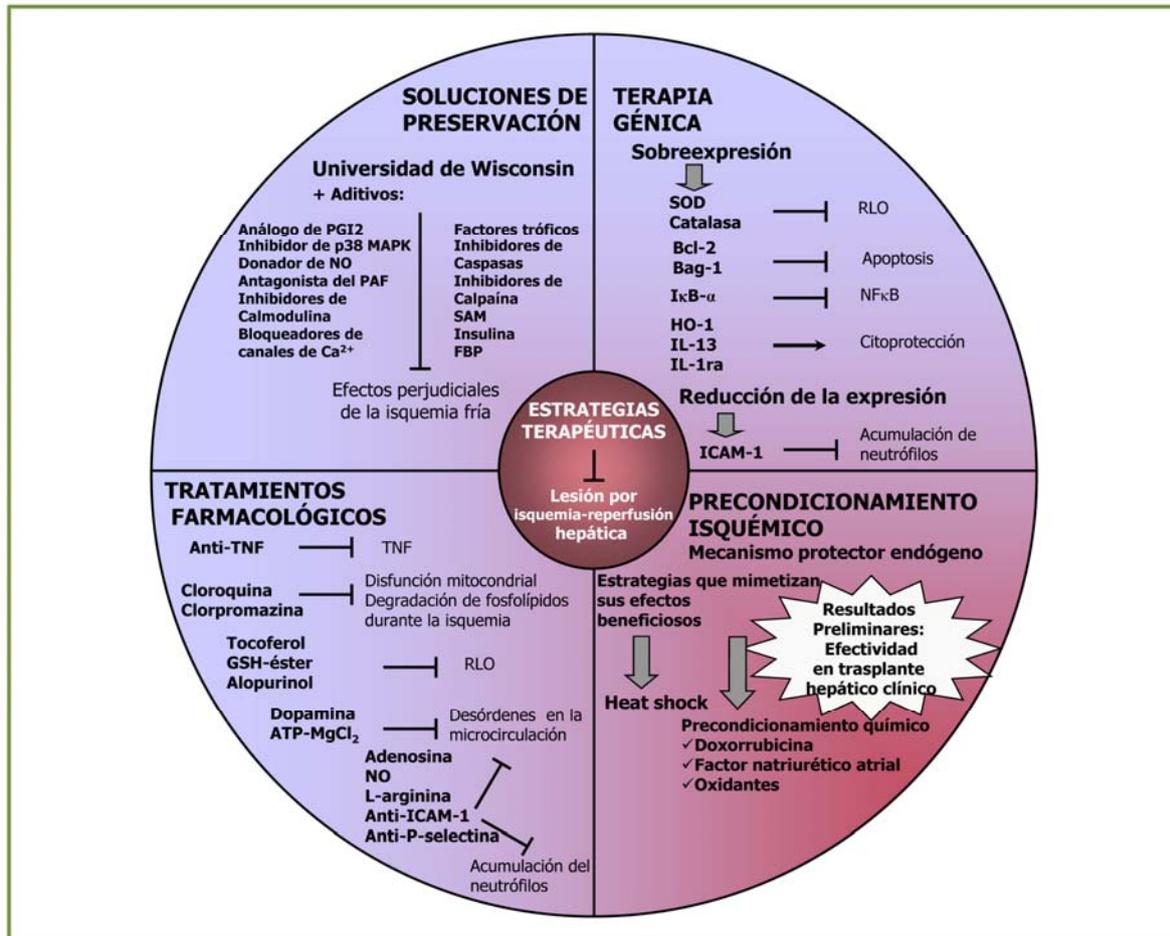
Como parte de los esfuerzos por reducir el daño que sufre el injerto hepático durante el tiempo de preservación fría, se han introducido una variedad de ingredientes en la solución de preservación UW, con resultados prometedores: el análogo estable de la protaciclina (PGI<sub>2</sub>) OP-4183, el inhibidor de la p38 MAPK FR167653, el donante de NO nitroprusiato de sodio, el antagonista del PAF E5880, inhibidores de la calmodulina, bloqueadores de los canales de  $Ca^{+2}$  tales como nisoldipina, factores tróficos, inhibidores de la calpaína o de caspasas, S-adenosilmetionina (SAM), insulina, o Fructosa 1,6-bifosfato (FBP). Sin embargo, ninguno de estas modificaciones en la composición de la solución UW ha llegado a su aplicación rutinaria en la práctica clínica. Por ejemplo, estudios dirigidos al enriquecimiento de la solución UW con inhibidores de caspasas han mostrado que dicha estrategia previene la apoptosis de las células endoteliales, pero también se

demonstró que tales inhibidores tuvieron muy poco efecto sobre la necrosis, forma predominante de muerte celular en los hígados esteatósicos. En línea con lo anterior, la adición de precursores para la resíntesis de ATP tales como SAM, resultó en una recuperación inicial pobre de ATP durante la reperfusión hepática. La insulina y el FBP han sido recomendadas y añadidas a la solución de preservación UW con el objetivo de estimular la glicólisis y modular la actividad de las células de Kupffer, respectivamente. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que estas modificaciones en la solución UW podría exacerbar el daño isquémico del injerto y disminuir la tasa de supervivencia del injerto en trasplante hepático experimental.<sup>30</sup>

### 5.3 Terapia génica

Los actuales avances en biología molecular proporcionan nuevas oportunidades para reducir el daño hepático por I/R a través del uso de terapia génica. Para suprimir el estrés oxidativo con el objetivo de reducir la lesión por I/R hepática, se han realizado pre-tratamientos basados en la sobre-expresión de SOD o catalasa utilizando como vehículo adenovirus, liposomas o polientilenglicol. Para inhibir la apoptosis, se ha buscado la sobreexpresión del gen Bcl-2, utilizando principalmente como vehículo adenovirus. Para limitar la acumulación y la activación de neutrófilos, se ha realizado una estrategia génica para reducir la expresión de ICAM-1 utilizando como vehículo liposomas. Se han desarrollado estrategias citoprotectoras basadas en la expresión de genes tales como la hemo-oxigenasa-1 (HO-1), la citoquina anti-inflamatoria IL-13 y el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra), empleando como vectores adenovirus o liposomas. Se ha intentado modular la acción del NFκB a través de la transfección adenoviral de una forma mutante de IκB, el cual inhibiría NFκB y aliviaría la respuesta inflamatoria hepática asociada a la I/R. 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 NFκB), debido a las controversias existentes en la activación de NFκB.<sup>30</sup>

En los últimos años, el uso de las terapias basadas en RNA interferentes pequeños (siRNA) para regular las acciones biológicas de los mediadores inflamatorios en una gran variedad de enfermedades<sup>125</sup> ha creado gran interés. Así pues, en el contexto de la I/R hepática se han aplicado estrategias terapéuticas basadas en la administración de siRNA para adiponectina,<sup>62</sup> esfingomielinasa ácida,<sup>126</sup> o moléculas relacionadas con la apoptosis tales como Bax,<sup>127</sup> el receptor apoptótico Fas,<sup>128</sup> la Caspasa 8 y la Caspasa 3;<sup>129</sup> las cuales han protegido frente al daño hepático inducido por I/R. Sin embargo, uno de los mayores desafíos para que estas estrategias puedan alcanzar su aplicación clínica es el desarrollo de estrategias que sean capaces de permitir un silenciamiento génico estable sin inducir efectos secundarios adversos. Dado que los siRNA son ácidos nucleicos, se degradan fácilmente en suero y por lo tanto necesitan un vehículo que permita un transporte estable, una internalización celular específica y confiable y además una farmacocinética favorable para utilizarse como terapia farmacológica. La posible toxicidad de dichos vehículos así como el riesgo de inmunogenicidad también son obstáculos que deben ser superados. Una vez que se desarrollen vehículos adecuados para su uso en la clínica, aun quedan otros obstáculos por afrontar. Aunque los siRNA exhiben una especificidad alta por su RNA diana, existe la posibilidad de que puedan silenciarse RNAs parcialmente complementarios y que no son el objetivo del siRNA utilizado.<sup>130</sup>



**Figure 8.** Estrategias terapéuticas desarrolladas en años anteriores para prevenir el daño causado por la lesión por I/R hepática. Se ha introducido en la solución UW una gran variedad de ingredientes tales como el análogo estable de la PGI<sub>2</sub>, un inhibidor de la p38 MAPK, donador de NO, antagonista del PAF, inhibidores de la calmodulina, bloqueadores de los canales de Ca<sup>2+</sup>, factores tróficos, inhibidores de la caspasa o la calpaína, SAM, insulina, o FBP, con el objeto de reducir el daño hepático causado por la isquemia fría. Se han realizado terapias génicas basadas en la sobreexpresión de SOD, catalasa, Bcl-2, Bag-1, un mutante de IκB que actuaría como inhibidor de NFκB, HO-1, IL-13 o un IL-1ra, así como otras basadas en la reducción de la expresión de ICAM-1 para mejorar la lesión por perfusión. También se han intentado tratamientos farmacológicos tales como la administración de anti-TNF, cloroquina, clorpromazina, terapias antioxidantes usando tocoferol, glutatión éster o alopurinol, dopamina, ATP-MgCl<sub>2</sub>, adenosina, donadores de NO, L-arginina, anti-ICAM-1 o anti-P-selectina. Adicionalmente se han evaluado estrategias capaces de mimetizar los beneficios del PCI, tales como el precondicionamiento químico utilizando doxorubicina, factor natriurético atrial u oxidantes. Ninguno de estos tratamientos ha sido aplicado en la práctica clínica. Sin embargo, recientes estudios clínicos sugieren una posible efectividad del PCI en el trasplante hepático.

## 5.4 Estrategias quirúrgicas

Diversas estrategias quirúrgicas han demostrado ser protectoras frente a la lesión por I/R hepática, tales como el shunt portosistémico, el clampaje intermitente o el precondicionamiento isquémico (PCI).<sup>131-133</sup> Estas dos últimas estrategias además se han aplicado en la práctica clínica en pacientes sometidos a hepatectomías, donde se han puesto de manifiesto sus efectos beneficiosos.<sup>134,135</sup> Estudios llevados a cabo en modelos experimentales de I/R hepática donde se comparan ambas técnicas quirúrgicas han demostrado que la aplicación del PCI tuvo mayores efectos beneficiosos.<sup>131,132</sup>

A partir del momento en que se describió la efectividad del PCI, 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. También se ha intentado realizar un acondicionamiento químico con dexorrubicina, factor natriurético atrial, o con oxidantes, y se ha demostrado que estos tratamientos reducen la lesión hepática en diferentes modelos experimentales de I/R. Sin embargo, las limitaciones de estas estrategias es su posible aplicación clínica, bien por la dificultad que ello supondría, por problemas de toxicidad o por los efectos secundarios descritos.<sup>30</sup>

Las investigaciones acerca de la efectividad del PCI en modelos experimentales de I/R hepática han sido la base para que esta estrategia quirúrgica sea la única que ha alcanzado su proyección en la práctica clínica para reducir la lesión por I/R hepática normotérmica asociada con las resecciones hepáticas de tumores, tanto en hígados sanos como en esteatósicos.<sup>135,136</sup> Tomando en cuenta lo anterior, así como los datos clínicos más recientes que sugieren una posible efectividad de este procedimiento quirúrgico en el trasplante hepático, el PCI se abordará de manera más extensa en el siguiente apartado.

## 6. El PCI

El PCI es una estrategia quirúrgica que protege los tejidos frente a la lesión por I/R y consiste en la aplicación de breves periodos de I/R antes de que el órgano sea sometido a una I/R prolongada. Este fenómeno fue descrito por primera vez en corazón por Murry et al. en 1986 y posteriormente ha demostrado ser un mecanismo eficaz en diferentes órganos como intestino, cerebro, músculo e hígado.<sup>137-139</sup> La aplicación del PCI difiere entre los distintos órganos, de modo que en cada órgano el efecto protector se consigue tras la aplicación de diferentes ciclos de I/R, así como también difieren los tiempos de isquemia y de reperfusión empleados para realizar el PCI en los distintos órganos y en los distintos modelos experimentales evaluados. De este modo, mientras que en el corazón se aplican varios ciclos de I/R, el efecto protector del PCI en el hígado se consigue mediante la aplicación de un único ciclo de I/R.<sup>140,141</sup>

### 6.1 Bases moleculares del PCI

A pesar de que se han postulado diferentes hipótesis, los mecanismos protectores por los que actúa el PCI no se conocen con exactitud. Las bases moleculares del PCI consisten en una secuencia de eventos: una vez que se ha inducido el PCI, debe generarse rápidamente una señal que se traduce en un mensaje intracelular conduciendo a la amplificación del mecanismo de protección. Al igual que ocurre en la lesión hepática por I/R, en la modulación del daño hepático inducida por el PCI existe una compleja interacción entre diferentes tipos celulares.<sup>142</sup>

#### Adenosina y NO

Varios trabajos en modelos de I/R normotérmica y trasplante hepático han demostrado la implicación del NO y la adenosina en el efecto protector del PCI.<sup>139</sup> De hecho, la ventana de tiempo óptima que induce los efectos protectores del PCI en el hígado es determinada por al menos, dos factores: una concentración de adenosina lo suficientemente elevada como para inducir

la generación de NO a través de la activación de los receptores de adenosina A<sub>2</sub>, y una baja concentración de xantina para evitar los efectos perjudiciales de este metabolito.<sup>139,141,143-145</sup> La generación del NO inducida por el PCI probablemente proviene de la NOS<sub>c</sub>, ya que la síntesis del NO se ha observado minutos después de efectuarse el PCI, y además no se ha encontrado ninguna diferencia en la actividad de la NOS<sub>i</sub> en animales sometidos a I/R hepática con o sin PCI previo.<sup>146</sup>

Durante el breve periodo de isquemia del PCI se produce una degradación de ATP que lleva a un aumento de los niveles de adenosina; la cual a través de la activación de los receptores A<sub>2</sub> de adenosina, genera un aumento de NO que sería responsable del efecto protector ofrecido por el PCI.<sup>138</sup> El NO inhibe la adhesión de los neutrófilos al endotelio sinusoidal al inhibir la presencia de moléculas de adhesión en el mismo, inhibe el efecto vasoconstrictor de las endotelinas y actúa como secuestrador de RLO tales como el superóxido.<sup>146-150</sup>

El papel de los receptores de adenosina A<sub>2</sub> en el PCI ha sido demostrado mediante la administración de agonistas y antagonistas de los mismos, de modo que los agonistas reprodujeron los efectos beneficiosos del PCI mientras que los antagonistas los suprimieron.<sup>139</sup> Además diversos estudios han demostrado la implicación del NO en el PCI mediante la administración de inhibidores de su síntesis y de donadores de NO, que anularon y simularon respectivamente los efectos beneficiosos del PCI en modelos animales de I/R normotérmica y trasplante hepático.<sup>133,139,141,149,151-160</sup>

### Vías de señalización molecular

Estudios experimentales en hepatocitos aislados y en modelos experimentales de I/R indican que durante el PCI tiene lugar la degradación de ATP, generándose adenosina. La adenosina se libera al espacio extracelular y provoca la activación de los receptores de adenosina A<sub>2</sub>, lo cual induce una red de señales que incluye a las proteínas Gi, fosfolipasa C (PLC) y el fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K), que son responsables de la activación secuencial de la proteína quinasa C (PKC) y p38 MAPK. La liberación de NO activa a la guanilato ciclasa (cG-S), lo cual también puede estimular la p38 MAPK. Además, el PCI provoca la generación de monofosfato de adenosina (AMP), lo cual induce la activación de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK). Las señales generadas por la p38 MAPK, la proteína quinasa B (PKB/Akt) y la AMPK pueden activar mecanismos capaces de preservar el metabolismo energético, las funciones mitocondriales, la homeostasis iónica y la homeostasis del pH, así como también de reducir el estrés oxidativo. El PCI a través de la activación de la AMPK, reduce la degradación de ATP atenuando así la acumulación de intermediarios glicolíticos y la producción de lactato durante la isquemia sostenida. Los beneficios del PCI sobre el estrés oxidativo podrían ser explicados por la inducción de antioxidantes, tales como la SOD y las proteínas de choque térmico (HSPs), así como también por el efecto del PCI sobre el sistema xantina deshidrogenasa (XDH)/xantina oxidasa (XOD). El PCI reduce la acumulación de xantina durante la isquemia y previene la conversión de XDH a XOD, previniendo los efectos dañinos de este sistema de generación del RLO sobre el hígado. Es posible que el NFκB y factores de transcripción regulados por p38 MAPK tales como el factor activador de la transcripción 2 (ATF-2) y el factor potenciador específico de miocito 2C (MEF2C), pudieran ser responsables de inducir la expresión de genes protectores, incluyendo la SOD. Las señales del PCI también activan el factor de transcripción HSF1, y su unión al elemento de choque térmico (HSE)

situado en las regiones promotoras de los genes diana, induce la producción de HSP27, HSP70 y HO-1. La inducción de las HSPs reduce la unión nuclear a factores de transcripción proinflamatorios y aumenta la capacidad antioxidante de las células, lo cual podría disminuir la formación de TNF- $\alpha$  y atenuar la respuesta inflamatoria en los hígados precondicionados. Las HSPs también podrían contribuir a mejorar el potencial de membrana y el control respiratorio en la mitocondria, permitiendo una recuperación más rápida del ATP en la reoxigenación. Asimismo se ha sugerido la posibilidad de que el PCI podría disminuir la transcripción de genes como c-fos y c-jun, protegiendo así frente a la lesión por I/R hepática, y también se ha sugerido que el PCI a través de activar el NF $\kappa$ B estaría induciendo la activación del STAT3, el cual está implicado en la hepatoprotección y en la proliferación celular.<sup>142</sup> Cabe mencionar que el papel del NF $\kappa$ B en los efectos del PCI no está totalmente esclarecido, puesto que por un lado hay trabajos en los que se ha demostrado que durante el PCI se inhibe la activación de NF $\kappa$ B y que su inhibición es responsable de algunos de los efectos beneficiosos del PCI;<sup>161</sup> mientras que diversos autores defienden que es la activación del NF $\kappa$ B la que contribuye a los efectos beneficiosos del PCI.<sup>162,163</sup> Además de todas estas vías de señalización celular implicadas en el PCI, también se ha indicado que el PCI puede inducir la liberación de una pequeña cantidad de RLO y de TNF- $\alpha$ , los cuales contribuyen al efecto protector del PCI.<sup>164-166</sup>

## 6.2 Papel del PCI en la lesión por I/R hepática

La modulación de la respuesta inflamatoria a través del PCI se ha evidenciado en diferentes modelos de isquemia hepática normotérmica y fría.<sup>167</sup> El PCI reduce la acumulación de neutrófilos y la generación de RLO y citoquinas proinflamatorias incluyendo TNF e IL-1. Asimismo, el PCI también mejora la perfusión sinusoidal y la disfunción microvascular, tal y como se explica a continuación.

### Acumulación de neutrófilos y alteraciones en la microcirculación

Se ha demostrado que parte del efecto protector del PCI está relacionado con la modulación de la acumulación de neutrófilos y de las alteraciones en la microcirculación. El mecanismo por el cual el PCI actúa modulando la acumulación de neutrófilos en el tejido hepático no se conoce con exactitud. Se ha demostrado que el PCI reduce la adherencia de los leucocitos tras una isquemia normotérmica; por otra parte, también hay evidencias que indican que no hay diferencias en la expresión de moléculas de adhesión tras inducir el PCI. Hay estudios que sugieren que durante el proceso de isquemia se dañan las células endoteliales, lo que facilita que los neutrófilos tengan libre acceso al tejido hepático, sin la necesidad de la expresión de moléculas de adhesión. Según esta teoría, es posible que el PCI pueda reducir la acumulación de neutrófilos mediante la reducción del daño endotelial.<sup>161,168-172</sup>

En modelos experimentales de trasplante hepático, los injertos sometidos a PCI muestran una mejoría en el flujo sanguíneo tras la reperfusión. De forma similar, los efectos beneficiosos del PCI sobre la microcirculación también se han observado en modelos de isquemia hepática normotérmica. Diversos estudios han sugerido que el PCI, mediante la generación de NO, que tiene efectos vasodilatadores, puede contrarrestar la vasoconstricción producida durante la I/R debido a

la liberación de mediadores inflamatorios como la ET y contribuir de este modo a mejorar las alteraciones en la microcirculación asociados a la I/R hepática.<sup>173-175</sup>

### **Estrés oxidativo y citoquinas**

El PCI es capaz de disminuir el estrés oxidativo asociado a la I/R hepática, ya sea preservando la estructura mitocondrial o bien, modulando la activación de las células de Kupffer.<sup>176,177</sup> Los beneficios del PCI frente al estrés oxidativo pueden además ser explicados por la inducción de antioxidantes como la SOD y las HSPs, y también por la acción del PCI sobre el mecanismo de la X/XOD.

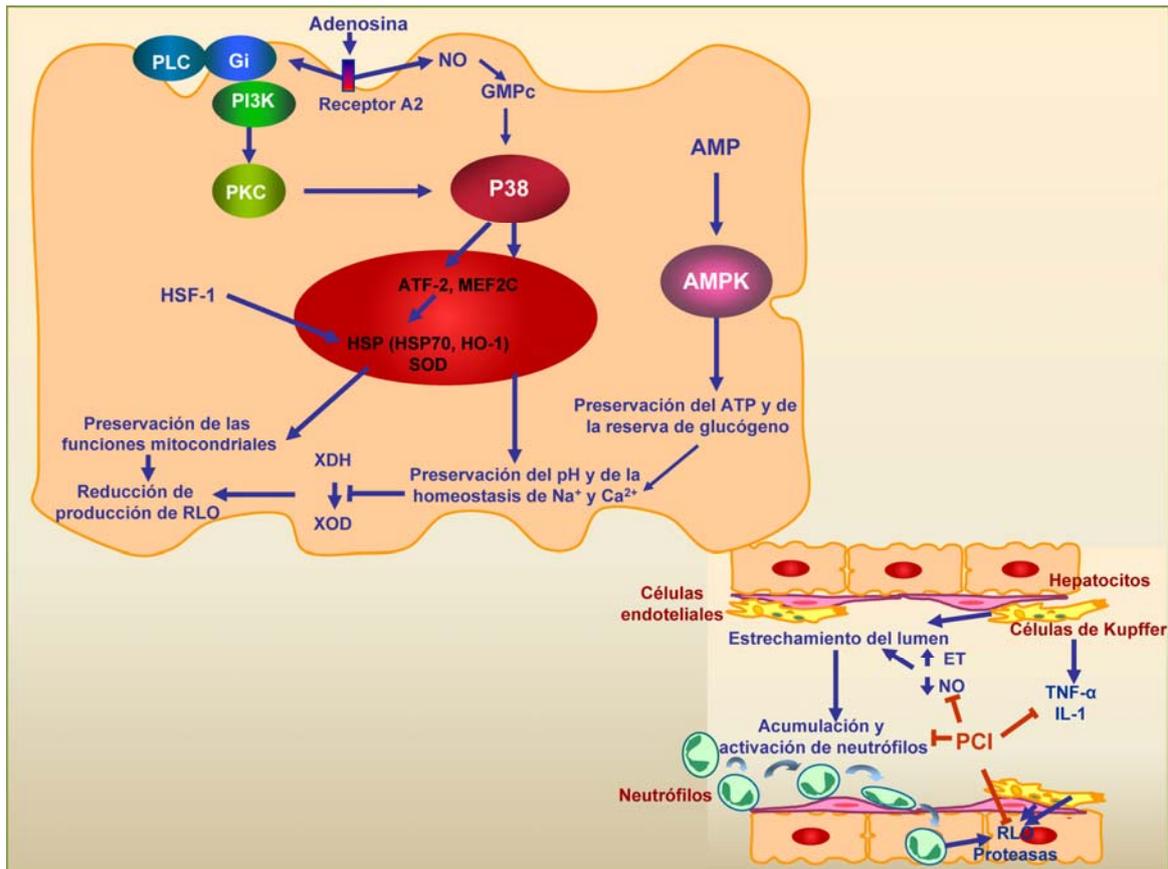
El PCI regula el sistema generador de RLO, X/XOD en isquemia hepática normotérmica y en trasplante hepático experimental. Actúa reduciendo la acumulación de xantina durante la isquemia y previniendo la conversión de la XDH a XOD, reduciendo así los efectos adversos de este sistema generador del RLO en el hígado. Los resultados obtenidos tras la administración de alopurinol (un inhibidor de la XOD) a animales sometidos a I/R o de X/XOD a animales en los que previamente se había inducido un PCI, confirman estas observaciones.<sup>178-180</sup> Los beneficios del PCI no sólo se han observado a nivel de pro-oxidantes, sino que existen estudios que demuestran que esta estrategia quirúrgica es capaz de evitar la degradación o inactivación de mecanismos antioxidantes que tienen lugar durante la isquemia.<sup>142</sup> De este modo, el PCI preserva los niveles de GSH en hígado durante el proceso de isquemia y también durante la reperusión.<sup>178,180</sup>

En relación a las citoquinas, el PCI inhibe la activación de las células de Kupffer, reduciendo de esta forma la liberación de citoquinas asociadas a la I/R hepática.<sup>133, 181</sup> Existen trabajos que demuestran también la influencia del PCI sobre la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 en procesos de I/R normotérmica.<sup>181,182,183</sup>

### **Apoptosis y necrosis**

La combinación de los efectos inducidos por el PCI anteriormente mencionados disminuye la susceptibilidad a la apoptosis y/o necrosis en respuesta a la lesión por I/R. En este sentido, se ha demostrado que el PCI reduce la muerte celular por apoptosis de los hepatocitos tras la reperusión disminuyendo los niveles de TNF- $\alpha$  y modulando la vía de las caspasas.<sup>135,184-186</sup> De la misma manera, el PCI reduce el número y la extensión de las áreas de necrosis en el tejido hepático tras una I/R hepática.<sup>179,186</sup>

En la **Figura 9** se muestran algunos de los principales mecanismos implicados en el efecto protector del PCI.



**Figura 9.** Mecanismos involucrados en los beneficios del precondicionamiento isquémico sobre el daño por I/R hepática.

### 6.3 Aplicación clínica del PCI

Los beneficios del PCI observados en modelos experimentales de isquemia hepática normotérmica y fría crearon la necesidad de ensayos clínicos de PCI. A la fecha, el PCI ha sido exitosamente aplicado en resecciones hepáticas en humanos tanto en hígados no esteatósicos como esteatósicos.<sup>142</sup> Clavien y colaboradores realizaron el primer estudio clínico, analizando el PCI en cirugía hepática humana. El PCI consistió en 10 minutos de oclusión del flujo portal y 10 minutos de reperfusion. El PCI protegió frente a la lesión hepática y este efecto fue más evidente en pacientes con esteatosis de grado leve a moderado. Este efecto protector se perdió en pacientes de 60 años y fue máximo en los pacientes más jóvenes.<sup>136</sup> Posteriormente, Chouker y colaboradores observaron que la aplicación del PCI en resecciones hepáticas, además de reducir los parámetros de lesión hepática, conllevó a una mayor estabilidad hemodinámica tras la reperfusion con respecto al grupo no precondicionado.<sup>187</sup> Adicionalmente, Li y colaboradores demostraron el efecto beneficioso del PCI en pacientes con cirrosis sometidos a hepatectomías observando un riesgo disminuido de insuficiencia hepática y tiempos más cortos de estancia en el hospital,<sup>188</sup> y por último, Nuzzo y colaboradores también evidenciaron beneficios del PCI en resecciones hepáticas con tiempos de oclusión del flujo sanguíneo más largos que los empleados en estudios anteriores.<sup>189</sup>

En el trasplante hepático, el beneficio del PCI aun está bajo evaluación. Aunque algunos estudios clínicos realizados sobre la aplicación del PCI en el trasplante hepático han indicado que el PCI reduce los niveles de transaminasas postquirúrgicas, marcadores de muerte celular y la inflamación, la mayoría de estos estudios no lograron demostrar beneficios clínicos con respecto a los pacientes

o a la supervivencia del injerto. Además, otros estudios clínicos han observado efectos adversos del PCI en el trasplante hepático. Azoulay y colaboradores fueron los primeros que demostraron en efecto protector del PCI en el trasplante hepático señalando que el PCI basado en 10 minutos de isquemia fue asociado con una mejor tolerancia a la isquemia; sin embargo, esto fue a costa de una disfunción hepática temprana.<sup>190</sup> Jassem y colaboradores concluyeron que 10 minutos de PCI es efectivo para proteger los injertos hepáticos frente a la isquemia fría, reduce la respuesta inflamatoria y resulta en una mejor función del injerto.<sup>191</sup> Cescon y colaboradores mostraron que 10 minutos de isquemia seguidos de 15 minutos de reperfusión no afecta la viabilidad del injerto y tiene un impacto positivo en los niveles de transaminasas postquirúrgicas, aunque no modifica otros parámetros clínicos.<sup>192</sup> Amador y colaboradores indicaron que el PCI disminuye las enzimas hepáticas postquirúrgicas y mejora significativamente los marcadores bioquímicos de funcionalidad hepática.<sup>193</sup> A diferencia de los estudios anteriores, Koneru y colaboradores observaron que los hígados de donantes sometidos a un PCI con 5 minutos de clampaje de los vasos hepáticos no mostraron respuesta al PCI, concluyendo que tal vez el tiempo de PCI utilizado fue demasiado corto para inducir protección.<sup>194</sup> Dos años más tarde, el mismo grupo de investigadores realizó un siguiente estudio clínico en trasplante hepático aplicando 10 minutos de PCI a los donantes de hígado y encontraron un efecto paradójico del PCI, ya que observaron mayores niveles de transaminasas en los hígados preconditionados, y sin embargo se redujo la tasa de rechazo y disfunción hepática.<sup>195</sup> Como resultado de todos los estudios anteriores, actualmente se desconoce si el PCI puede ser aplicado de forma rutinaria en la clínica del trasplante hepático. Así pues, son necesarios posteriores estudios clínicos multicéntricos y aleatorios que incluyan un mayor número de donantes y receptores para confirmar si el PCI es apropiado para el trasplante hepático en la práctica clínica.<sup>123,196</sup>

#### 6.4 PCI y esteatosis hepática

Tal y como se ha mencionado anteriormente, los hígados esteatósicos son especialmente susceptibles a la lesión por I/R asociada a la cirugía hepática, como las resecciones o el trasplante hepático. Se ha evidenciado que el PCI es capaz de proteger los hígados esteatósicos frente al daño por I/R en estudios de I/R normotérmica en distintos modelos de hígado esteatósico, así como en pacientes con esteatosis hepática sometidos a hepatectomía.<sup>83,136,174</sup> Estudios realizados en modelos experimentales de isquemia normotérmica en hígados esteatósicos han indicado que el PCI a través de la generación de NO disminuyó la lesión hepática y aumentó la supervivencia frente a un proceso de I/R reduciendo el estrés oxidativo, la acumulación de neutrófilos, las alteraciones en la microcirculación y modulando la liberación de citoquinas tales como la IL-10 y la IL-1 $\beta$ .<sup>83,182</sup> También se ha demostrado que en las mismas condiciones experimentales, el PCI contribuye a una mejor preservación y reestablecimiento de los niveles de ATP tras la reperfusión en este tipo de hígado.<sup>97</sup> Adicionalmente se ha descrito que el PPAR $\alpha$ , adiponectina,<sup>62</sup> las MAPKs p38 y JNK, HSP72, HO-1, PKC,<sup>61</sup> IL-6, y los factores de transcripción STAT3, NF $\kappa$ B, proteína activadora 1 (AP-1),<sup>197</sup> estarían implicados en las vías de señalización molecular responsables de los efectos beneficiosos del PCI sobre la lesión por I/R normotérmica en hígados esteatósicos (**Figura 10**).

En lo que respecta al trasplante hepático, los beneficios del PCI para reducir la vulnerabilidad de los hígados esteatósicos a la lesión por I/R asociada al trasplante han sido reportados en diferentes estudios experimentales de trasplante hepático.<sup>142,159,160,198</sup> Los resultados obtenidos en modelos



injertos esteatósicos. Así pues, el primer paso de estas investigaciones sería realizar estudios más exhaustivos a nivel experimental acerca de los mecanismos protectores del PCI en hígados esteatósicos sometidos a trasplante.

### **6.5 Precondicionamiento farmacológico y su aplicación clínica**

El preconditionamiento farmacológico consiste en la administración de sustancias que puedan mimetizar los efectos del PCI. En un reciente ensayo clínico, en 64 pacientes sometidos a cirugía hepática en condiciones de isquemia, se aplicó 30 minutos de preconditionamiento farmacológico con sevoflurano o anestesia con propofol. El preconditionamiento con sevoflurano redujo la lesión hepática y la incidencia de complicaciones postquirúrgicas. En dicho estudio se sugirió la sobre-regulación de la NOSi como el potencial mecanismo implicado en este efecto. Además, al igual que sucede con el PCI, el efecto beneficioso del sevoflurano fue más evidente en pacientes con esteatosis hepática.<sup>200</sup>

El inhibidor sintético de proteasas mesilato de gabexate ha sido evaluado en un estudio aleatorio con pacientes sometidos a cirugía hepática. Su aplicación intravenosa antes de la resección hepática disminuyó los marcadores del daño hepático y los niveles plasmáticos de IL-6.<sup>201</sup> Un efecto similar se demostró en un ensayo clínico que analizó el efecto de la administración pre-quirúrgica de metilprednisolona.<sup>202</sup> El preconditionamiento intraoperativo con ácido alfa lipoico también redujo los marcadores de daño hepático ocasionados por oclusión del flujo sanguíneo durante la resección.<sup>203</sup>

En lo que respecta al trasplante hepático, la administración de metilprednisolona mejoró significativamente el daño por I/R y disminuyó la incidencia de rechazo agudo.<sup>204</sup> En otro estudio, la administración sistémica pre-quirúrgica de timoglobulina disminuyó el daño por I/R después del trasplante hepático.<sup>205</sup> Por otro lado, debe mencionarse que ninguno de estos ensayos clínicos han evaluado los efectos del preconditionamiento farmacológico en injertos hepáticos esteatósicos.

### **6.6 Estrategias futuras para disminuir la lesión por I/R hepática asociada al trasplante de injertos esteatósicos**

De todo lo anteriormente descrito hasta este punto en la presente tesis, es notorio que la lesión por I/R sigue siendo un problema sin resolver en la práctica clínica del trasplante hepático con injertos esteatósicos. Aunque se han intentado estrategias terapéuticas basadas en la modulación de citoquinas, NO, RLO o de otros mediadores puntuales implicados en la lesión por I/R hepática, ninguna de ellas ha tenido su aplicación a nivel clínico.<sup>30</sup> En este sentido, actualmente se buscan nuevas dianas terapéuticas que sean capaces de modular la lesión por I/R hepática induciendo la activación de varias vías de señalización molecular y que no estén solamente enfocadas en inhibir un tipo específico de mediador implicado en la lesión por I/R hepática. Estas nuevas dianas de acción terapéutica podrían generarse a partir de las investigaciones encaminadas al estudio de los mecanismos bioquímicos y moleculares subyacentes al PCI en modelos experimentales de hígados esteatósicos sometidos a trasplante hepático. De esta manera, las estrategias terapéuticas basadas en la modulación de dichas dianas podrían mimetizar o aumentar la efectividad del PCI para reducir la lesión por I/R asociada al trasplante hepático en hígados esteatósicos y con ello conducir a futuras aplicaciones clínicas y rutinarias del PCI en el trasplante hepático. Además de lo anterior, las

estrategias terapéuticas así diseñadas podrían ser de interés tomando en cuenta que puede haber casos en los que no sea posible o sea muy difícil la aplicación del PCI. Así pues, se tendrían estrategias tanto quirúrgicas como farmacológicas que al aumentar la tolerancia de los hígados esteatósicos a la lesión por I/R asociada al trasplante hepático, minimizarían en consecuencia el riesgo inherente de disfunción o fallo que sufren los hígados esteatósicos al ser trasplantados. Esto repercutirá favorablemente en la práctica clínica en una mayor disponibilidad de injertos hepáticos para trasplantar y consecuentemente en la disminución en las listas de espera.

## 7. El Sistema Renina-Angiotensina

### 7.1 Introducción

El sistema renina angiotensina (RAS) comenzó en el riñón. La renina fue descubierta en este órgano por Tigerstedt y Bergman hace 100 años. Cincuenta años más tarde, la acción de la renina en la circulación fue clarificada considerablemente cuando se determinaron las estructuras de la Angiotensina I (Ang I) y la Angiotensina II (Ang II). El RAS ha sido tradicionalmente considerado como un sistema endocrino encargado de regular la presión sanguínea y la homeostasis del sodio. Su precursor, el angiotensinógeno, es sintetizado en el hepatocito y liberado a la circulación donde se transforma a Ang I (péptido que no tiene efectos biológicos) por acción de la renina, una enzima proteolítica sintetizada en el aparato yuxtaglomerular del riñón. La Ang I se convierte a Ang II por la acción de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE). La ACE está presente en varios tejidos, pero es muy abundante en células endoteliales. La Ang II es el principal efector del sistema RAS y una vez que se ha formado sirve como una sustancia vasopresora circulante con otras varias funciones tales como estimular la liberación de aldosterona de las glándulas adrenales. Para ejercer estas funciones endocrinas, la Ang II actúa sobre dos receptores principales, el receptor de la Ang II de tipo 1 (AT1R) y el receptor de la Ang II de tipo 2 (AT2R) (**Figura 11**). La mayoría de los efectos conocidos de la Ang II son atribuibles al AT1R. Por otra parte, se ha reportado que la unión de la Ang II al AT2R contrarresta los efectos mediados a través del AT1R a corto y largo plazo, desempeñando así una función protectora.<sup>206</sup>

Durante varias décadas el papel del RAS se ha centrado casi exclusivamente en la regulación de la presión arterial. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que numerosos tejidos y órganos generan localmente los componentes del RAS y sintetizan Ang II, la cual actúa frecuentemente a través de un mecanismo de regulación autocrino o paracrino. Estos tejidos y órganos son, por nombrar sólo algunos, el cerebro, el corazón, la médula ósea, el tejido adiposo, el hígado y el páncreas. Las investigaciones en este sentido han formado la base del concepto del RAS local independiente. Se ha demostrado que este RAS local responde a diversos estímulos de importancia fisiológicos y fisiopatológicos. Además, los péptidos de angiotensina generados localmente exhiben múltiples y nuevos efectos, tales como anti-proliferación, apoptosis, generación de RLO, secreción hormonal, pro-inflamatorios y pro-fibrogénicos, así como también efectos de vasoconstricción y vasodilatación.<sup>206,207</sup> A pesar de las nuevas funciones de la Ang II en los diversos tejidos y órganos, el significado fisiológico y la relevancia clínica siguen estando sin definir.

## 7.2 Nuevos aspectos del RAS

El eje principal del RAS, en la que la Ang II y su enzima formadora jugaban un papel primordial, ha sido cuestionado durante los últimos años. Aunque la Ang II desempeña un papel clave en la biología del RAS, no es el único péptido biológicamente activo producido por este sistema dentro de los tejidos. Los nuevos descubrimientos en el campo del RAS sugieren a un péptido de angiotensina conocido como angiotensina 1-7 [Ang (1-7)], como un potente efector endógeno del RAS.<sup>208</sup>

Además de ser un sustrato para la producción de la Ang II, la Ang I puede también convertirse en el heptapéptido Ang (1-7) por acción de una endopetidasa neutral. Alternativamente, la Ang (1-7) puede producirse directamente a partir de la Ang II por acción de la recientemente descubierta enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2). Con menor eficiencia, la ACE2 también puede formar Ang 1-7 a partir de la hidrólisis de la Ang I para producir angiotensina 1-9 [Ang (1-9)], la cual subsecuentemente genera Ang 1-7 gracias a la acción de la ACE. La ACE2 se expresa en el corazón y en el endotelio. La Ang (1-7) es un ligando endógeno para el receptor Mas, el cual parece mediar la mayoría de las acciones biológicas de la Ang (1-7) (**Figura 11**). El RNAm del receptor Mas se ha detectado en corazón, riñón y cerebro.<sup>209,210</sup>

La Ang (1-7) tiene efectos vasodilatadores y anti-proliferativos. Así pues, las investigaciones en este sentido apuntan a un papel prometedor del eje formado por ACE2, Ang (1-7) y el receptor Mas, el cual induce efectos opuestos a aquellos provocados por el eje clásico ACE, Ang II y los AT1R/AT2R. El bloqueo que ejerce la Ang (1-7) sobre la vasoconstricción inducida por la Ang II puede ser lograda a través de diferentes vías: (1) por antagonismo de los receptores AT1, (2) por inducción en la liberación de NO u otros factores vasodilatadores (tales como la prostaglandina PGI<sub>2</sub>), o (3) afectando otros péptidos biológicamente activos, tales como la bradiquinina.<sup>208</sup> Por otro lado, las acciones antiproliferativas de la Ang (1-7) cursan a través de una regulación de la actividad de la ERK1/2.<sup>211</sup>

La importancia patofisiológica de la Ang 1-7 o de cualquier otro de los péptidos producidos por el RAS depende de 3 factores: (1) la abundancia, la distribución tisular, la afinidad, y la eficiencia catalítica de las enzimas que producen el péptido; (2) la abundancia del sustrato para la reacción enzimática; y (3) la presencia y afinidad de los receptores del péptido en cuestión. Por lo tanto, quizás podría visualizarse el RAS como una cascada en la que cada péptido podría unirse a un receptor, o bien se convierte en otro producto, en función de los factores antes mencionados. Ilustrando lo anterior, la concentración de Ang II y Ang (1-7) en una situación fisiológica o patofisiológica determinada es regulada a través de un mecanismo de retroalimentación en el cual tanto la ACE como la ACE2 juegan un papel crítico. Así pues, a través de la acción catalítica de la ACE, la Ang II se forma a partir del sustrato Ang I. La ACE2, puede entonces actuar sobre la Ang II para producir Ang (1-7). A su vez, la ACE actúa entonces sobre la Ang (1-7) para producir angiotensina 1-5 [Ang (1-5)]. Así pues, es difícil predecir el resultado de las acciones entre los componentes vasoconstrictores-proliferativos y vasodilatadores-antiproliferativos del RAS. Experimentos clínicos y fisiológicos apoyan esta hipótesis. La inhibición del ACE disminuye la producción de Ang II y aumenta la Ang (1-7) a causa de: (1) la generación de Ang (1-7) a partir de

los niveles elevados de Ang I; y (2) la inhibición del metabolismo de la Ang (1-7) a causa de la acción del ACE.<sup>212,213</sup>

Las investigaciones iniciales sobre la Ang (1-7) se han centrado principalmente en el corazón y los vasos sanguíneos. La Ang (1-7) mejora en la función cardíaca, revierte la arritmia inducida por la lesión por reperfusión, restaura la contractilidad cardíaca después de un infarto al miocardio y protege frente a la disfunción cardiovascular inducida por diabetes. Sin embargo, investigaciones más recientes indican que los efectos protectores de la Ang (1-7) no se limitan al corazón, ya que ejerce efectos beneficiosos en hipertensión, enfermedad renal, preeclampsia y cáncer.<sup>210</sup> En el caso del hígado, se ha sugerido que la Ang (1-7) desempeña un papel protector en la fibrosis hepática.<sup>214</sup>

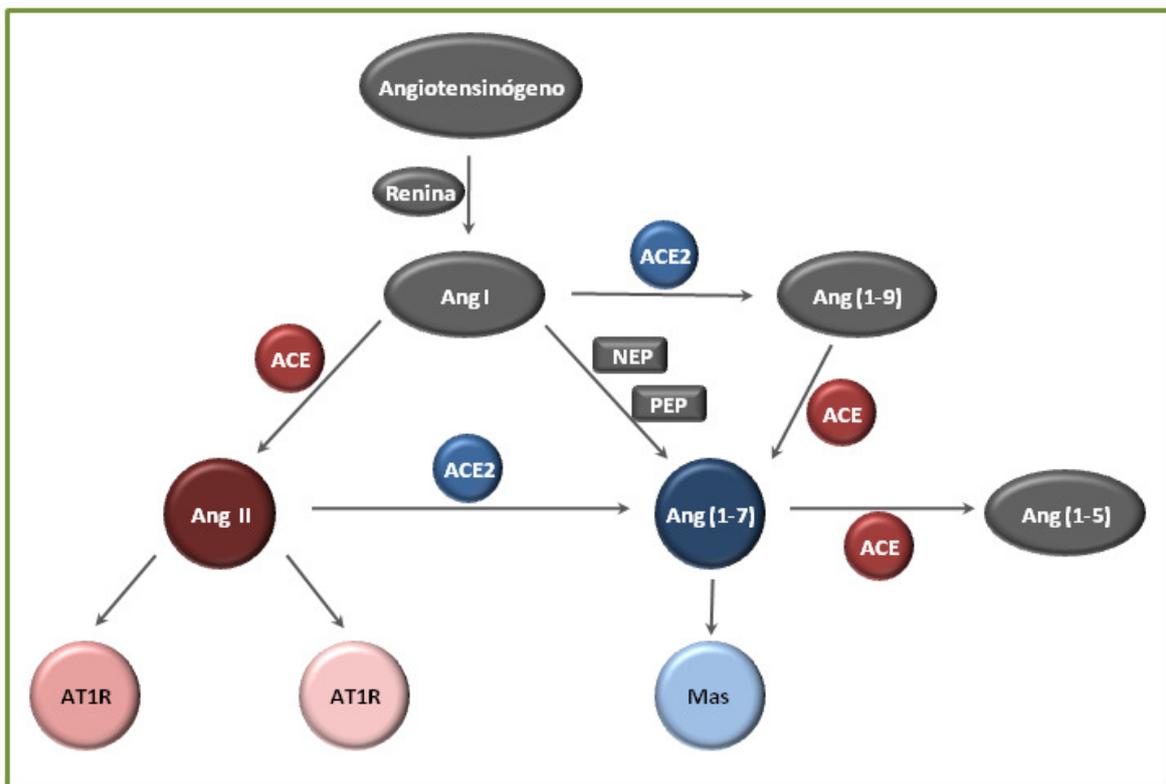


Figura 11. Cascada simplificada del Sistema Renina Angiotensina.

### 7.3 El RAS y la lesión por I/R hepática.

Estudios recientes implican a la Ang II en la lesión por I/R hepática. La administración de fármacos bloqueadores de la acción de la Ang II (inhibidores de la ACE o antagonistas de los AT1R y AT2R) protegen a los hígados esteatósicos y no esteatósicos frente a la lesión por I/R normotérmica. En el caso de los hígados no esteatósicos, se han descrito algunos de los mecanismos implicados en las acciones pro-inflamatorias de la Ang II en hígados no esteatósicos tales como el estrés oxidativo, citoquinas pro-inflamatorias y acumulación de neutrófilos; por otro lado, se sabe muy poco acerca de los mecanismos de señalización implicados en las acciones perjudiciales de la Ang II en hígados esteatósicos sometidos a I/R normotérmica.<sup>215-219</sup>

En el contexto de la I/R fría asociada al trasplante hepático, se ha demostrado la efectividad de un inhibidor de la ACE para reducir el daño hepático por I/R en hígados no esteatósicos.<sup>219</sup> Los efectos

beneficiosos de dicho tratamiento farmacológico estuvieron asociados con una mejora en la microcirculación hepática y una disminución de las interacciones entre leucocitos y células endoteliales. Los inhibidores de la ACE son ampliamente utilizados en la práctica clínica.<sup>220, 221</sup> Sin embargo, se han evidenciado casos de hepatotoxicidad y problemas biliares después de tratamientos que implican la inhibición de la ACE.<sup>222,223</sup> Por otra parte estudios previos han indicado que el losartán, un antagonista de los receptores AT1, es tan efectivo como el captopril en lo que respecta a sus efectos cardiovasculares, pero con menores efectos colaterales adversos.<sup>224</sup> Así pues, los antagonistas de los receptores de la Ang II tal vez podrían ser una estrategia farmacológica más segura que los inhibidores de la ACE para proteger contra el daño por I/R asociado al trasplante hepático. El efecto de antagonistas de los receptores de la Ang II en el trasplante de hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos no ha sido investigado.

En relación al eje ACE2-Ang (1-7)-Mas recientemente descrito, hasta la fecha no existe ningún dato sobre la implicación de este sistema en la lesión por I/R hepática. Sin embargo, teniendo en cuenta que la Ang (1-7) tiene efectos sobre el AT1R y el NO,<sup>208</sup> y que tanto el AT1R como el NO están involucrados en la lesión por I/R hepática normotérmica en hígados esteatósicos y no esteatósicos,<sup>83,215</sup> es posible considerar que la Ang (1-7) esté desempeñando un papel en la lesión por I/R hepática asociada al trasplante hepático de injertos esteatósicos y no esteatósicos.

#### 7.4 EL RAS y el PCI

Es conocido que la inhibición de los receptores AT1 reduce la lesión por I/R en miocardio y aumenta la protección ejercida por el PCI.<sup>225-227</sup> Se sabe además que la bradiquinina está implicada en los beneficios del PCI en miocardio.<sup>227</sup> También se ha descrito que el NO, uno de los mediadores claves del efecto protector del PC en I/R hepática, tiene efectos sobre el RAS. En corazón, el NO reduce la activación del receptor AT1 e inhibe la secreción de Ang II.<sup>228,229</sup> Por otro lado, debe mencionarse también que existen controversias acerca del papel del RAS en los beneficios del PCI, ya que otros estudios en corazón indican que la inhibición de los receptores AT1 elimina la protección del PCI, e incluso que la administración de Ang II mimetiza los efectos beneficiosos del PCI.<sup>230,231</sup>

En hígado únicamente existe un estudio que ha evaluado la implicación del RAS en los mecanismos protectores del PCI. En dicho estudio se ha descrito que el PCI, a través de la inhibición de la IL-1, reduce Ang II en hígados esteatósicos sometidos a I/R hepática normotérmica, pero esto no sucedió así en hígados no esteatósicos. La reducción de Ang II observada en hígados esteatósicos fue asociada con generación de bradiquinina y con un aumento en la expresión del Receptor activador de la proliferación de peroxisomas gamma (PPAR $\gamma$ ).<sup>215</sup>

Considerando que los mecanismos de señalización involucrados en los efectos protectores del PCI en hígado son diferentes dependiendo de si se trata de I/R normotérmica o de I/R fría, no se sabe si el RAS estaría desempeñando un papel en el PCI en trasplante hepático. En este sentido, las investigaciones encaminadas a estudiar la implicación del RAS en la fisiopatología de la lesión por I/R en hígados esteatósicos sometidos a trasplante hepático, así como su implicación en los mecanismos de protección del PCI en las mismas condiciones quirúrgicas, podrían sentar las bases para que el PCI pueda tener nuevas aplicaciones en la clínica del trasplante hepático; así como

para establecer nuevas estrategias terapéuticas basadas en tratamientos farmacológicos que mimeticen o aumenten los efectos protectores del PCI y que por lo tanto sean de utilidad para aumentar la tolerancia de los injertos esteatósicos sometidos a trasplante hepático, contribuyendo así a aumentar el número de hígados disponibles para trasplantar.

## 8. La proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP4) y el PPAR $\gamma$

### 8.1 El RBP4 y la lesión por I/R hepática

El término “adipoquina” o “adipocitoquinas” (citoquinas del tejido adiposo) comprende a factores polipeptídicos, los cuales son producidas mayoritariamente en el tejido adiposo. Además de los adipocitos, el tejido adiposo está compuesto del estroma que incluye macrófagos, fibroblastos y monocitos que se han infiltrado, los cuales contribuyen a la producción de adipocitoquinas. En los últimos años, las investigaciones se han centrado en las adipocitoquinas como potenciales dianas terapéuticas en distintas patologías relacionadas con la obesidad y el síndrome metabólico. Las adipocitoquinas regulan la esteatosis, inflamación y fibrosis.<sup>232</sup> Por lo tanto, es posible que las adipocitoquinas puedan estar implicadas en la vulnerabilidad de los hígados esteatósicos a la lesión por I/R. Esto derivaría en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas de utilidad para reducir la lesión por I/R en el trasplante de injertos hepáticos esteatósicos.

El RBP4 es una adipocitoquina sintetizada en el hígado, cuya función conocida es transportar retinol en la circulación. Sin embargo, el papel del RBP4 en el hígado es en gran parte desconocido.<sup>233-235</sup> Desde el descubrimiento del RBP4 en 1992, diversos estudios han demostrado que los niveles de RBP4 están elevados en diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares e inflamación.<sup>234,236-239</sup> Existe una correlación positiva entre altos niveles circulantes de RBP4 e infiltración grasa en hígado, tanto en modelos experimentales como en humanos.<sup>236,240,241</sup> Los niveles circulantes de RBP4 están elevados cuando el hígado sufre un daño, debido a que el hígado es la principal fuente generadora de esta adipocitoquina.<sup>241</sup>

Diversos trabajos en la literatura se han centrado en investigar los mecanismos de acción del RBP4 en diferentes patologías. Se ha descrito que el RBP4 por sí mismo puede ejercer efectos pro-inflamatorios a través de alterar la producción de otras adipocitoquinas o citoquinas inflamatorias.<sup>234,239,242,243</sup> A título de ejemplo, aumentos en los niveles plasmáticos de RBP4 observados en pacientes obesos, están asociados con aumentos en marcadores inflamatorios como el TNF y MCP-1.<sup>234</sup> Además el RBP4 afecta la generación de adiponectina en pacientes obesos y en determinadas patologías como la diabetes.<sup>243</sup> Notoriamente, el TNF, MCP-1 y la adiponectina son mediadores implicados en la lesión por I/R hepática.<sup>30</sup>

Teniendo en cuenta estas observaciones, se puede considerar la posibilidad de que los injertos hepáticos esteatósicos al ser sometidos a trasplante generen RBP4, y que esta adipocitoquina sea responsable de la vulnerabilidad que presenta este tipo de hígados a la lesión por I/R asociada al trasplante hepático. Hasta la fecha, la posibilidad de que la reducción de los niveles de RBP4 podría proteger a los hígados esteatósicos frente a la lesión por I/R asociada con el trasplante no ha sido evaluada. Existen diferentes trabajos encaminados a modular farmacológicamente la acción

del RBP4. La administración de fenretinida ha sido efectiva como tratamiento en diabetes de tipo 2 ya que ha logrado reducir los niveles plasmáticos de RBP4.<sup>236</sup> Otra posibilidad farmacológica para bloquear la acción del RBP4 consistiría en la administración de anticuerpos anti-RBP4 o en terapias basadas en interferencia del RNA del RBP4. Los anticuerpos anti-RBP4 únicamente se han utilizado *in vitro*,<sup>244</sup> y se desconoce si estos anticuerpos pueden llegar en concentraciones óptimas y en el momento adecuado al lugar de acción para que ejerzan su efecto sobre el RBP4. Por el otro lado, no hay estudios acerca de la eficacia del tratamiento con siRNA de RBP4 *in vivo*, pero podría tener interés teniendo en cuenta que estas terapias génicas basadas en la interferencia del RNA pueden cumplir criterios necesarios para su posible utilización clínica, tales como especificidad en los efectos de silenciamiento y eficacia *in vivo*.<sup>125</sup> Por otra parte, se tendría que evaluar la transfección génica de estos siRNA de RBP4 ya que en muchos casos cuando se utiliza una terapia génica,<sup>62,126-129</sup> se ha de pre-tratar al donante al menos 24 horas antes de su extracción e implantación en el receptor para conseguir una transfección génica eficaz en el injerto, lo cual tiene sus limitaciones en la práctica clínica.

## 8.2 Los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPARs) y la lesión por I/R hepática

Los peroxisomas son orgánulos subcelulares del hepatocito que contienen una batería de enzimas antioxidantes que protegen los hepatocitos del daño por oxidantes. La proliferación de los peroxisomas en los hepatocitos es inducida, al menos en parte, por la activación de los PPARs.<sup>245</sup> Los PPARs pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares hormonales o factores de transcripción dependientes de ligandos. Cuando se activan, estos factores de transcripción ejercen varias funciones en el desarrollo y el metabolismo. Después de que el PPAR es activado por ligandos, sufre cambios conformacionales específicos que permiten el reclutamiento de una o más proteínas coactivadoras. Los ligandos difieren en su habilidad para interactuar con los coactivadores, lo cual explica las variadas respuestas biológicas observadas.<sup>246</sup>

La superfamilia del PPAR consiste de tres miembros PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$ . Se ha descrito que el PPAR $\alpha$  y el PPAR $\gamma$  desempeñan un papel en la inflamación.<sup>246</sup> Los pocos resultados que hay sobre el papel de estos factores de transcripción en I/R hepática no son concluyentes. Por ejemplo, en el caso del PPAR $\alpha$  existen dos estudios realizados en isquemia hepática normotérmica parcial de 90 minutos en hígados no esteatósicos, en los cuales la administración de un agonista específico del PPAR $\alpha$  redujo el daño hepático inducido por I/R.<sup>245,247</sup> Otro estudio indicó que el PPAR $\alpha$  no desempeña un papel crucial en el daño por I/R en hígados no esteatósicos sometidos a 60 minutos de isquemia normotérmica parcial.<sup>62</sup> En cuanto a la relevancia del PPAR $\gamma$  en la lesión hepática por I/R en hígados no esteatósicos, existen diferentes resultados acerca del efecto de la administración de agonistas del PPAR $\gamma$  frente al daño hepático inducido por la I/R normotérmica parcial.<sup>248-252</sup> En el caso de los hígados esteatósicos, el pretratamiento con agonistas del PPAR $\alpha$  o del PPAR $\gamma$ , así como también la inducción de PCI a través de la sobre-expresión de PPAR $\alpha$  o PPAR $\gamma$ , protege este tipo de hígados frente a la lesión inducida por I/R normotérmica.<sup>62,215</sup> El papel de los PPARs en el trasplante hepático de injertos esteatósicos aun no ha sido identificado.

### 8.3 Relación entre RBP4 y PPAR $\gamma$

Se ha descrito que existe una relación entre el PPAR $\gamma$  y el RBP4 en el tejido adiposo de ratones y en sujetos diabéticos.<sup>236,253,254</sup> Apoyando lo anterior, se ha reportado además que los agonistas del PPAR $\gamma$  pueden prevenir determinadas patologías como la diabetes de tipo 2 a través de regular dianas moleculares del RBP4 como son la adiponectina y TNF.<sup>255,256</sup>

Hasta la fecha, no existen datos respecto a la capacidad del PCI de modificar los niveles de RBP4 en hígados sometidos a I/R. Sin embargo, esta posibilidad no debería ser descartada, ya que estudios previos realizados por nuestro grupo sugieren que el PCI es capaz de actuar sobre las dianas moleculares del RBP4, como la adiponectina y el TNF en I/R hepática normotérmica.<sup>62,183</sup> Por otra parte, se ha descrito que el PCI ejerce sus efectos beneficiosos en hígados esteatósicos sometidos a I/R normotérmica a través de aumentar la expresión del PPAR $\gamma$ .<sup>215</sup> Así pues, considerando todo lo anteriormente descrito en este apartado, cabe la posibilidad de que el PCI esté modulando tanto al RBP4 como al PPAR $\gamma$ , y que ambos estén relacionados en la lesión por I/R asociada al trasplante hepático de injertos esteatósicos.