

TESIS DOCTORAL

EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO COMO ESTRATEGIA QUIRÚRGICA ÚTIL EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO CON INJERTO DE TAMAÑO REDUCIDO



Rosa Franco Gou

**Universidad de Barcelona
Departamento de Fisiología Animal
2006**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES

En el hígado, glándula accesoria del aparato gastrointestinal, encontramos diferentes tipos celulares:

- Los hepatocitos, son las células que forman el parénquima hepático. Desde el punto de vista metabólico, son células muy complejas que realizan múltiples funciones, entre las que se encuentran la obtención, el almacenaje y la liberación de un gran número de nutrientes. En los hepatocitos se sintetizan proteínas plasmáticas, lipoproteínas, ácidos grasos, el colesterol, fosfolípidos y glucosa y se lleva a cabo la detoxificación de productos tóxicos del organismo (1-4).

- Las células endoteliales, forman parte de la pared de los sinusoides hepáticos y están separadas de los hepatocitos por el espacio de Disse. Entre estas células existen grandes fenestraciones por donde hay un intercambio de fluidos y macromoléculas entre el sinusoides y el espacio de Disse. Las células endoteliales participan activamente en la inflamación, liberando citoquinas y óxido nítrico (NO) frente determinados estímulos (1-4).

- Las células de Kupffer, son los macrófagos del hígado y se encuentran situadas en la superficie de las células endoteliales. Fagocitan eritrocitos viejos y eliminan bacilos que intentan introducirse en la circulación portal. Su activación, por distintos estímulos, lleva a la generación de mediadores citotóxicos, como interleuquinas, radicales libres de oxígeno (RLO) y proteasas.

- Las células estrelladas, se encuentran en el espacio de Disse. Estas células sintetizan proteínas de la matriz extracelular, son el principal reservorio de vitamina A del organismo y son importantes mediadores de procesos de reparación del hígado (1-4).

El hígado recibe sangre a partir de la vena porta, proveniente del intestino, páncreas y bazo, y de la arteria hepática, una rama del tronco celíaco, proveniente de la aorta. El hígado se puede dividir siguiendo un criterio funcional; así la vena porta se bifurca en dos ramas que dividen al hígado en dos partes, izquierda y derecha. Cada mitad tiene un aporte sanguíneo independiente, tanto desde la vena porta como desde la arteria hepática; de la misma manera, el drenaje biliar también es independiente. Cada una de las dos ramas de la vena porta se bifurca en dos, dividiendo al hígado en cuatro sectores, que a su vez se dividen en 8 segmentos (Figura 1.1). Cada segmento tiene su propio pedículo vascular y biliar, así como su drenaje venoso. La clasificación

obtenida de este modo facilita la realización de resecciones hepáticas y las técnicas de trasplante parcial (técnica de Split y trasplante de donante vivo).

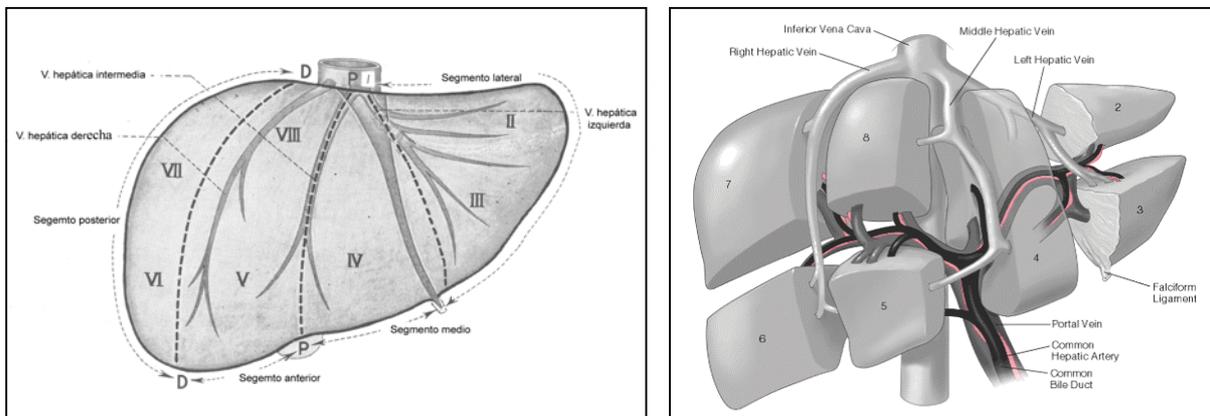


Figura 1.1. Esquema de la segmentación del hígado en su cara diafragmática. El trayecto de las principales venas hepáticas indica su relación con las fisuras. D, fisura derecha; P, fisura principal o sagital; I, fisura izquierda.

1.2. TRASPLANTE HEPÁTICO

El trasplante hepático ortotópico es actualmente una opción terapéutica efectiva para pacientes que sufren enfermedades crónicas en fase terminal y insuficiencia hepática aguda (5). Entre las enfermedades susceptibles de trasplante hepático encontramos la insuficiencia hepática por hepatitis crónica o cirrosis de cualquier etiología, la insuficiencia hepática aguda grave, algunos tumores hepáticos, las anomalías hepáticas congénitas, las enfermedades genéticas o los trastornos metabólicos cuya deficiencia reside en el hígado (tanto si originan enfermedad hepática como si la repercusión del trastorno metabólico es fuera del hígado) y, por último, el fracaso del hígado trasplantado (6).

Desde que en 1963 se realizó el primer trasplante hepático con éxito en el hombre, se han sucedido mejoras en los diferentes aspectos relacionados con el trasplante hepático, como son el método de selección de candidatos, la preservación del órgano, las técnicas experimentales y la inmunosupresión.

En España, el número de donaciones de órganos y trasplantes de hígado suponen las tasas por millón de habitantes más elevadas del mundo y la media de tiempo de espera de trasplante hepático es menor que en el resto de Europa (7). Sin embargo, en contraste con estas cifras que denotan un beneficio en la supervivencia, existe un progresivo crecimiento de la lista de espera, lo que lleva a que un número

considerable de pacientes mueran esperando un hígado con posibilidad de ser transplantado.

La cirugía del trasplante hepático se puede dividir en dos fases: cirugía del donante y cirugía del receptor (6), que son explicadas con detalle a continuación.

1.2.1. CIRUGÍA DEL DONANTE

Extracción del órgano: después de la exploración de la cavidad abdominal con el fin de valorar el tamaño, color y consistencia del órgano, se disecciona el retroperitoneo inframesocólico, aislando la aorta abdominal, a nivel de la bifurcación, y la vena cava inferior con el fin de realizar una canulación rápida de los vasos en caso de necesidad. Posteriormente, se identifica y se disecciona el hilio hepático (arteria hepática, vena porta y colédoco) y se pasa a canular la aorta abdominal y el sistema portal para profundizar el líquido de preservación, y se canula la vena cava inferior para facilitar la exsanguinación e impedir el edema. Ya el hígado liberado de sus elementos de fijación ligamentosos, se procede a seccionar la vena cava infrahepática, por encima de las renales, la aorta abdominal con el tronco celiaco e incluso el ostium de la arteria mesentérica superior y, por último, parte del diafragma.

Transporte del órgano y cirugía del banco: el órgano se introduce en un recipiente hermético, estéril, que contiene la solución de preservación a 4°C. Este recipiente se coloca en una nevera portátil, llena de hielo. La cirugía del banco tiene como finalidad examinar, en condiciones de hipotermia (4°C), el órgano y preparar los cabos vasculares para su posterior anastomosis. Básicamente, se realiza la disección de la vena cava supradiafragmática, la vena cava infrahepática, la vena porta, el tronco celíaco y la vía biliar.

Preservación del órgano: se intenta satisfacer los requerimientos metabólicos durante el almacenamiento y proteger las células frente a los efectos adversos de la isquemia (falta de aporte sanguíneo). La solución de preservación más empleada es la solución de la Universidad de Wisconsin (UW), que se basa en: a) el uso de la rafinosa y el lactobionato (en lugar de la glucosa) para suprimir el edema celular inducido por la hipotermia, b) tampones apropiados (KH_2PO_4) que evitan la acidosis intracelular, c) los coloides (hydroxyethyl starch, HES), para mantener la integridad del espacio intersticial, d) los inhibidores de los RLO (glutati6n y alopurinol) y e) los precursores del ATP (adenosina y adenina) que mantienen el estado energético celular y permiten una funci6n adecuada de la bomba de sodio-potasio.

1.2.2. CIRUGÍA DEL RECEPTOR

Fase de hepatectomía: la disección del hígado debe comenzar buscando un plano adecuado por fuera de la cápsula del hígado. Posteriormente se identifican y liberan las diferentes estructuras del hilio hepático y se liga la arteria hepática. La disección de la vía biliar se realiza tras la sección entre unas determinadas ligaduras. A continuación, se disecan la vena porta y la vena cava. En este momento se extirpa el hígado, después de haber colocado clamps vasculares (que interrumpen el flujo sanguíneo) en vena porta, en cava infrahepática y cava suprahepática.

Fase anhepática: durante esta fase se origina la interrupción brusca del retorno venoso de las venas porta y cava inferior, lo que provoca congestión venosa en el territorio esplácnico, así como disminución de la presión arterial pulmonar y del gasto cardíaco. Se retira el hígado del campo quirúrgico y se preparan los pedículos vasculares, para la reconstrucción vascular.

Fase del implante: en esta fase los aspectos técnicos son muy críticos. Se realiza la anastomosis (unión de los cabos vasculares del hígado donante y receptor) de la vena cava suprahepática, vena cava infrahepática, de la vena porta, la arteria hepática y se procede a la reconstrucción biliar.

Fase de revascularización o reperfusión: al finalizar las anastomosis venosas se procede a la revascularización del injerto, retirando los clamps vasculares. Es importante comprobar que el injerto se revasculariza de forma rápida, homogénea y que adquiere una consistencia adecuada.

1.3. SÍNDROME DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN

1.3.1. INTRODUCCIÓN

El síndrome de isquemia/reperfusión (I/R) tiene lugar en el proceso de trasplante de un órgano y corresponde al daño no inmunológico del injerto que resulta de los procesos perioperatorios implicados en la extracción, la preservación y la reperfusión del hígado donante. El síndrome de I/R tiene lugar cuando el órgano se ve privado temporalmente del aporte sanguíneo (isquemia) y se manifiesta cuando posteriormente se reestablece el flujo sanguíneo (reperfusión).

1.3.2. RELEVANCIA QUIRÚRGICA

El procedimiento estándar para el trasplante hepático se inicia con la extracción del órgano de un donante en situación de muerte cerebral y a corazón no-

parado. La preservación del injerto se realiza mediante la infusión de solución UW a 4°C; aquí comienza el periodo de isquemia fría que suele durar en la práctica clínica de 6 a 8 horas. Tras este periodo de isquemia fría, el órgano será sometido a una fase de isquemia caliente que empieza cuando se coloca en la cavidad abdominal del receptor y se realiza la anastomosis de los vasos sanguíneos. Una vez conectados los vasos sanguíneos, se reestablece el flujo sanguíneo y empieza la reperfusión del injerto. Por último, se conecta el conducto biliar.

En el trasplante de donante vivo la extracción del hígado se hace a partir de un donante sano y vivo y al coordinar la intervención del donante y receptor, el tiempo de isquemia fría es mucho menor que en el caso del donante cadavérico.

Durante todo el proceso se pueden producir situaciones que contribuyen al desarrollo de la lesión por I/R. En el caso del trasplante de donante vivo se minimizan los problemas concernientes al donante ya que es un hígado sano. En la preservación y reperfusión del injerto tienen lugar cambios estructurales que se acentúan cuanto mayor es el tiempo de isquemia fría. Las lesiones de preservación se producen durante el periodo de extracción e implantación del hígado donante, debido a la falta de flujo sanguíneo y estas lesiones se pueden agravar cuando el hígado ya está implantado en el receptor ocasionando lesiones de reperfusión. En el receptor, la gravedad de la lesión por I/R depende de la duración del periodo de isquemia fría y caliente sufrida por el injerto, de la reducción de flujo sanguíneo desde la vena porta o la arteria hepática, de la duración del procedimiento, de posibles episodios de hipotensión intraoperatorios y del grado de isquemia esplácnica.

1.3.3. DISFUNCIÓN PRIMARIA DEL INJERTO

El síndrome de I/R es una de las causas principales tanto de la disfunción primaria como del fallo primario del injerto (8); además de la insuficiencia pulmonar y del fallo multiorgánico asociado al trasplante hepático.

Después de un trasplante hepático siempre se da alguna disfunción clínica o bioquímica, la severidad de la cual depende del grado de lesión hepática. Esta lesión temprana recibe el nombre de disfunción primaria del injerto (DPI). Esta disfunción puede ir desde una función pobre del injerto, hasta el fallo primario del injerto (FPI), siendo, en este último caso, necesario el retrasplante (8). En España, según el "Registro Español de Trasplante Hepático", el FPI es la segunda causa de retrasplante después de las complicaciones técnicas y el rechazo inmunológico, siendo responsable del 82.1% de los retrasplantes durante la primera semana después del trasplante hepático (7).

1.4. ESTRATEGIAS PARA AUMENTAR EL NÚMERO DE INJERTOS

El mayor factor limitante para la aplicación del trasplante hepático es la falta de órganos donantes; de esta manera, no todos los pacientes que podrían beneficiarse del trasplante pueden recibir un injerto (9). La diferencia entre el número de órganos disponibles y el número de receptores potenciales va en aumento por las siguientes razones: por el incremento de las indicaciones para el trasplante, por el descenso de las contraindicaciones a causa de los avances técnicos y en el campo de la anestesiología y por el aumento de la mortalidad debido a enfermedades hepáticas (9).

Para subsanar el déficit de órganos se han adoptado diferentes estrategias. Gracias a la experiencia de los equipos y a los excelentes resultados logrados en el trasplante hepático se han modificado los criterios de selección de órganos; así, la edad máxima y media de los donantes se ha ampliado y este factor ya no es limitante a la hora de aceptar un hígado para ser trasplantado (7,10-13). Por otra parte, han dejado de ser rechazados los órganos de personas que padecían algunas enfermedades crónicas, como la hipertensión arterial o la diabetes mellitus. A pesar de esto, actualmente, alrededor de un 20% de los injertos son desechados por no ser considerados aptos para el trasplante (7)

Otra estrategia para aumentar el número de trasplantes ha sido el desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas utilizadas en clínica, como son la técnica de Split, el trasplante de donante vivo, el trasplante dominó y el trasplante a corazón parado:

Técnica de Split. La técnica de Split o bipartición hepática se basa en la obtención de dos injertos hepáticos a partir de un único injerto de un donante cadavérico.

Trasplante de donante vivo. Se trata de obtener un injerto de tamaño reducido proveniente de un donante vivo.

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 (14,15). Ésta es una enfermedad metabólica crónica, en la que el hígado posee una estructura y función correctas, salvo la síntesis anómala de la proteína transferrina, que provoca el depósito de sustancia amiloide en varios órganos, pero sobre todo en el sistema nervioso autónomo. Así, un paciente que sufre esta enfermedad es trasplantado y su hígado puede ser aprovechado por un receptor de edad avanzada o por aquellos que presenten 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 la polineuropatía amiloidótica familiar (16,17).

Donante a corazón parado. En los inicios del trasplante hepático los donantes a corazón parado eran la única fuente de órganos, hasta que se aceptó el concepto de muerte encefálica (cese irreversible en las funciones encefálicas). El donante a corazón parado puede ser controlado o no controlado, haciendo referencia a si la muerte del donante se ha producido, o no, en una situación controlada. La mayoría de centros han abandonado el uso de los donantes no controlados, debido a que el tiempo de isquemia caliente (periodo en el que el órgano no está irrigado por sangre arterial y permanece en el interior del organismo) es desconocido y prolongado, lo cual lleva a un índice elevado de problemas en el injerto. En cambio, los donantes controlados pueden ser una fuente de hígados donantes (9). La experiencia en este tipo de trasplante es muy limitada y los datos disponibles no son tan alentadores (18-20).

1.5. TRASPLANTE HEPÁTICO DE TAMAÑO REDUCIDO

El trasplante hepático de tamaño reducido (RSHT) se desarrolló con el fin de disminuir la mortalidad asociada a la falta de órganos cadavéricos disponibles y por la necesidad de injertos de pequeño tamaño para receptores pediátricos y adultos de poco peso. El RSHT engloba al conjunto de técnicas que reducen un hígado nativo en un injerto de menor tamaño (21).

La utilización de injertos hepáticos reducidos se encuentra asociada con una importante tasa de disfunción primaria del injerto (22). La reducción del hígado supone generalmente un proceso prolongado, pudiendo producirse periodos de hipotermia inadecuados. Sin embargo, la utilización de injertos reducidos de donante vivo no presenta esta tendencia, debido a los cortos periodos de isquemia fría que soportan (23).

Tipo de injerto	Segmentos hepáticos					
Derecho completo	V	VI	VII	VIII	±	I
Izquierdo completo	II	III	IV	±	I	
Lateral izquierdo	II	III				
Izquierdo extendido	I	IV	V	VI	VII	VIII

Tabla 1.1. Diferentes tipos de injertos de tamaño reducido.

La anatomía en segmentos del hígado permite dividir este órgano en unidades funcionales independientes, con aportes sanguíneos (venosos y arteriales) separados, y de igual manera, con flujos sanguíneos de salida y drenajes biliares independientes (21). Estas unidades se presentan en la tabla 1.1.

A continuación se describen las tres técnicas incluidas en el RSHT.

1.5.1. TRASPLANTE HEPÁTICO DE TAMAÑO REDUCIDO CADAVÉRICO

La técnica del trasplante de hígado reducido consiste en la reducción de un hígado proveniente de un donante cadavérico de gran tamaño para acoplarlo a un receptor de menores proporciones y con su aplicación ha disminuido considerablemente la mortalidad infantil en los pacientes en espera de un injerto hepático. El trasplante hepático reducido permite tratar a niños menores de nueve meses de sus afecciones hepáticas

Fue en 1975 cuando Starzl realizó el primer trasplante hepático de tamaño reducido, aunque sin éxito (24). En 1984, Broelsch y Bismuth, simultáneamente, llevaron a cabo este proceso con éxito (25,26).

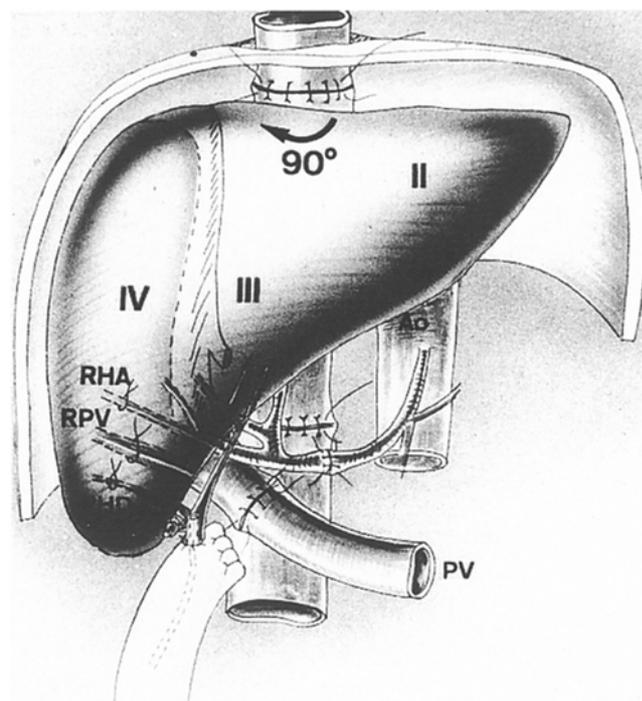


Figura 1.2. Vista esquemática de un injerto de tamaño reducido después del trasplante.

El tipo de injerto escogido depende básicamente de la diferencia de tamaño entre donante y receptor. El injerto derecho completo cabe, normalmente, en un receptor de la mitad de tamaño del donante, mientras que el injerto izquierdo completo permite una relación de tamaño donante-receptor de 4:1. En el caso del injerto lateral izquierdo, se maneja una relación de tamaño donante-receptor de 10:1 (21). Sin embargo, la decisión final se toma después de visualizar el hígado donante y la fosa

hepática del receptor. Es ideal que la reducción del injerto se realice por un equipo diferente, al mismo tiempo que se realiza la hepatectomía del receptor, para minimizar el tiempo de la isquemia fría.

Se ha demostrado que esta técnica es tan efectiva como el trasplante de un injerto hepático entero (27,28), con una supervivencia al año del 80%. El trasplante reducido de donante cadavérico elimina el problema de la diferencia de tamaño entre donante y receptor.

1.5.2. TRASPLANTE HEPÁTICO SPLIT

En el trasplante hepático Split, se obtienen dos injertos a partir de un donante cadavérico y se trasplantan en dos receptores distintos. El primero en realizar este tipo de trasplante fue Pichlmaer en 1988 (29).

Según donde se realice la división del hígado obtendremos injertos de diferentes tamaños:

-Si la hemihepatectomía se realiza a la izquierda de la línea de Cantlie, se obtiene un injerto derecho completo y un injerto lateral izquierdo. El segmento IV se descarta.

-Si la línea de división es la línea de Cantlie se obtienen los dos injertos completos, el derecho y el izquierdo.

-Cuando la división se realiza a lo largo del ligamento falciforme, se obtiene un injerto derecho extendido y un injerto lateral izquierdo.

La técnica de Split es similar a la utilizada en el trasplante de tamaño reducido, pero en este caso se tienen que cuidar las dos mitades separando cuidadosamente los vasos y los conductos biliares.

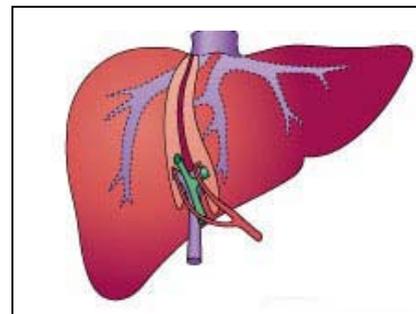


Figura 1.3. Incisión para obtener dos injertos.

El trasplante hepático Split se utilizó al principio, en situaciones de emergencia y no se obtuvieron buenos resultados, sobre todo con los injertos de la mitad derecha (30). En sus inicios esta técnica fue desarrollada para receptores pediátricos, luego se utilizó para trasplantar a un receptor pediátrico y a un adulto y con posterioridad se ha utilizado para trasplantar a dos adultos (uno de ellos con peso inferior a 60 kg) (26,31,32). Actualmente, se han obtenido mejores resultados, con una supervivencia al

año del 75% (The European Split Liver Registry, J de Ville de Goyet, JB Otte, personal communication).

Con esta técnica se aumenta el número de injertos a trasplantar, aunque presenta una serie de inconvenientes: son necesarios dos o tres equipos médicos, dos salas de operaciones, dos equipos de anestesiología, los tiempos de isquemia fría son elevados y es una técnica muy compleja.

1.5.3. TRASPLANTE HEPÁTICO DE DONANTE VIVO

En el trasplante hepático de donante vivo el injerto se obtiene de una hepatectomía de un familiar del receptor. Esta técnica representa un gran avance para superar la falta de órganos en pacientes pediátricos y se pudo desarrollar gracias a la experiencia previa con el trasplante Split (21). En 1988 se reportó el primer caso en niños, y en 1994 se reportó el primer caso de un trasplante hepático a un receptor adulto (33).

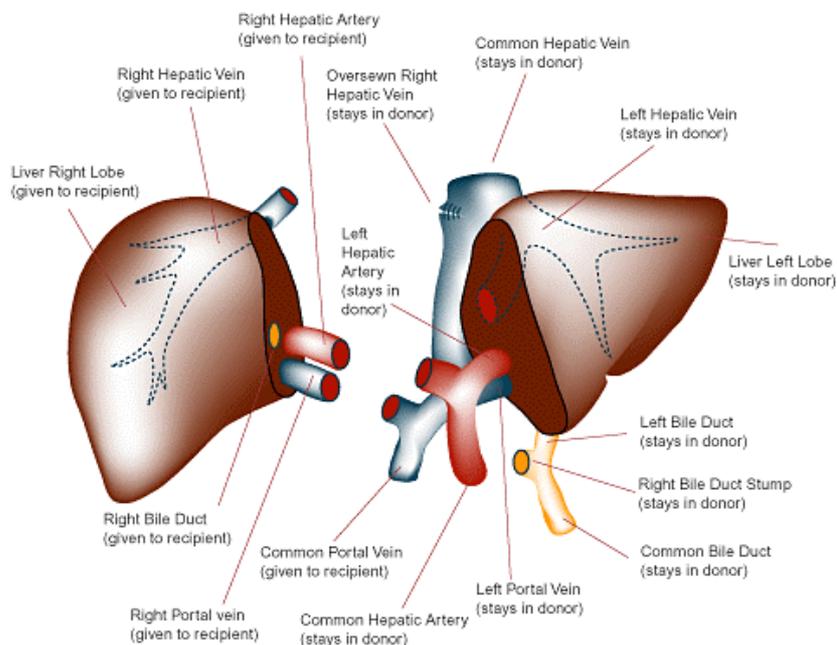


Figura 1.4. Trasplante hepático de donante vivo.

En el trasplante pediátrico (de adulto a niño) de donante vivo, se trasplanta el lóbulo lateral izquierdo o el izquierdo completo, dependiendo del peso del receptor. En el caso del trasplante de donante vivo de adulto a adulto, se han obtenido buenos resultados utilizando el injerto derecho completo; en receptores de poco peso se utiliza el lóbulo izquierdo y el izquierdo extendido para receptores de mayor peso (33).

En este tipo de trasplante hay que tener en cuenta consideraciones éticas; sólo un pariente completamente sano puede ser el donante, ya que existe un riesgo mínimo para el donante, con una mortalidad del 0.5%. (1). Los resultados son excelentes, con un 80-90% de supervivencia al cabo de un año (33,34).

Para el receptor, el riesgo quirúrgico es similar al que existe cuando se realiza un trasplante split del lóbulo izquierdo. Los beneficios potenciales son importantes: 1) acceso al trasplante sin tener que registrarse en la lista de espera, 2) el trasplante se realiza en condiciones óptimas ya que es una operación programada, 3) la calidad de injerto es mejor, ya que el donante es una persona sana y no existe el deterioro que se produce por muerte cerebral en el donante cadáver, 4) el tiempo de preservación (isquemia fría) del injerto se reduce al coordinarse la operación del donante y del receptor y 5) se consigue una mejor compatibilidad inmunológica ya que el donante y el receptor son parientes cercanos (35-37).

A pesar de ser una técnica más compleja que el trasplante total o el de tamaño reducido, actualmente, esta modalidad quirúrgica representa una alternativa válida y segura en los centros con experiencia en cirugía hepática, llegando a representar el 25% del total de los trasplantes realizados (38). En 1998 se habían realizado 800 trasplantes de donante vivo en todo el mundo; la mayor parte se habían realizado en Japón, donde, hasta hace poco, estaba prohibido la obtención de órganos a partir de donantes cadavéricos (35). Por otro lado, la utilización de donantes vivos es una tendencia que se está afianzando en Estados Unidos, donde el 60% de los trasplantes hepáticos se realizan con este método. En España todavía hay una gran cantidad de donantes que hacen no tan necesaria esta opción.

1.6. REGENERACIÓN HEPÁTICA

El hígado tiene la capacidad de regenerarse tras una agresión o resección. Cualquiera de las técnicas de trasplante hepático de tamaño reducido lleva asociada una regeneración post-trasplante del injerto. La regeneración hepática es crítica para el éxito del trasplante hepático de donante vivo y ocurre rápidamente tanto en el donante, como en el receptor. Si se trasplanta el lóbulo derecho, tras la donación, el lóbulo izquierdo dobla su tamaño en 7 días y alcanza más del 85% de la masa hepática pre-donación al mes de la cirugía. El lóbulo derecho trasplantado también dobla su tamaño en 7 días y excede a la masa intacta del donante a los 14 días.

La capacidad de regeneración del hígado cuando sufre una lesión o una resección quirúrgica no deja de sorprender ya que éste es un órgano quiescente, en

términos de proliferación celular (39), en el cual solamente menos del 0.01% de los hepatocitos se están dividiendo en un momento determinado.

Una lesión hepática o una resección quirúrgica resulta en una proliferación masiva de los hepatocitos supervivientes y cesa cuando la masa del hígado llega a representar una fracción determinada del peso del individuo, que varía con la edad y con la especie (39), por ejemplo, si se extrae el 40% del órgano, el donante recupera la masa perdida a los seis meses. Aunque los hepatocitos son los primeros en proliferar, todos los tipos celulares hepáticos se dividen, desde las células epiteliales biliares, las células endoteliales, hasta las células de kupffer (40). La cinética de proliferación celular difiere entre especies. Inmediatamente después del estímulo regenerativo, los hepatocitos salen del estado G_0 para entrar en la fase G_1 , dividen su DNA en la fase S y entran en mitosis (fase M), llegando al pico de regeneración a las 24 horas en el caso de las ratas y existe un segundo pico menor entre las 36 y las 48 horas (39,40). Los demás tipos celulares del hígado entran en división 24 horas después de los hepatocitos.

La regeneración hepática es un proceso que se puede dividir en dos etapas, según el autor Nelson Fausto: 1) la salida del hepatocito de la fase quiescente para entrar en le ciclo celular (Iniciación) y la progresión a través del punto de restricción en la fase G_1 del ciclo (Progresión). Este autor propone que estas etapas tienen un control independiente, en la iniciación intervendrían las citoquinas, el factor de

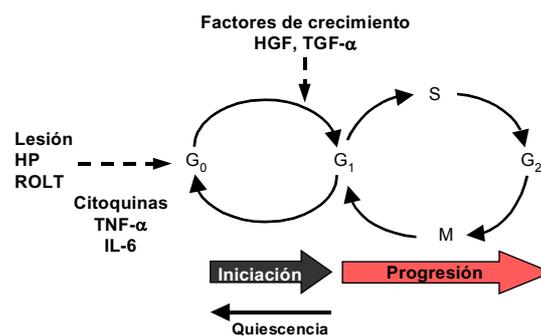


Figura 1.5. Modelo de regeneración hepática en diferentes etapas.

necrosis tumoral- α (TNF- α) y la Interleuquina-6 (IL-6) y en la progresión los factores de crecimiento, el factor de crecimiento hepatocitario (HGF) y el factor de crecimiento transformante α (TGF- α) (Figura 1.5) (41).

En la regeneración intervienen diferentes citoquinas y factores de crecimiento de los cuales nos centraremos en algunos por tener mayor relevancia en el presente estudio, como son la IL-6, el TNF- α , el HGF, el TGF- α y la IL-1. Las células no parenquimales del hígado tienen una función importante como fuente de factores de crecimiento y interleuquinas que promueven e inhiben la proliferación de los hepatocitos; aunque el papel individual de cada población permanece controvertido.

Las células no parenquimales que forman parte de la arquitectura del hígado tienen un papel muy importante en la liberación de todas estas moléculas. Las células de kupffer son responsables tanto de la producción y liberación de las citoquinas pro-proliferativas $\text{TNF-}\alpha$ y IL-6, como de las anti-proliferativas IL-1 y $\text{TGF-}\beta$ (42). Las células endoteliales de los sinusoides, aunque no son la fuente mayoritaria de citoquinas, son capaces de generar $\text{TGF-}\beta$, HGF y IL-6. Las células estrelladas hepáticas sintetizan y liberan HGF y $\text{TGF-}\beta$ (42) (Figura 1.6).

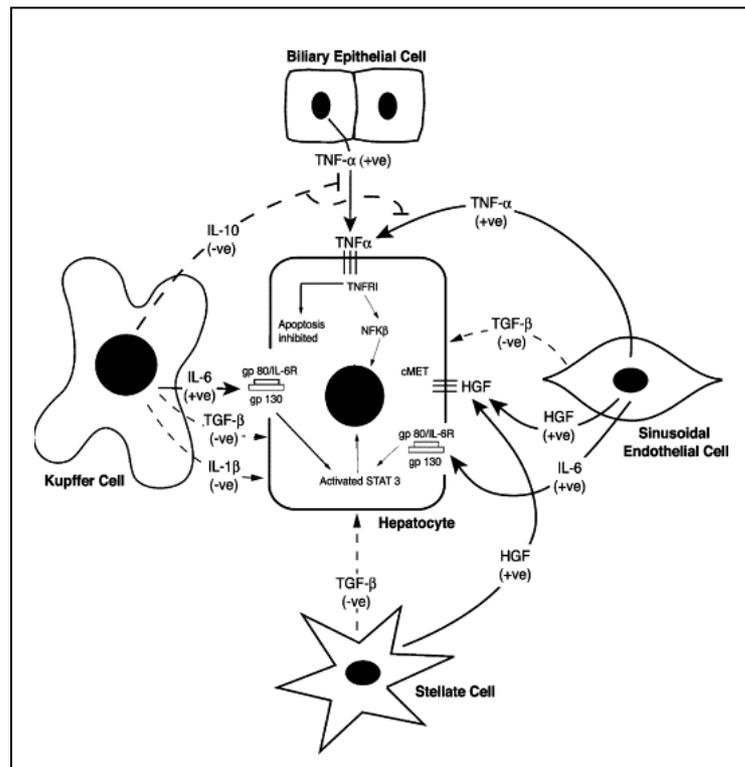


Figura 1.6. Interacciones entre las células no parenquimales y los hepatocitos durante la regeneración hepática.

1.6.1. FACTOR DE CRECIMIENTO HEPATOCITARIO (HGF)

El HGF fue aislado gracias a su habilidad de inducir la síntesis de DNA en un cultivo de hepatocitos, pero ahora se sabe que tiene efectos pleiotrópicos en otros tejidos. Este factor de crecimiento actúa mediante el receptor c-met tirosina quinasa (43). Estudios in vivo han demostrado su efecto inductor de la regeneración hepática y se ha observado su aumento en plasma en cuanto se produce una disminución de la masa hepática, tanto en humanos como en ratas (40,43). En un trabajo de trasplante hepático de tamaño reducido en rata, la administración de HGF dio lugar a un aumento de la regeneración hepática del injerto (44) y en un modelo de regeneración por

administración de tetracloruro de carbono, la administración de anticuerpos anti-HGF llevó a la inhibición de la regeneración hepática(45).

1.6.2. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β (TGF- β)

El TGF- β es un conocido inhibidor de la división de hepatocitos en cultivo. Pertenece a una superfamilia con mas de 30 miembros. Este factor de crecimiento es sintetizado como una prepro molécula que requiere modificaciones para su activación. El dímero que procede del extremo C-terminal del precursor es llamado TGF- β maduro y el dímero que procede del extremo N-terminal es el péptido asociado a la latencia (LAP). Estos dos dímeros interactúan para facilitar el tránsito del TGF- β desde el interior celular y dando lugar a un TGF- β biológicamente inactivo. El LAP se desprende con pH extremos, calor o proteasas y otros mecanismos (46) (Figura 1.7)

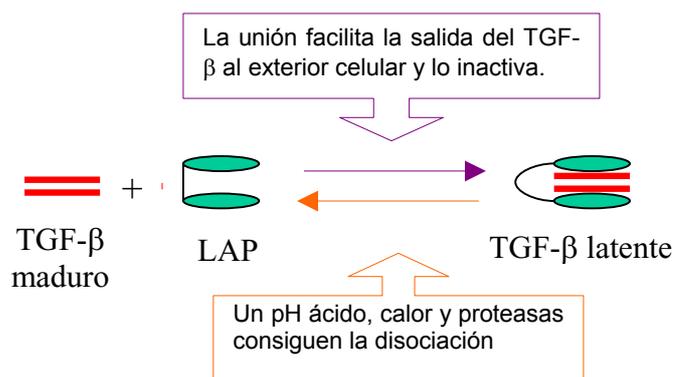


Figura 1.7. Interacción entre el TGF- β y el péptido asociado a la latencia (LAP)

En el hígado, el TGF- β se empieza a sintetizar a las pocas horas después de una hepatectomía llegando a su máxima concentración alrededor de las 48 horas. La administración intravenosa de TGF- β inhibe la fase temprana de regeneración hepática después de una hepatectomía en la rata (47) y el tratamiento con anticuerpos anti-TGF- β de ratas con una hepatectomía da lugar a un aumento en la regeneración hepática (48).

1.7. FACTORES IMPLICADOS EN EL SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN QUE PUEDEN AFECTAR A LA REGENERACIÓN

1.7.1. INTRODUCCIÓN

El daño hepático que sufre el hígado al someterlo a un proceso de I/R es el resultado de la interacción entre diferentes mecanismos complejos en la cual participan diferentes tipos celulares (Figura 1.8).

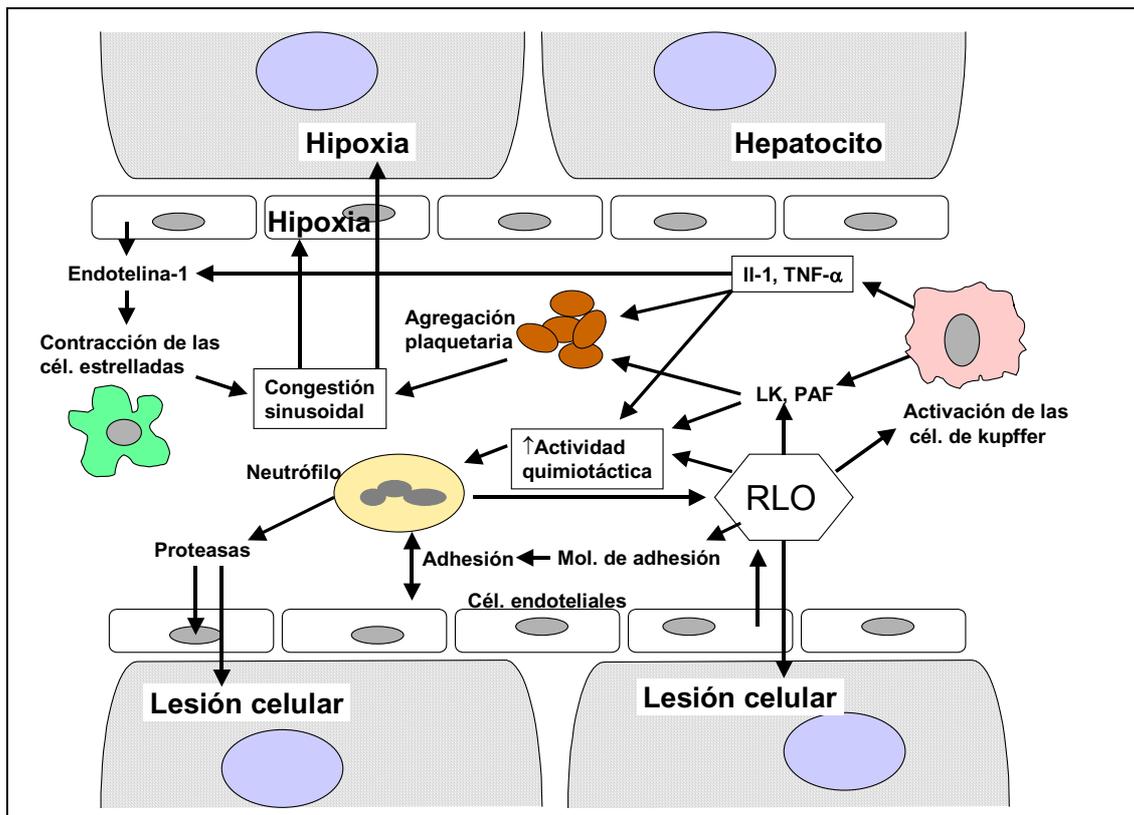


Figura 1.8. Representación esquemática de los acontecimientos celulares e intravasculares en relación con la I/R después de un trasplante (8).

En la presente tesis nos centraremos en el metabolismo energético, los RLO, los neutrófilos, las células de Kupffer, algunas citoquinas y el óxido nítrico, que son factores implicados en el síndrome de I/R y que pueden afectar al proceso de regeneración hepática tras un trasplante procedente de un injerto de tamaño reducido.

1.7.2. NUCLEÓTIDOS DE ADENINA

En la fase de isquemia fría la energía que se obtiene a través del metabolismo anaeróbico no es suficiente para satisfacer los requerimientos energéticos celulares. El ATP es una molécula necesaria para la síntesis de DNA. Existe una correlación directa

entre el contenido de ATP en el hígado al final de la isquemia fría y la recuperación del paciente trasplantado (49). Resultados obtenidos a partir de un modelo de hepatectomía parcial mostraron que existe una relación estrecha entre los niveles del ATP en el hígado remanente y la regeneración hepática del mismo (50). Y se ha demostrado que la isquemia hepática inhibe la síntesis de DNA en un modelo de hepatectomía parcial (51).



1.7.3. RADICALES LIBRES DE OXÍGENO (RLO)

Los RLO, fuertemente implicados en el daño por I/R, al dañar proteínas y DNA tienen una influencia negativa sobre la división celular (51-53). La activación de las células de Kupffer y los neutrófilos, la acumulación de xantina y la conversión de xantina deshidrogenasa (XDH) en xantina oxidasa (XOD) y los desórdenes mitocondriales que se producen en el proceso de I/R son responsables de la producción de RLO. De hecho, los marcadores de peroxidación lipídica están aumentados durante la reperfusión en trasplantes y resecciones hepáticas (54,55). La modulación farmacológica de los citados mecanismos prooxidantes (basados en la administración de un inhibidor de XOD, como el alopurinol o en el pretratamiento de antioxidantes, como la superóxido dismutasa, SOD) confirman sus efectos perjudiciales en la regeneración hepática asociada a la hepatectomía (51,56).

El sistema XDH/XOD interviene en el metabolismo final de degradación de los ácidos nucleicos (Figura 1.9). Este enzima presenta dos isoformas que catalizan las mismas reacciones: el paso de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico (Figura 1.9 y figura 1.10). La diferencia está en que la forma deshidrogenasa utiliza NAD^+ como aceptor de electrones, mientras que la forma oxidasa utiliza la molécula de oxígeno, generando radical superóxido (57).

La conversión de XDH a XOD puede tener lugar de manera reversible por oxidación de los puentes disulfuro que estabilizan la enzima o bien de forma irreversible debido a proteólisis limitada (58). Durante el proceso de isquemia, se activan enzimas proteolíticas responsables de la conversión de XDH en XOD (58,59). Simultáneamente, debido a la degradación de ATP, se produce una acumulación de

xantina e hipoxantina, que son los sustratos de la XDH y XOD (Figura 1.10). Al comenzar la reperfusión del hígado, existe una cantidad de xantina acumulada y la enzima está en la forma oxidasa. Con el nuevo aporte de oxígeno, la xantina es metabolizada por la XOD, y como subproducto se forma anión superóxido que juega un papel muy importante en el daño por I/R.

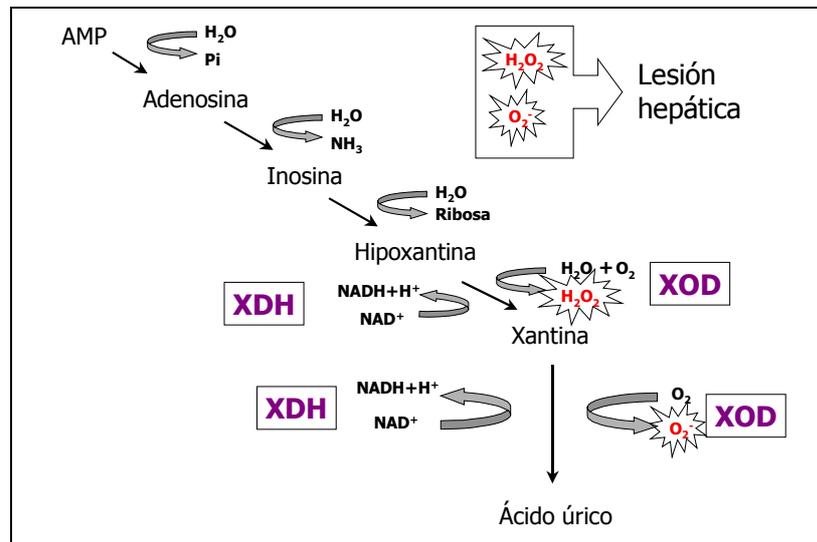


Figura 1.10 .Vía de degradación del AMP en la que participan la XDH/XOD.

Se ha demostrado en diferentes modelos experimentales de I/R normotérmica y de trasplante hepático que durante la reperfusión existe gran cantidad de XOD, y que el alopurinol –inhibidor de la XOD- disminuye el daño por I/R hepática, apuntando hacia el sistema xantina/XOD como un sistema clave en la generación de RLO asociada a una I/R hepática (58,59).

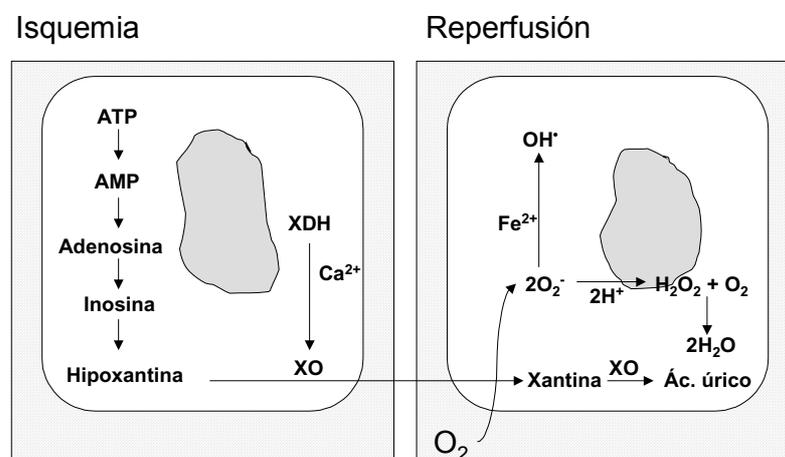


Figura 1.10. Participación del sistema xantina/XOD durante el proceso de I/R.

1.7.4. NEUTRÓFILOS

Como consecuencia de la I/R hepática se produce una acumulación de neutrófilos, facilitada por una serie de factores que alteran las características de adherencia de los neutrófilos, así como por una red de interacciones entre leucocitos, citoquinas y quimioatrayentes (60). Entre estos factores encontramos la liberación de sustancias desde los hepatocitos, la producción de citoquinas (IL-1, TNF- α) por parte de las células de Kupffer y el aumento de la expresión de moléculas de adhesión, como la ICAM-1 (61,62).

Numerosos trabajos han demostrado que la activación de los neutrófilos está implicada en el daño del parénquima y en las alteraciones de la microcirculación asociados con la I/R (63-68). Al prevenir la infiltración de neutrófilos a los tejidos, tanto disminuyendo el número de neutrófilos como previniendo la adhesión de éstos, se reduce significativamente el fallo microcirculatorio y el daño tisular en modelos animales de I/R (69,70).

En el momento en el que los neutrófilos se activan liberan proteasas y RLO. Estos RLO, al entrar en contacto con los hepatocitos y las células endoteliales de los sinusoides, producen la oxidación de los ácidos grasos de membrana plasmática y facilitan el daño mediado por las proteasas (71), pudiendo afectar también a la regeneración hepática en el caso de un trasplante con injerto de tamaño reducido.

1.7.5 CÉLULAS DE KUPFFER

Durante la isquemia fría las células de Kupffer sufren alteraciones, junto con los demás tipos celulares del hígado, lo cual lleva a su activación cuando se inicia la reperfusión, que se ve acompañada de una liberación de gran cantidad de mediadores inflamatorios, como RLO, TNF- α , proteasas, IL-1, IL-6, etc (Figura 1.11) (72).

Diferentes trabajos han reportado la implicación de las células de Kupffer en la lesión por I/R. Se ha observado que la administración de cloruro de galdolinio (GdCl₃) (inhibidor de la activación de las células de Kupffer) atenúa la lesión hepática por I/R, mientras que la administración de partículas de látex (aumentan la actividad de las células de Kupffer) agrava la lesión asociada a este proceso (73).

En relación al papel de las células de kupffer en la regeneración hepática, tras una resección hay resultados controvertidos, la depleción de las células de kupffer antes de una resección hepática promueve o inhibe la regeneración hepática dependiendo del estudio y del modo de inhibir dichas células (42).

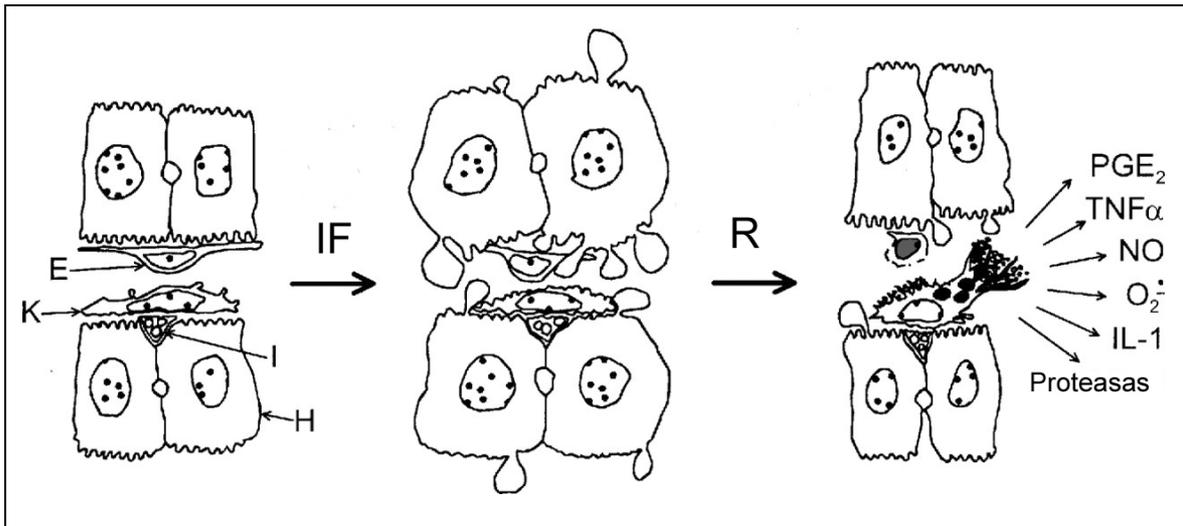


Figura 1.11. Implicación de las células de kupffer en la lesión por I/R. H, hepatocitos; E, células endoteliales; K, células de kupffer; I, células estrelladas; IF, isquemia fría; R, reperusión.

1.7.6. CITOQUINAS (TNF- α , IL-1 y IL-6)

El TNF- α es una citoquina multifuncional que actúa a través de dos receptores de membrana, TNFR1 y TNFR2. El TNF- α y la IL-1 son las citoquinas proinflamatorias más importantes (74,75). Comparten algunas propiedades biológicas, por ejemplo, las dos son producidas por macrófagos activados (76,77). Sus acciones más importantes en la inflamación son sus efectos sobre el endotelio, los leucocitos y los fibroblastos, así como la inducción de reacciones sistémicas de fase aguda.

Las citoquinas proinflamatorias que se encuentran más comúnmente implicadas en la lesión por I/R hepática son el TNF- α y la IL-1. Las dos inducen la síntesis de IL-8 (78) y regulan la expresión de moléculas de adhesión, promoviendo interacciones entre leucocitos y células endoteliales (79), lo que resulta en una liberación mayor de citoquinas. El TNF- α provoca activación y quimiotaxis de neutrófilos e induce la activación de células de Kupffer (80,81). A su vez, la IL-1 induce la síntesis de TNF- α por parte de las células de Kupffer y aumenta la producción de RLO por parte de los neutrófilos (82,83). El papel de estas dos citoquinas en la I/R ha sido demostrado en varios estudios mediante experimentos con anticuerpos y antagonistas de sus receptores, que disminuyen el daño por I/R, con una menor infiltración de neutrófilos y un descenso del daño en el parénquima hepático (82,83).

Estas dos citoquinas (TNF- α y IL-1) no ejercen su acción solamente a nivel hepático, sino que tiene efectos sistémicos, contribuyendo de este modo a la lesión pulmonar asociada a la I/R hepática. Los resultados obtenidos tras la administración

de anticuerpos dirigidos contra TNF- α en un modelo de I/R normotérmica corroboran estas afirmaciones (77,84). La inhibición de la acción de la IL-1 mejora la lesión pulmonar asociada a la isquemia hepática normotérmica (85). Y se sabe también que la producción de IL-1 producida en el hígado después de una hepatectomía estimuló los macrófagos alveolares del pulmón, induciendo daño pulmonar (86).

En cuanto al papel del TNF- α en la regeneración hepática, la administración de dosis altas de TNF- α resulta en una pobre regeneración, pero no tiene efectos en dosis bajas. Esta citoquina induce la síntesis de DNA en un cultivo de hepatocitos, pero sólo en presencia de suero y no tiene un efecto mitogénico en células mantenidas en un medio libre de factores de crecimiento. Todas estas observaciones sugieren que el TNF- α actúa como un agente responsable de iniciar la proliferación hepatocitaria en la primera fase de regeneración hepática y deja las células preparadas para responder a los factores de crecimiento (41,43).

La IL-1 también está implicada en la regeneración hepática. Se ha demostrado que tanto la IL-1 α , como la IL-1 β tienen una acción inhibitoria sobre la proliferación de hepatocitos in vitro (87,88). En estudios in vivo, con hepatectomía, en rata, se ha visto que la administración exógena de IL- β produce una disminución de la regeneración hepática (88).

Con la IL-6 existe una controversia en cuanto al papel que desempeña en procesos de I/R (89). Hay autores que la presentan como factor antiinflamatorio, con un papel atenuador de la lesión por I/R (90,91), mientras que otros la consideran como factor proinflamatorio (92,93).

En cuanto a la regeneración hepática, se ha visto que el papel de la IL-6 está íntimamente ligado al TNF- α . Estudios con ratones knock-out para los genes TNFR1 y IL-6 mostraron una pobre regeneración tras realizar una hepatectomía parcial, y la administración de IL-6 revirtió los efectos de la inhibición de la vía de señalización del TNF- α . A partir de estos estudios se sugirió que el TNF- α , a través del TNFR1, podía iniciar la regeneración hepática y que activaba una vía dependiente de IL-6 en la que participaba el factor de transcripción STAT3 (43). Además de estas observaciones hay que resaltar que existen otros trabajos con knock-out para TNFR1 y hepatectomía parcial que demostraron que la proliferación hepática podía ser inducida por dos vías diferentes, una dependiente de TNF- α y IL-6 y una inducida por mitógenos, independiente de estas citoquinas (94).

1.7.7. ÓXIDO NÍTRICO (NO)

El óxido nítrico (NO) es una molécula que actúa como mensajero intra y extracelular, producida por una familia de enzimas llamadas NO sintasas (NOSs), que realizan la siguiente reacción:

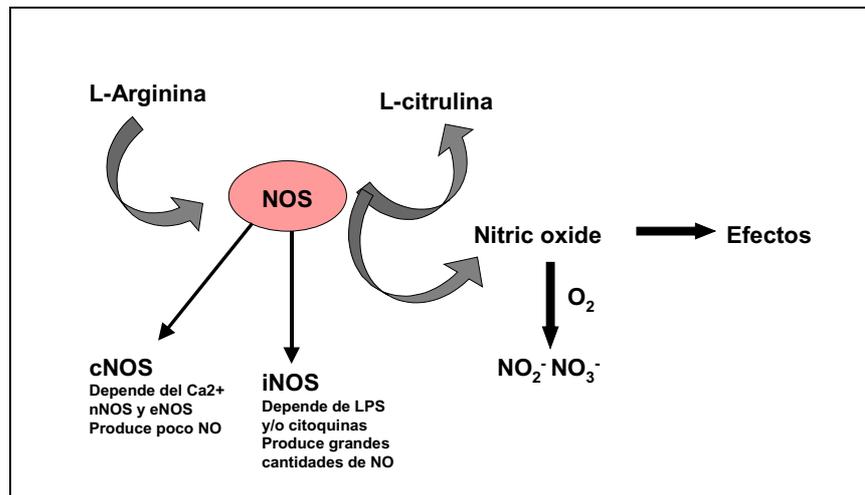


Figura 1.12. Reacción catalizada por la NO sintasa.

Se han descrito tres tipos de NOSs: La NOS endotelial (eNOS), y la neuronal (nNOS) que son constitutivas y la inducible (iNOS). La nNOS es exclusivamente de origen neuronal y la eNOS se sintetiza de forma exclusiva en las células endoteliales de la vasculatura hepática (95-97). Por otra parte, iNOS no se expresa constitutivamente en el hígado, y cuando lo hace, se expresa en casi todos los tipos celulares presentes en el hígado si existe un estímulo adecuado.

El papel del NO en el síndrome de I/R es controvertido. Algunos autores indican que el NO tiene efectos beneficiosos ante una I/R en hígado (98-105), mientras que otros autores apuntan que el NO no participa en la respuesta ante una I/R hepática incluso que su papel es perjudicial (106). Estos datos contradictorios pueden ser explicados por el papel dual del NO. Por una parte, el NO puede ser beneficioso mediante la mejora en las alteraciones de la microcirculación y la disminución de la acumulación de neutrófilos (107-109); y por otro lugar, una producción excesiva de NO puede ser citotóxica, ya que puede reaccionar con el anión superóxido y formar peroxinitrito, que es una especie reactiva altamente oxidante (110-112).

En cuanto a la influencia del NO sobre la regeneración hepática se ha demostrado que el NO es necesario para la viabilidad de los hepatocitos (113) y que

juega un papel importante en la repoblación hepatocitaria del hígado (39). La cNOS y la iNOS parecen jugar un papel importante en la regeneración hepática después de una hepatectomía. Después de una hepatectomía, el hígado remanente recibe el volumen de flujo sanguíneo que recibía el hígado entero y esto lleva a una mayor producción de NO por parte de la eNOS en las células endoteliales y este aumento inicial de NO es esencial para que las células del parénquima hepático entren en la fase G1 y empiece la regeneración hepática (39). Parece ser que la iNOS tendría un papel a las 6-8 horas después de la hepatectomía, su inducción es dependiente de citoquinas (TNF- α y IL-6) (39).

1. 8. LESIÓN PULMONAR ASOCIADA AL TRASPLANTE HEPÁTICO

1.8.1. INTRODUCCIÓN

El daño por I/R asociado al trasplante no se limita sólo al hígado, sino que induce desórdenes sistémicos, entre los cuales cabe destacar las alteraciones funcionales del pulmón (114-116). Así la lesión por I/R hepática provoca edema, hemorragias, acumulación de neutrófilos y cambios en la permeabilidad vascular en el pulmón. El distrés respiratorio es una de las situaciones clínicas más graves durante el trasplante y ocurre frecuentemente en el contexto de un fallo multisistémico (114-116). En el caso del trasplante con injerto de tamaño reducido, el proceso de I/R inherente al proceso también induce alteraciones patológicas en el pulmón (117-119). De hecho, la mayoría de los pacientes pediátricos que experimentan un trasplante sufren complicaciones pulmonares (118). Existen evidencias que este proceso está mediado por la acumulación de neutrófilos y por la liberación de mediadores inflamatorios, como los RLO (77,120).

Existen dos hipótesis para explicar la lesión hepática y pulmonar asociada al trasplante de hígado (Figura 1.13). Varios autores han sugerido que en el momento de la reperfusión se liberan a la circulación sistémica sustancias proinflamatorias –como el TNF- α -, procedentes del intestino y del bazo, debido a la congestión esplácnica resultante de la oclusión portal que tiene lugar durante el trasplante (121-124). Estas sustancias proinflamatorias serían las responsables de inducir la lesión hepática (121-123) y pulmonar (124) asociada al trasplante hepático. La segunda hipótesis se basa en el hecho de que durante el proceso de reperfusión, es el propio hígado el responsable de inducir la síntesis de estos mediadores proinflamatorios (77,125-127). Estos mediadores no sólo serían los responsables de la lesión hepática, sino que su paso al torrente sanguíneo produciría efectos sistémicos nocivos. Dentro de esta

segunda hipótesis que señala al hígado como responsable de la lesión pulmonar asociada a una I/R hepática, hay estudios que apuntan al TNF- α como responsable de este hecho (77,114,128-130), mientras que otros estudios parecen indicar que el sistema xantina/XOD generado en el hígado durante el periodo de ischemia podría liberarse desde el hígado a la circulación general tras la reperfusión y de este modo provocar daño a nivel pulmonar (58).

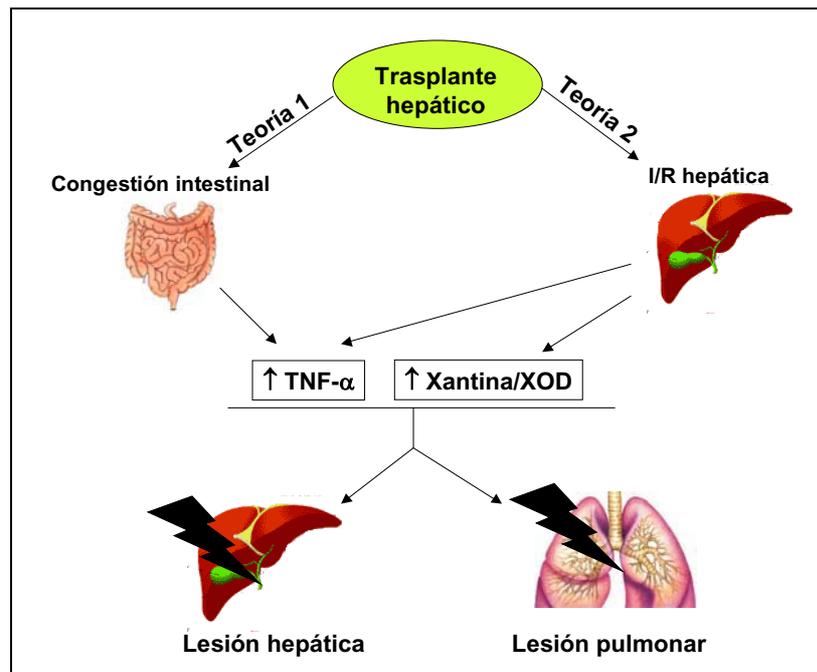


Figura 1.13. Lesión pulmonar asociada al trasplante hepático

1.8.2. IL-1 Y DAÑO PULMONAR

Se ha demostrado que la IL-1 tiene un papel adverso en el daño pulmonar asociado a la lesión por I/R hepática. (85,86,131,132). En esta línea, se ha visto que la inhibición de la acción de la IL-1 reduce la lesión pulmonar asociada a un proceso de I/R normotérmica en el hígado (85). Por otro lado, la producción de IL-1 en el hígado después de una hepatectomía y un proceso de ischemia normotérmica fue asociada a la activación de los macrófagos alveolares del pulmón y desencadenó la lesión pulmonar.

1.8.3. TNF- α Y SUS RECEPTORES SOLUBLES EN EL DAÑO PULMONAR

Diferentes estudios de procesos inflamatorios asociados a desordenes sistémicos han indicado que el aumento de IL-1 ocurre paralelamente al aumento de TNF- α (86,133,134). Está ampliamente demostrado que el TNF- α ejerce su acción inflamatoria mediante dos receptores de membrana celular, TNFR1 y TNFR2, como se

ha podido comprobar durante episodios de rechazo y pérdida de función del injerto después del trasplante hepático (135-138). Estos dos receptores pueden estar presentes en su forma soluble, sTNFRs: sTNFR1 y sTNFR2, para ello es necesaria la rotura proteolítica de la región extracelular de los receptores de membrana.

Estudios de procesos inflamatorios han demostrado que el aumento de TNF- α en plasma va acompañado de un aumento en la forma soluble de sus receptores (sTNFRs). Los sTNFRs circulan en la sangre y funcionan como inhibidores naturales del TNF- α , ya que al unirse a este, lo inactivan inhibiendo sus efectos adversos (139-142). El tratamiento con sTNFR redujo la concentración de TNF- α en plasma y previno el daño pulmonar agudo en un modelo de "bypass" cardiopulmonar (143) y en un modelo de isquemia intestinal (144).

EL papel dañino de la IL-1 en los desórdenes sistémicos después de un proceso de I/R puede estar relacionado con el efecto de esta citoquina sobre los niveles de TNF- α y sTNFRs en plasma. Existen estudios en los que la inhibición de la acción de la IL-1, mediante el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra), redujo los niveles de TNF- α en plasma, después de la I/R (133). Además, se ha reportado que la IL-1 inhibe la expresión de los receptores de membrana del TNF- α en líneas celulares humanas de fibroblastoide y de carcinoma cervical, lo cual podría reducir la liberación de los sTNFRs (145-147).

1. 9. EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

El preconditionamiento isquémico (PC) es una estrategia quirúrgica que protege los tejidos frente a la lesión por I/R. Este fenómeno fue descrito por primera vez en corazón por Murry et al. en 1986 (148) y posteriormente ha demostrado ser un mecanismo eficaz en diferentes órganos como intestino, cerebro, músculo e hígado (149,150). El PC consiste en la aplicación de periodos cortos de isquemia reperusión antes de que el órgano sea sometido a una I/R prolongada (Fig 1.14). A nivel hepático, el estudio del PC se ha centrado principalmente en modelos de I/R normotérmica y algunos en trasplante hepático total, sin embargo no existen estudios sobre la aplicación del PC en modelo de trasplante hepático con injerto de tamaño reducido.

A pesar de que se han postulado diferentes hipótesis, los mecanismos protectores por los que actúa el PC no se conocen con seguridad. A nivel molecular,

una vez que se ha inducido el PC se ponen en marcha una cascada de señales que se amplificará hasta conseguir un efecto beneficioso.

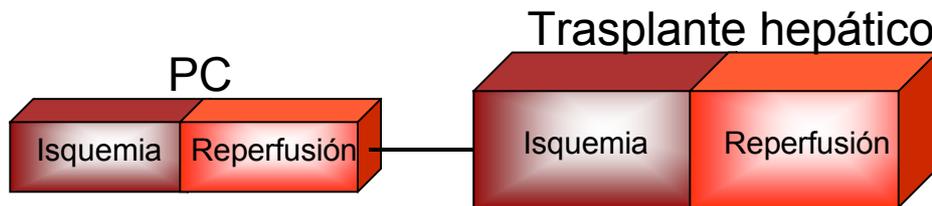


Figura 1.14. Esquema de la aplicación del PC previo a la I/R que tiene lugar en el trasplante hepático

1.9.1 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MOLECULAR

Estudios llevados a cabo con hepatocitos aislados y en modelos experimentales de I/R, han sugerido la siguiente secuencia de acontecimientos. Durante el PC tiene lugar la degradación de ATP, generándose adenosina en grandes cantidades; la adenosina se libera al espacio extracelular y provoca la activación de los receptores de adenosina A2 acoplados a proteína G (150,151). Éstos, a su vez producen la activación de una fosfolipasa de membrana (fosfolipasa C ó D), que genera inositol trifosfato, el cual induce la liberación de calcio desde las reservas intracelulares no mitocondriales y diacilglicerol (DAG), que activa la PKC (152-154). Se sabe que la PKC tiene un papel muy importante en la protección celular, y regula algunos procesos biológicos tales como el metabolismo, el transporte de iones y la expresión de genes. Diversos estudios muestran que la PKC es responsable de algunos de los efectos beneficiosos del PC en el hígado (153,155,156). La activación de la PKC produce la fosforilación de distintas moléculas efectoras tales como las tirosinquinazas (157) y MAPK –incluyendo la MAPK p38– (158), lo que conlleva un aumento de la tolerancia de los hepatocitos y de las células endoteliales frente al daño por I/R y la entrada de estas células en el ciclo celular, promoviendo la regeneración hepática (159).

La activación de la PKC puede inducir también la activación de diversos factores de transcripción, como el NF- κ B, que son los principales responsables de los efectos protectores del PC a largo plazo (160,161). Estos factores de transcripción modulan la expresión de determinados genes y dan lugar a la síntesis de proteínas como la SOD o las proteínas de shock térmico (HSPs) que se han propuesto como efectoras del efecto protector del PC.

Las HSPs juegan un papel fundamental en mantener la estabilidad de las proteínas. (162). Cuando se produce un aumento en la síntesis de proteínas y durante un estímulo de estrés, las HSPs se unen a los péptidos nacientes para que no se desplieguen, no interaccionen con otras moléculas y para facilitar su transporte a través de las membranas celulares (162). Se ha descrito el papel de estas proteínas en el tejido isquémico: reparando proteínas dañadas, ofreciendo protección contra los RLO, suprimiendo citoquinas proinflamatorias y reparando canales iónicos (163,164). Existen estudios en cultivos celulares y modelos experimentales de toxicidad inducida por lipopolisacárido que indican que la inducción de las HSPs es responsable de la inhibición de la síntesis de IL-1 (165-169). Además, diversos estudios proponen al NO como responsable de la inducción de las HSPs en modelos experimentales de I/R (170-172).

En el hígado, la protección del PC se asocia a la síntesis de varias formas inducibles de HSPs: la HSP70, HSP72 y HSP73 y la hemo-oxigenasa-1 (HO-1/HSP32) (173,174). La inducción de las HSPs reduce la unión nuclear de factores de transcripción proinflamatorios y aumenta la capacidad antioxidante de las células (175,176). Ambos efectos pueden contribuir a la disminución de la formación de TNF- α y a la atenuación de la respuesta inflamatoria (177,178).

También se ha sugerido que el PC puede disminuir la transcripción de genes como c-fos y c-jun, implicados en el desarrollo de la lesión por I/R hepática, y que la activación de NF- κ B podría inducir la activación de STAT-3, implicado en la hepatoprotección y en la proliferación celular (155,156,158,159,173,179-183).

El papel de NF- κ B en los efectos del PC no está totalmente esclarecido, puesto que por un lado hay trabajos en los que se ha demostrado que durante el PC se inhibe la activación de NF- κ B, y que su inhibición es responsable de algunos de los efectos beneficiosos del PC (160); mientras que diversos autores defienden que la activación de NF- κ B contribuye a los efectos beneficiosos del PC (159,161).

Además de todas estas vías de señalización celular implicadas en el PC, trabajos recientes indican que el PC puede inducir la liberación de una pequeña cantidad de RLO (59,182) y de TNF- α (184), los cuales contribuyen al efecto protector del PC.

Las vías de señalización del PC se esquematizan en la siguiente figura:

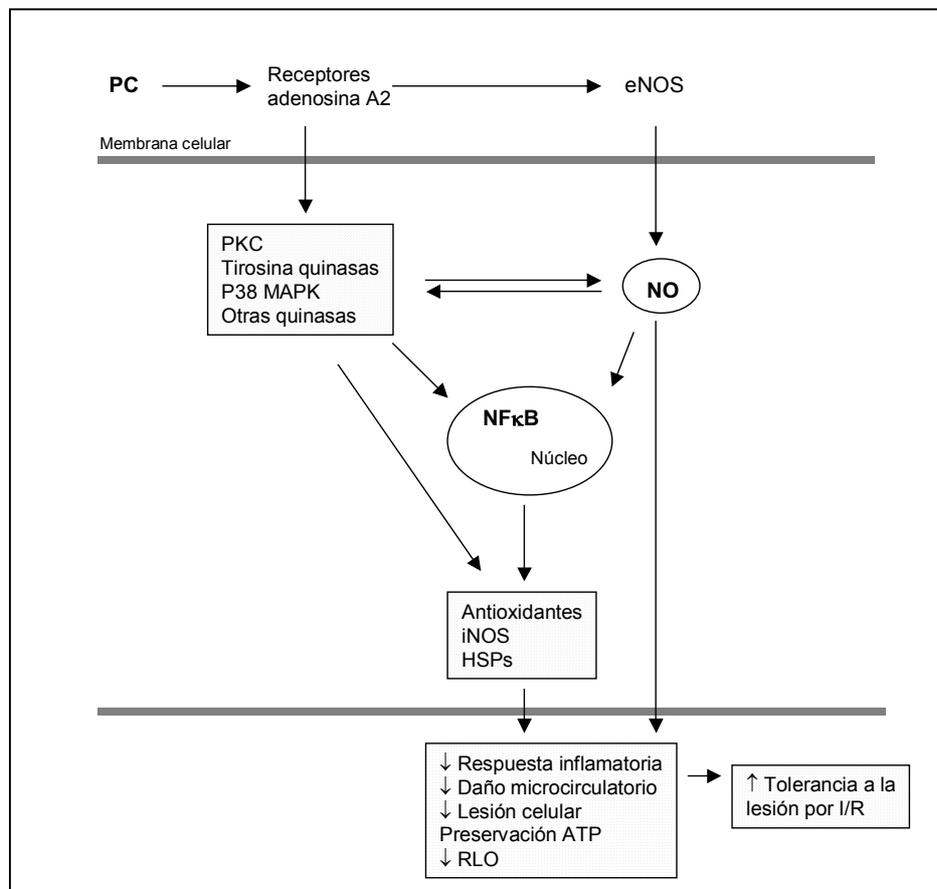


Figura 1.15. Visión esquemática de los posibles mecanismos involucrados en el PC.

1.9.2 ADENOSINA Y ÓXIDO NÍTRICO

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 PC. 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 (ET) y actúa como secuestrador de RLO, tales como el superóxido (107-109,185,186). Así pues, la inhibición de la síntesis de NO en un modelo de I/R normotérmica anula los efectos protectores ofrecidos por el PC (150,177,187,188); por el contrario, cuando se administra donadores de NO, disminuye la lesión por I/R (187,189). En el trasplante, la modulación farmacológica del NO en injertos hepáticos sometidos a 16 horas de isquemia fría confirma la implicación del NO en la protección inducida por el PC (100).

Durante el breve periodo de isquemia del PC 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 A2 de adenosina, genera un aumento de NO que sería

responsable del efecto protector conferido por el PC (150). Así lo confirman los resultados obtenidos en modelos de I/R normotérmica basados en la modulación farmacológica del NO y/o de la adenosina en animales sometidos a I/R hepática, con o sin PC previo. También se ha demostrado el papel de la adenosina en la protección conferida por el PC en un modelo de I/R hepática *ex vivo*. (177,188).

De modo que la ventana de tiempo óptima que induce los efectos protectores del PC en el hígado viene determinada por 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 A2, junto con una baja concentración de xantina que evite los efectos perjudiciales de la misma (190).

1.9.3. METABOLISMO ENERGÉTICO

El PC es capaz de preservar los niveles de ATP después de una I/R hepática contribuyendo al efecto protector del PC (151,191-194). Los mecanismos por los cuales el PC ejerce este efecto no son del todo conocidos.

Además de la generación de adenosina, el breve periodo de I/R del PC provoca la activación de la enzima proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK). La AMPK es una enzima que se activa en situaciones de déficit energético celular desencadenando la fosforilación de numerosos sustratos con el fin de mantener los niveles celulares de ATP. De este modo se reduce la actividad de la vía glucolítica durante la isquemia prolongada; por lo tanto se reducen los niveles de los intermediarios de esta vía, así como su producto final, el ácido láctico que tiene efectos nocivos. La administración de inhibidores y activadores de la AMPK en animales sometidos a una I/R hepática normotérmica, con o sin PC, confirman este hecho (191-192).

1.8.4. NEUTRÓFILOS Y ALTERACIONES EN LA MICROCIRCULACIÓN

Se ha podido demostrar que parte del efecto protector del PC está relacionado con la modulación de la acumulación de neutrófilos y la alteración de la microcirculación (195,196). El mecanismo por el cual el PC actúa modulando la acumulación de neutrófilos en el tejido hepático no se conoce actualmente. Se ha demostrado que el PC 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 PC. 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 PC pueda reducir la acumulación de neutrófilos mediante la reducción del daño endotelial (90,157,160,197-199).

En modelos experimentales de trasplante hepático, los injertos sometidos a PC muestran una mejoría en el flujo sanguíneo hepático tras la reperusión. De forma similar, los efectos beneficiosos del PC sobre la microcirculación también se han observado en modelos de isquemia normotérmica. Diversos estudios han sugerido que el PC, 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 los desórdenes microcirculatorios asociados a la I/R hepática (195,196,200).

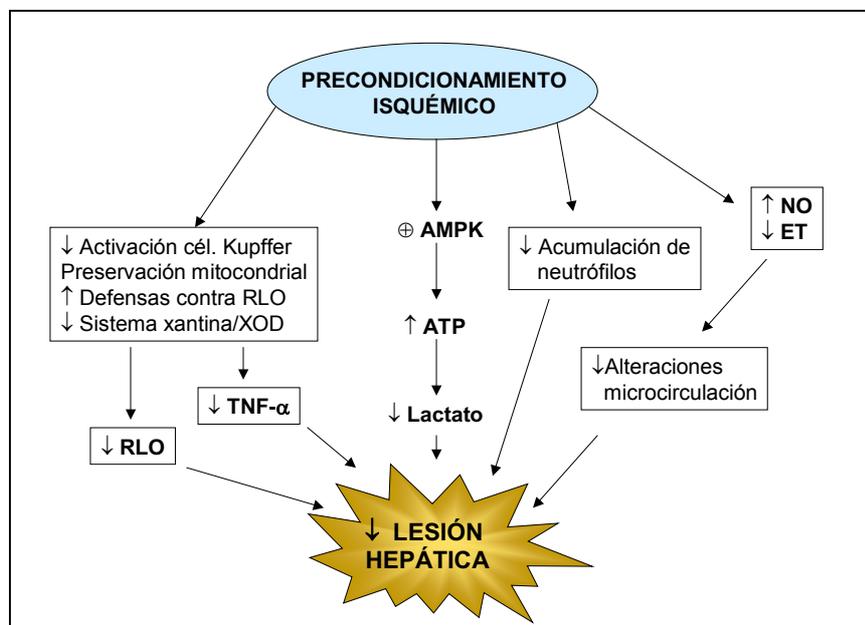


Figura 1.16. Mecanismos de acción del PC.

1.9.5. ESTRÉS OXIDATIVO Y CITOQUINAS

Se conoce que el PC es capaz de disminuir el estrés oxidativo asociado al proceso de I/R hepática. En este campo, hay estudios que demuestran que el PC actúa preservando la estructura mitocondrial y modulando la activación de las células de Kupffer, disminuyendo así la producción de RLO en el proceso de I/R hepática (76,177). Se ha demostrado a nivel experimental que el PC modula los sistemas de defensa contra estos RLO y el sistema generador de RLO xantina/XOD (58). Los beneficios del PC no sólo se han observado a nivel de prooxidantes, sino que existen

estudios que demuestran que esta estrategia quirúrgica es capaz de preservar los niveles de antioxidantes, como el glutatión (158).

En relación a las citoquinas, hay estudios que indican que la inhibición de las células de Kupffer por el PC lleva también a una disminución en la producción de las citoquinas proinflamatorias tras una I/R hepática (201,202). Existen trabajos que demuestran la influencia del PC sobre la liberación de citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α y la IL-1 en procesos de I/R normotérmica (201,203,204).

1.9.6. PC Y LESIÓN PULMONAR

Se ha demostrado que los efectos beneficiosos del PC tras una I/R hepática no se limitan al hígado, sino que reduce la lesión provocada por la I/R en órganos remotos, particularmente en el pulmón (202,204,205).

En modelos de isquemia normotérmica, los hígados precondicionados presentaron una reducción significativa de la producción de TNF- α por parte de las células de Kupffer y una menor conversión de XDH a XOD (59,90,202;204,206). En órganos remotos tales como el pulmón, esto conlleva la reducción de la expresión de P-selectina y la disminución de la adhesión e infiltración de neutrófilos (204,207). La modulación farmacológica del TNF- α y del sistema xantina/XOD en modelos animales de isquemia normotérmica hepática y trasplante hepático, con o sin PC, confirmó estas observaciones (59,202,204,205).

1.9.7. APLICACIÓN CLÍNICA DEL PC

Desde el momento en que se describió la efectividad del PC se han realizado numerosos trabajos con la finalidad de buscar estrategias que puedan mimetizar sus efectos beneficiosos. Entre estas estrategias se encuentra el precondicionamiento térmico, que consiste en inducir un aumento en la temperatura corporal antes de la isquemia hepática (208-210); o el precondicionamiento químico con agentes diversos tales como la doxorubicina (211,212) y el factor natriurético (213-215). Sin embargo, las limitaciones de estas estrategias es su posible aplicación clínica, bien por la dificultad que ello supondría, por problemas de toxicidad y por los efectos secundarios descritos.

Si bien todas las estrategias encaminadas a reducir la lesión por I/R hepática (tratamientos farmacológicos, mejoría de las soluciones de preservación, terapia génica, precondicionamiento térmico y químico) no han podido tener su proyección en la clínica, las investigaciones acerca de la efectividad del PC en modelos

experimentales de I/R hepática han sido la base para que esta estrategia quirúrgica pueda ser aplicada en la clínica para reducir la lesión de I/R asociada a las resecciones hepáticas de tumores. Pese a que todavía no se tienen datos de la aplicación del PC en el trasplante hepático en humanos, hay estudios que respaldan su posible aplicación clínica en un futuro.

El uso pionero del PC en cirugía cardíaca por Yellon y cols. abrió la posibilidad de la utilización de esta técnica en distintos tipos de cirugía (217). Este grupo demostró que la aplicación del PC antes de realizar un “bypass” de la arteria coronaria redujo la lesión del miocardio, consecuencia del procedimiento quirúrgico. Posteriormente se han llevado a cabo ensayos clínicos en distintos órganos con resultados esperanzadores (218-223).

En el caso del hígado, ensayos clínicos llevados a cabo por Clavien y cols., y Nuzzo y cols., han demostrado el papel protector de la aplicación del PC isquémico en resecciones hepáticas (225-227). Los estudios de Clavien y cols. mostraron que la aplicación del PC isquémico tuvo un efecto protector en un grupo de 24 pacientes sometidos a hepatectomía (225). En los pacientes en los que se aplicó en PC se produjo una significativa reducción de los niveles plasmáticos de ALT en comparación con el grupo que no fue preconditionado. Además, se observó una marcada reducción de la muerte celular por apoptosis de las células endoteliales hepáticas. Recientemente, este mismo grupo ha llevado a cabo un estudio en más de 100 hepatectomías en los que la aplicación del PC ha reducido significativamente los niveles de transaminasas con respecto al grupo no preconditionado. Este estudio demostró que los efectos protectores del PC isquémico sobre los niveles de transaminasas fueron mayores en los pacientes con menos de 60 años de edad (226).

Posteriormente a estos trabajos otros grupos han realizado estudios sobre la aplicación del PC en el campo de las resecciones hepáticas. Chouker y cols. observaron que la aplicación del PC isquémico en resecciones hepáticas tuvo como consecuencia una mayor estabilidad hemodinámica tras la reperfusión y una disminución de los niveles de transaminasas con respecto al grupo no preconditionado (208). Por otro lado, Li y cols., demostraron el efecto beneficioso del PC en pacientes con cirrosis sometidos a hepatectomías (229), y por último, Nuzzo y cols. en resecciones hepáticas con tiempos más largos de oclusión del flujo sanguíneo que los empleados en los estudios anteriores (227).