Influencia del precondicionamiento isquémico y anestésico en la lesión por isquemia reperfusión durante la cirugía de resección hepática realizada con oclusión vascular intermitente

Aurora Rodríguez Campos

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**) i a través del Dipòsit Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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**) y a través del Repositorio Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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**) service and by the UB Digital Repository (**diposit.ub.edu**) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

INFLUENCIA DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO Y ANESTÉSICO EN LA LESIÓN POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN DURANTE LA CIRUGÍA DE RESECCIÓN HEPÁTICA REALIZADA CON OCLUSIÓN VASCULAR INTERMITENTE

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en Medicina por:

AURORA RODRÍGUEZ CAMPOS

Directora: **Prof. Carmen Gomar Sancho**

Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques

Línea de investigación: Fisiopatologia de les malaties medicoquirúrgiques

Facultad de Medicina

Universitat de Barcelona

Barcelona, 2015

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Dept. Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques
Casanova, 143
08036 Barcelona
Tf. 934039684
Facultat de Medicina

La Profesora Carmen Gómar Sancho hace constar que el trabajo **" Influencia del precondicionamiento isquémico y anestésico en la lesión por isquemia reperfusión durante la cirugía de resección hepática realizada con oclusión vascular intermitente"** ha sido realizado bajo mi dirección por la doctoranda **Aurora Rodríguez Campos** para optar al Grado de Doctor. El contenido del estudio ha sido objeto de una publicación que cumple la normativa vigente de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, 25 de Mayo 2015

Fdo.
Carmen Gomar Sancho
Directora de la Tesis

A Marcel, Josep y Marina

“ Aunque no logres alcanzar tu objetivo, puedes sentirte bien con el simple hecho de haber realizado el esfuerzo…..”
Dalai Lama

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A la Dra. Pilar Taurà, por su estímulo, paciencia y colaboración durante estos diez años de mi vida, guiando los pasos de la investigación, solucionando los problemas que acontecían y compartiendo toda su experiencia tanto clínica, científica como personal para que se pudiera llevar a cabo este trabajo. Sin su ayuda esta tesis no hubiera sido posible.

A la Dra. Carmen Gomar, por su constante ánimo y apoyo. Con el espíritu crítico de sus enseñanzas he aprendido que en un trabajo de investigación no obtener los resultados esperados no es lo más importante, lo esencial es haber aprendido a investigar.

A la Dra. Maribel García, por su amistad, por impulsarme a iniciar un estudio de investigación para obtener el grado de Doctor y por estar siempre dispuesta, con su gran capacidad de trabajo, a colaborar en lo que he necesitado durante todo este período.

Al Dr. Esteve Cugat, por su estímulo y su apoyo incondicional durante todos estos años, por ayudarme a creer en mí misma y compartir la cirugía de todos los pacientes de esta Tesis.

A los diferentes integrantes en los años del estudio del equipo de cirugía hepatobiliar del Hospital Universitari Mútua de Terrassa, en especial a los Drs. Maribel García, Eric Herrero y Judith Camps por esperar pacientemente una hora después de la resección para poder obtener las muestras necesarias para el estudio y colaborar en la recogida de datos e iconografía para esta Tesis.

Al Dr. Sergi Sabatés, por su amistad, gran paciencia e inestimable ayuda con el análisis estadístico.

Al Servicio de Anatomía Patológica y de Laboratorio del Hospital Universitari Mútua de Terrassa por permitirme guardar las muestras en sus neveras durante tantos años y en especial al personal técnico, por procesar de forma altruista todas las muestras para su posterior análisis.

A la Dra. Pilar Forcada, por realizar el estudio anatomopatológico de todos los pacientes del estudio siempre con una sonrisa y sin desfallecer a pesar de las dificultades de la vida.

A los equipos de enfermería de los quirófanos, reanimación, semicríticos y planta 8 del Hospital Universitari Mútua de Terrassa, por su paciencia, colaboración y ayuda.

A la Fundació per la Docència i Recerca Mútua de Terrasa, por la concesión de una beca de investigación que me permitió la realización de esta tesis doctoral.

Al Dr. Manuel Morales y al Centro Esther Koplowitz de Barcelona, por permitirme la utilización de sus instalaciones para la realización de las determinaciones de la iNOS. Y a Albert García, por efectuar las múltiples determinaciones en un tiempo record.

A los diferentes residentes del Servicio de Anestesiología y Reanimación del Hospital Universitari Mútua de Terrassa que durante su rotación por el quirófano de cirugía me han ayudado en la realización de este trabajo.

A mi hija Marina, por ayudarme con mucho cariño en la introducción de los pacientes en la base de datos y en la revisión final de la bibliografía.

A Marcel, por estar siempre a mi lado, animándome con su cariño e infinita paciencia durante los momentos de desesperación y por su colaboración en la edición final de esta tesis.

En especial a mis padres, por impulsarme a estudiar medicina, por su cariño, apoyo e incondicional confianza.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN **19**
2. INTRODUCCIÓN **27**
2.1. CIRUGÍA HEPÁTICA DE RESECCIÓN TUMORAL 29
2.1.1. Indicaciones 29
2.1.1.1. Tumores hepáticos primarios malignos 29
2.1.1.2. Tumores metastásicos 29
2.1.1.2.1. Cáncer colorrectal 30
2.1.1.2.2. Tumores neuroendocrinos 30
2.1.1.2.3. Metástasis no colorrectales, no neuroendocrinas 30
2.1.2. Anatomía quirúrgica y vascularización hepática 31
2.1.2.1. Anatomía quirúrgica 31
2.1.2.2. Vascularización hepática 31
2.1.3. Técnicas de oclusión y control vascular 32
2.1.3.1. Oclusión del pedículo hepático (maniobra de Pringle) 32
2.1.3.2. Oclusión hemihepática 33
2.1.3.3. Exclusión vascular total 33
2.1.3. Otras estrategias para minimizar la hemorragia: control de la presión venosa central 34
2.1.4.Complicaciones en cirugía hepática: insuficiencia hepática postoperatoria. 35
2.2. LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN HEPÁTICA Y RELEVANCIA CLÍNICA 37
2.2.1. Fisiopatología 38
2.2.1.1. Lesión en el período de isquemia 38
2.2.1.2. Lesión en el período de reperfusión 39
2.2.1.2.1. Fase inicial o aguda 39
2.1.2.2.2. Fase tardía o subaguda 40
2.2.1.3. Bases moleculares y mecanismos celulares 40
2.2.1.3.1 Óxido nítrico 42
2.2.1.4. Muerte celular en la isquemia-reperfusión hepática 42
2.2.1.4.1. Necrosis 43
2.2.1.4.2. Apoptosis 43
2.2.1.4.3. Necroapoptosis 43
2.3. PRECONDICIONAMIENTO 44
2.3.1. Generalidades 44
2.3.2. Mecanismos moleculares 46

2.3.3. Precondicionamiento isquémico hepático y relevancia clínica 48
2.3.3.1. Bases moleculares y mecanismos de protección 48
2.3.3.1.1. Adenosina y óxido nítrico 49
2.3.3.2. Relevancia clínica en cirugía hepática 49
2.3.4. Precondicionamiento anestésico 50
2.3.4.1. Bases moleculares y mecanismos de protección 50
2.3.4.2.Precondicionamiento anestésico con anestésicos halogenados y cirugía hepática 51
2.4. JUSTIFICACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS 52
3. HIPÓTESIS 55
4. OBJETIVOS 59
5. PACIENTES Y MÉTODOS 64
5.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN 65
5.2. PROTOCOLO DE ESTUDIO 65
5.2.1. Técnica anestésica 65
5.2.2. Técnica quirúrgica 66
5.3. ALEATORIZACIÓN Y GRUPOS DE ESTUDIO 68
5.4.DETERMINACIONES, METODOLOGÍA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS 69
5.4.1. Características demográficas, clínicas y bioquímicas 69
5.4.2. Datos intraoperatorios 70
5.4.3. Determinaciones analíticas y biopsias 71
5.4.3.1. Marcadores de función hepática. 72
5.4.3.2. Ácido hialurónico sérico 72
5.4.3.3. Determinación enzimática de Caspasa 3. 72
5.4.3.4. Forma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa 73
5.4.4. Evolución postoperatoria 73
5.5. RECOGIDA DE DATOS 74
5.6. TAMAÑO MUESTRAL 74
5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 75
5.8. EFECTOS DE LA DURACIÓN DEL ESTUDIO 75
6. RESULTADOS 77
6.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES 79
6.2. DATOS INTRAOPERATORIOS 81
6.3.1. Hemodinamia y complicaciones intraoperatorias 81
6.3.1.1. Presión arterial media. 82
6.3.1.2. Frecuencia cardíaca 82

6.3.1.3. Presión venosa central..... 83
6.3.1.4. Índice cardíaco. 84
6.3.1.5. Índice de resistencias vasculares sistémicas 84
6.3.1.6. Complicaciones intraoperatorias 85
6.4 FUNCIÓN HEPÁTICA POSTOPERATORIA 85
6.4.1. Lesión hepatocelular. 85
6.4.1.1. Transaminasas 85
6.4.1.2. Bilirrubina y tiempo de protrombina 86
6.4.2. Lesión del sinusoide endotelial. Ácido hialurónico. 87
6.4.3.Correlaciones entre los diferentes parámetros bioquímicos, características demográficas de los pacientes y variables quirúrgicas. 88
6.4.4. Lesión histológica 88
6.4.5. Actividad de caspasa 3 90
6.4.6. Forma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa 90
6.5. EVOLUCIÓN CLÍNICA POSTOPERATORIA 91
6.5.1. Complicaciones postoperatorias 91
6.6. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA ACTUARIAL ANUAL 94
6.7. HEPATECTOMÍA MAYOR Y MENOR 94
7. DISCUSIÓN 105
8. CONCLUSIONES 129
9. BIBLIOGRAFÍA 133
10. ANEXO 151
10.1. PUBLICACIÓN 153
10.2. ABREVIATURAS 165

1. RESUMEN

Antecedentes

La resección hepática se considera la primera opción terapéutica en el tratamiento de las neoplasias primarias y secundarias de hígado. La hemorragia es el principal riesgo de la cirugía y está relacionada con las complicaciones postoperatorias y la supervivencia a largo plazo. El clampaje del hilio hepático (maniobra de Pringle) disminuye las pérdidas sanguíneas durante la transección hepática. Sin embargo, la secuencia isquemia-reperfusión (IR) se asocia a lesión celular que puede comportar diferentes grados de disfunción hepática y aumento de la morbimortalidad postoperatoria. Se han utilizado diferentes estrategias para modular la lesión hepática por IR: (i) **el precondicionamiento isquémico** (IPC) considerado como un fenómeno adaptativo endógeno en el cuál la exposición de los tejidos a períodos breves de isquemia transitoria seguido de sus respectivos períodos de reperfusión, protege a los mismos frente a un período de isquemia prolongado posterior y (ii) **la isquemia intermitente** (INT) que consiste en aplicar varios períodos cortos de isquemia seguidos de sus períodos de reperfusión. El IPC e INT atenúan la lesión por IR a través de mecanismos similares y complejos modificando ciertas reacciones claves en la cascada de dicha lesión, especialmente en la generación del óxido nítrico (NO). **El precondicionamiento anestésico** (APC) inducido por anestésicos halogenados se propuso inicialmente como modulador de la lesión por IR en el miocito. Es interesante destacar que el APC y IPC comparten muchas de las vías de señalización intracelular en el mecanismo de protección frente a la lesión por IR. Aunque algunos estudios demuestran el efecto protector del IPC y APC en hepatectomías realizadas con oclusión vascular continua, permanece en controversia la influencia del IPC o el APC frente a la lesión por IR en resecciones hepáticas realizadas con oclusión vascular intermitente.

Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue determinar si el IPC o APC podían potenciar la citoprotección hepática contra la lesión por IR en pacientes a los que se les realizaba una resección hepática con oclusión vascular intermitente. El objetivo secundario fue evaluar el impacto del IPC y APC en la evolución postoperatoria.

Metodología

Un total de 106 pacientes sin hepatopatía previa intervenidos de forma electiva de resección hepática con maniobra de Pringle intermitente (ciclos de 15 minutos de oclusión del hilio hepático seguidos de un período de 5 minutos sin clampaje) fueron incluidos en este estudio prospectivo y randomizado. Los pacientes se aleatorizaron

en tres grupos: (i) Grupo IPC, en el que los pacientes recibieron un pretratamiento que consistía en clampaje del hilio hepático de 10 minutos seguido de un período de 10 minutos sin clampaje, previo al clampaje intermitente; (ii) Grupo APC, en el cual se administraba sevoflorane a una concentración alveolar mínima de 1,5 durante 20 minutos previo al clampaje intermitente y (iii) Grupo INT, sin precondicionamiento isquémico ni anestésico previo al clampaje intermitente. Se estratificó también la cohorte de estudio según la extensión de la cirugía, hepatectomía mayor (≥3 segmentos) y hepatectomía menor (<3 segmentos), para evaluar si podía influir en los resultados del precondicionamiento.

El efecto de protección frente a la IR fue evaluado comparando marcadores de disfunción hepatocitaria y endotelial, lesión histológica, actividad de caspasa 3 y evolución postoperatoria. Adicionalmente determinamos la expresión de la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS) para valorar su implicación en el mecanismo molecular del precondicionamiento.

Resultados

No encontramos diferencias en las características demográficas, clínicas ni datos de laboratorio entre los grupos. La etiología más frecuente del cáncer hepático fueron las metástasis de cáncer colorrectal (80% de los pacientes). La hemodinamia intraoperatoria fue similar en los tres grupos del estudio. El diagnóstico, tipo de resección, tiempo total de isquemia, número de clampajes, tiempo quirúrgico y pérdida sanguínea no mostraron diferencias entre los grupos. La cinética de las transaminasas, bilirrubina y tiempo de protrombina (INR) durante los 7 días del postoperatorio fue similar en todos los grupos. Una hora postresección los niveles séricos de ácido hialurónico (HA) se incrementaron significativamente ($p<0,001$) en todos los grupos pero sin diferencias entre ellos ($p=0,514$). La apoptosis de las células hepáticas se valoró indirectamente a través de la expresión de caspasa 3 una hora postresección. No encontramos diferencias en el índice apoptoico entre los grupos de estudio. El análisis de la lesión histológica una hora postresección no mostró diferencias entre grupos. En los tres grupos, la expresión tisular de la iNOS no mostró ningún cambio respecto a los valores basales. La severidad y frecuencia de complicaciones, transferencia a la unidad de cuidados intensivos y estancia hospitalaria fue similar entre los tres grupos. No encontramos diferencias en la supervivencia actuarial al año estratificando por grupos de estudio. Cuando estratificamos los grupos de estudio por tipo de hepatectomía (mayor/menor) no encontramos diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros

evaluados (marcadores de función hepática, HA, lesión histológica, índice apoptoico, iNOS y evolución postoperatoria).

Conclusiones

Nuestros resultados sugieren que la aplicación de IPC o APC no ofrece protección contra la lesión por IR en las resecciones hepáticas realizadas con oclusión vascular intermitente del hilio hepático independientemente de la extensión de la resección.

Palabras clave: resección hepática; lesión hepática por isquemia-reperfusión; precondicionamiento isquémico; precondicionamiento anestésico; maniobra de Pringle intermitente.

SUMMARY

Background

Hepatic resection is considered the first-line therapeutic option in the treatment for primary and secondary liver malignancies. The main risk of the surgery is hemorrhage influencing postoperative complication rates and long-term survival. Portal triad clamping (Pringle maneuver) reduces intraoperative blood loss during hepatic transection. However, the sequence of hepatic ischemia and reperfusion (IR) has been associated with liver injury leading to postoperative liver dysfunction and increased morbidity and mortality. Many efforts have been made to modulate IR injury: (i) ischemic preconditioning (IPC), which is an endogenous adaptive phenomenon wherein exposure of tissues to a brief period of ischemia followed by a brief period of reperfusion may protect them from subsequent prolonged ischemia insult; and (ii) intermittent ischemia (INT), conducted with several short periods of ischemia, each followed by reperfusion. Both INT and IPC have been found to attenuate IR injury through a similar and complex mechanism by modifying certain key reactions of the IR cascade, mainly involving nitric oxide generation. Anesthetic preconditioning (APC) induced by halogenated anesthetics was initially proposed as a modulator of IR injury in the myocyte. Interestingly, ischemic and anesthetic preconditioning share many common intracellular signaling pathways. Although many studies have reported a protective effect of IPC and APC in hepatectomies performed under continuos inflow occlusion, it remains controversial the influence of ischemic or anesthetic preconditioning against IR in liver resections performed under intermittent inflow occlusion.

Objectives

The main objective of this trial was to determine whether IPC or APC enhance hepatic cytoprotection against IR in patients undergoing liver resection under intermittent inflow occlusion alone. The second objective was to assess the impact of IPC and APC on postoperative clinical outcome.

Methodology

A total of 106 patients without underlying liver disease undergoing elective partial liver resection under intermittent Pringle maneuver (cycles of 15-minute occlusion of the hepatic pedicle and a 5-minute clamp-free interval) were included in this prospective and randomized study. Patients were randomly assigned to 3 groups,:

(i) the IPC group, in which patients received a pretreatment consisting of clamping of the hepatic pedicle for 10 minutes followed by a 10 minute clamp-free interval before intermittent clamping; (ii) the APC group, in which, 20 minutes before intermittent occlusion inflow, sevoflurane was administered according to a minimal alveolar concentration of 1.5, and (iii) the INT group (without ischemic or anesthetic preconditioning). We also stratified the cohort study according to the extent of surgery, major (≥3 segments) versus minor hepatectomy, to assess whether the extent of surgery could impact on the analysis of preconditioning results. The effect of protection against IR was evaluated by comparing hepatocyte and endothelial disfunction markers, caspase-3 activity, histological lesions, and postoperative clinical outcome. Additionally, we determined inducible oxide nitric synthase (iNOS) expression to assess its role in the molecular mechanism of preconditioning.

Results

No significant differences were observed in clinical, demographic, and laboratory data . The most prevalent etiology was metastasis from colorectal cancer (80% of patients). Intraoperative systemic hemodynamic behavior throughout the surgical procedure was similar in the 3 groups. The diagnostic criteria, type of liver resection, total warm ischemia time, number of clampings, surgical time, and blood loss were similar in the 3 groups. The kinetics of transaminase activity and bilirubin and INR levels over 7 postoperative days was similar in all groups. One hour after resection, serum hyaluronic acid (HA) levels increased significantly ($P = 0.001$) in all groups but did not reach statistical significance between groups ($P = 0.514$). Apoptosis of the hepatic cells was evaluated indirectly through the caspase 3 expression 1 hour after resection. No differences were found in the apoptotic index among the 3 study groups. Histological analisis one hour after resection did not demonstrate difference between groups. In all groups, one hour after liver resection iNOS tissular expression showed no change from basal levels. The severity and rate of complications, transfer to intensive care, and hospital stay were similar between groups .

No differences were found in 1-year survival rate stratified by treatment group. When we stratified the 3 groups of study for type of hepatectomy (major/minor resection), no statistical differences were found in any of the variables studied (markers of liver function, HA, histological lesions, apoptotic index, iNOS and outcome).

Conclusions

Our results suggest that the use of IPC or APC offers no protection against IR injury in the setting of liver resection under intermittent inflow occlusion regardless of the extent of liver resection.

Keywords: liver resection; ischemia-reperfusion injury; ischemic preconditioning; anesthetic preconditioning; intermittent Pringle maneuver.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. CIRUGÍA HEPÁTICA DE RESECCIÓN TUMORAL

2.1.1 INDICACIONES

Con los avances en la técnica quirúrgica y anestésica, actualmente la cirugía hepática se realiza de manera rutinaria y segura tanto para tumores de hígado benignos como malignos, aunque en centros especializados. La resección hepática por tumores benignos únicamente se contempla cuando comportan sintomatología, existe duda diagnóstica o riesgo de malignización[1]. Los tumores malignos hepáticos pueden ser primarios o secundarios. Entre los tumores **primarios** más frecuentes están el **hepatocarcinoma**[2] y el colangiocarcinoma[3]. En relación a los tumores **secundarios**, el hígado constituye el órgano diana que presenta la mayor frecuencia de metástasis en relación al resto de órganos[4] . Los tumores primarios del tubo digestivo, especialmente **colorrectal**[5] y las neoplasias de mama[6] y pulmón[7] son la etiología más frecuente. Las metástasis de tumores gastrointestinales neuroendocrinos también tienen indicación de hepatectomía aunque su frecuencia es menor[8].

2.1.1.1 Tumores hepáticos primarios malignos

El tumor primario más frecuente[9] es el **hepatocarcinoma** responsable de aproximadamente unos 250.000 nuevos casos de cáncer hepático al año. Su incidencia y mortalidad ha aumentado debido al incremento de la infección por virus de la hepatitis C. Este tumor se puede dar tanto en hígado cirrótico como en hígado sano siendo mucho menos frecuente en este último[10]. En ambos casos el único tratamiento efectivo es la resección o el trasplante hepático[11], con una supervivencia a los cinco años del 30-50 % en pacientes cirróticos[12] y del 39% en pacientes sin cirrosis hepática[13]. El segundo tumor primario en frecuencia es el **colangiocarcinoma** especialmente prevalente en las zonas del noreste de Tailandia[3], siendo también en estos casos la resección hepática el tratamiento de elección[14]. Aparte de estos tumores primarios malignos con gran representatividad, existe una variedad de tumores malignos con indicación de resección hepática como estrategia para su curación, como son tumores fibrolamenares, sarcomas hepáticos y otros tumores poco frecuentes[15,16].

2.1.1.2. Tumores metastásicos

Actualmente, la presencia de metástasis hepáticas no es una contraindicación para la cirugía; muy al contrario, el tratamiento con quimioterapia coadyuvante, la

resección del tumor primario y de las metástasis hepáticas constituyen la estrategia terapéutica de elección en casos seleccionados[17,18].

2.1.1.2.1 Cáncer colorrectal

El cáncer **colorrectal** es el tercero en frecuencia en todo el mundo, en el hombre tras el de pulmón y próstata, y el segundo en la mujer tras el cáncer de mama[19]. En el momento del diagnóstico, un **25%** ya presentan metástasis y más de un **50%** desarrollarán enfermedad metastásica a lo largo de la historia natural de la enfermedad, siendo el hígado el órgano en el que metastatizan con más frecuencia[20]. Históricamente, el desarrollo de metástasis hepáticas se ha correlacionado con mal pronóstico en la evolución de la enfermedad con una supervivencia aproximada de cinco meses. En la última década, con los cambios en la estrategia terapéutica, la aparición de nuevos quimioterápicos y la mejora en las técnicas de radiofrecuencia, el pronóstico de la enfermedad ha mejorado significativamente. Sin embargo, la cirugía de resección hepática sigue siendo la única opción curativa. Actualmente, la combinación de quimioterapia sistémica y resección hepática ofrece un porcentaje elevado de curación a largo plazo, con una **supervivencia** a los **cinco años** de hasta un **58%** [21] .

2.1.1.2.2 Tumores neuroendocrinos

Los tumores neuroendocrinos son tumores poco frecuentes[22] con una alta incidencia de metástasis hepáticas (50-70%)[23]. El tratamiento quirúrgico agresivo tanto del tumor primario como de las metástasis hepáticas mejora ostensiblemente la supervivencia de los pacientes[8].

2.1.1.2.3. Metástasis no colorrectales, no neuroendocrinas

La cirugía de resección hepática secundaria a metástasis no colorrectales no neuroendocrinas está menos definida. Estudios en la literatura no demuestran aumento de la supervivencia en tumores de esófago, estómago, intestino delgado o páncreas. En el caso de las metástasis de cáncer de **mama**, la **supervivencia** reportada en los casos resecados es del **53,9 %** a los **tres años** y del 24% a los cinco años; en los tumores uroteliales del 50% y 37% y en los leiomiosarcomas del 63% y 36% respetivamente[24].

2.1.2 ANATOMÍA QUIRÚRGICA Y VASCULARIZACIÓN HEPÁTICA

2.1.2.1. Anatomía quirúrgica

La cirugía hepática actual se basa en la anatomía funcional hepática sistematizada por **Couinaud** en 1957[25], según la distribución de los pedículos portales y las venas suprahepáticas en el interior del hígado. La clasificación de Couinaud divide al hígado en dos lóbulos y ocho segmentos[26] (Figura 1). Cada segmento recibe, de manera independiente, una rama de la tríada portal formada por arteria hepática, vena porta y conducto biliar. En el año 2000, el comité científico de la Asociación Internacional Hepatobiliopancreática revisó la anatomía funcional hepática y aprobó una nueva terminología aplicable tanto a la anatomía como a los tipos de resecciones hepáticas conocida como clasificación de **Brisbane**[27,28], que es por la cuál se rigen los equipos de cirugía hepatobiliar en la actualidad. Se define como resección **mayor** la resección de tres o más segmentos hepáticos y **menor** si los segmentos resecados son inferiores a tres.

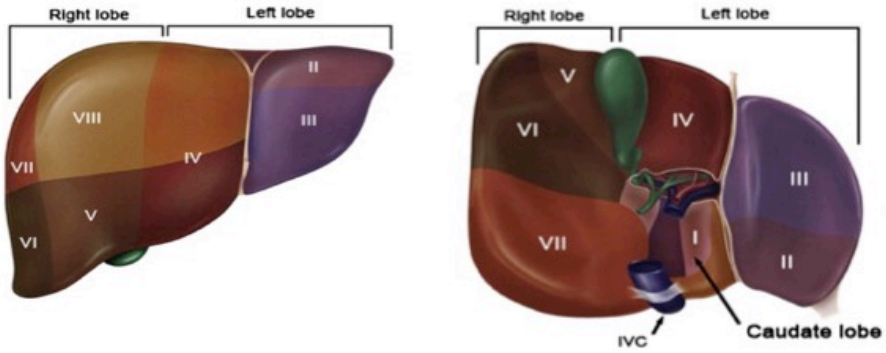

Figura 1: Anatomía funcional hepática: Vista esquemática de las caras anterior e inferior hepáticas mostrando la distribución funcional del hígado en lóbulo derecho e izquierdo y los segmentos de Couinaud. IVC: inferior cava vena. (procedente *de Brunicardi FC et al. Schwartz's principles of surgery. 9th edition. New York: McGraw-Hill ; 2010. p. 31–3*)

2.1.2.2. Vascularización hepática

El hígado tiene una doble irrigación, recibe sangre bien oxigenada a través de la **arteria hepática** (25%) y sangre pobremente oxigenada a través de la **vena porta** procedente del territorio esplácnico (75%). Tanto la arteria hepática como la vena porta cuando entran en el hilio hepático, se dividen en vasos interlobulares e interlobulillares cada vez más pequeños. Estos se continúan con una gran red de capilares en el sinusoide hepático, donde se produce el intercambio entre la sangre y el parénquima hepático. El retorno venoso tiene lugar a través de las venas suprahepáticas que drenan en la vena cava inferior. La característica de este tipo de

vascularización con **múltiples vasos** de **muy pequeño tamaño** como se observa en la figura 2, condiciona el riesgo de **sangrado** en la resección hepática.

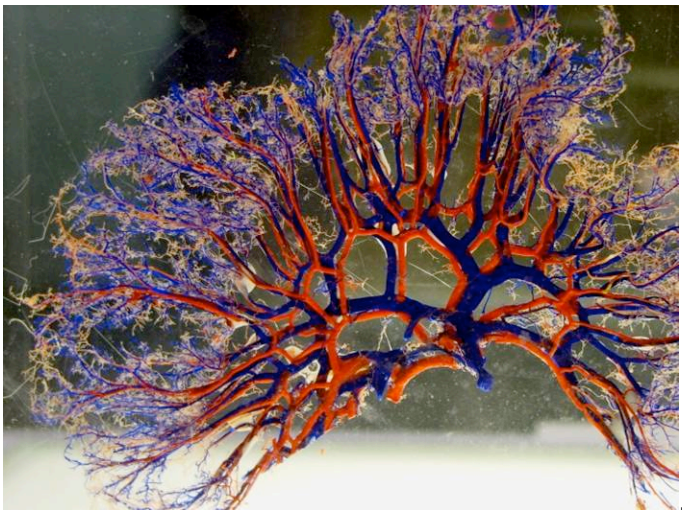

Figura 2: Vascularización hepática: en esta figura se observan la gran cantidad de vasos hepáticos de pequeño calibre.

2.1.3 TÉCNICAS DE OCLUSIÓN Y CONTROL VASCULAR

Debido a las características especiales de la vascularización hepática mencionadas en el apartado anterior, los pacientes sometidos a una resección hepática están expuestos a un alto riesgo de hemorragia, siendo la pérdida sanguínea y la disfunción hepática postoperatoria las principales complicaciones que marcan el pronóstico en este tipo de cirugía[29,30,31]. Los diferentes equipos quirúrgicos de cirugía hepatobiliar aplican métodos de oclusión vascular para minimizar la pérdida sanguínea durante la resección hepática. Las técnicas más utilizadas se describen a continuación:

2.1.3.1 Oclusión del pedículo hepático (maniobra de Pringle)

Esta maniobra descrita en 1908 por J. Hogarth Pringle[32] en el tratamiento quirúrgico de los traumatismos hepáticos, consiste en la **oclusión total** de la **tríada portal** mediante un torniquete ajustable o un “clamp” vascular[33] (figura 3). Esta oclusión puede ser aplicada de forma continua o intermitente, con períodos de isquemia de 15 minutos y cinco minutos de reperfusión, con el objetivo de evitar el efecto perjudicial de la isquemia prolongada[34]. La maniobra de Pringle no está exenta de riesgos, puede provocar alteraciones hemodinámicas y lesión por isquemia-reperfusión (IR). En hígados sanos no se aconseja superar los 60 minutos si se aplica de forma continua[35] ni las dos horas si se realiza de forma intermitente[34].

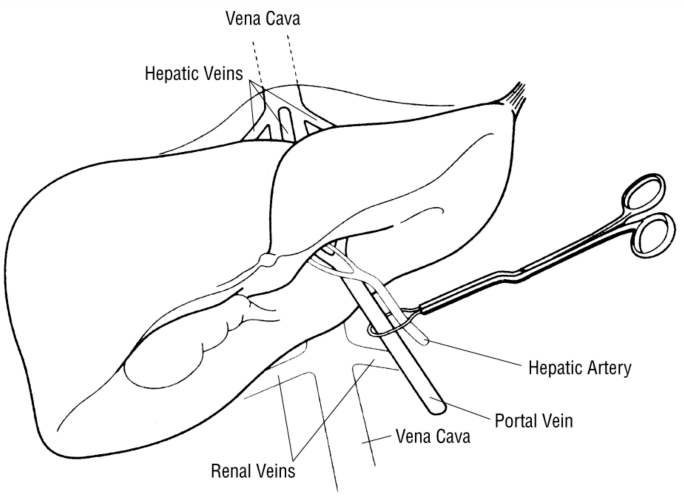

Figura 3: Maniobra de Pringle: "clamp" vascular en el hilio hepático (vena porta y arteria hepática) (procedente *de Buell JF, Arch Surg. 2001;136(5):569-575*).

2.1.3.2 Oclusión hemihepática

Esta técnica fue descrita por Makuuchi en 1986[36], consiste en interrumpir de forma **selectiva**[37](figura 4) el flujo portal y arterial aferente al lóbulo derecho o izquierdo dependiendo de si se realiza una hepatectomía derecha o izquierda. Con esta técnica se evita la lesión por isquemia-reperfusión del lóbulo que no es objeto de la resección.

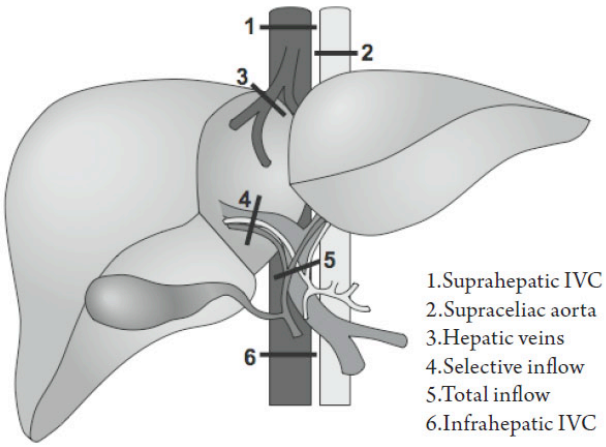

Figura 4: Clampaje selectivo hilio hepático: Diferentes tipos de oclusión vascular utilizadas en cirugía hepática. El número 4 muestra el clampaje selectivo del flujo portal y arterial hepático derecho (procedente de *Page A.J.* J Gastrointest Oncol 2012;3:19-27)

2.1.3.3. Exclusión vascular total

Fue descrita por Heaney en 1996[38], y consiste en excluir completamente el flujo vascular del hígado, tanto aferente como eferente[33] (figura 5). Se utiliza para abordar tumores de gran tamaño o centrales adyacentes a la vena cava o las venas suprahepáticas. Esta técnica provoca una gran **alteración hemodinámica** como consecuencia de la reducción del retorno venoso que condicionará la disminución del volumen sistólico con aumento compensatorio de las resistencias vasculares sistémicas[35]. Para evitar el importante estrés cardiovascular está indicado la instauración de un **bypass** veno-venoso que derive la circulación del territorio portal y vena cava infrahepática al circuito de la vena cava supradiafragmática[39].

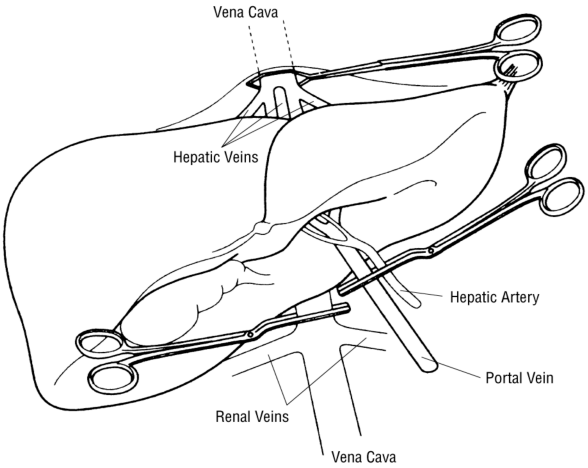

Figura 5: Exclusión vascular total: Los "clamps" vasculares están localizados en la vena cava infra y suprahepática y en el hilio hepático (vena porta y arteria hepática) (procedente *de Buell JF, Arch Surg. 2001;136(5):569-575*)

2.1.3 OTRAS ESTRATEGIAS PARA MINIMIZAR LA HEMORRAGIA: CONTROL DE LA PRESIÓN VENOSA CENTRAL

El mantenimiento de una presión venosa central (PVC) inferior a 5 mm Hg durante la resección hepática es una medida ampliamente referenciada en la literatura y de utilización rutinaria por los equipos de cirugía hepatobiliar para disminuir la hemorragia durante la transección hepática[40,41]. Debido a que la presión en la vena cava está directamente relacionada con la presión en el sinusoide hepático[42] (figura 6), se ha demostrado que una PVC entre **2-5 mm Hg** reduce las pérdidas sanguíneas, facilita la cirugía y está relacionada con una menor estancia hospitalaria[43]. La restricción de líquidos endovenosos en el pre e intraoperatorio es en la mayoría de los casos una maniobra efectiva para conseguir estos niveles; en algunas ocasiones es necesaria la administración de una perfusión endovenosa de nitroglicerina para obtener el nivel de PVC deseado[44].

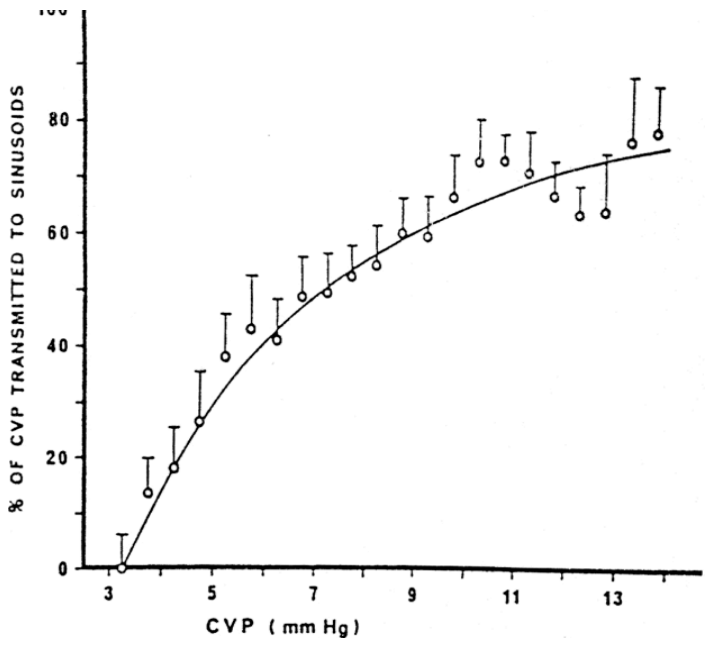

Figura 6: Relación entre PVC y presión del sinusoide hepático. Se puede observar que a medida que aumenta la PVC aumenta la presión en el sinusoide hepático (procedente *de Lautt WW, Microvasc Res, vol 33, no 1, p 51,1987*).

2.1.4 COMPLICACIONES EN CIRUGÍA HEPÁTICA: INSUFICIENCIA HEPÁTICA POSTOPERATORIA

El pronóstico de la resección hepática ha mejorado sustancialmente debido a varios factores: mejor comprensión de la anatomía funcional del hígado y sus segmentos, desarrollo y utilización de nueva tecnología diagnóstica y terapéutica intraoperatoria, adecuado control de la hemorragia quirúrgica, mejor selección de pacientes en lo que se refiere a términos de reserva funcional hepática y comorbilidad, y la concentración de las resecciones hepáticas en centros especializados[45,46]. Por todo ello se realizan con más frecuencia resecciones hepáticas mayores en hígados patológicos y además de forma repetida (rehepatectomías) para conseguir la curabilidad en los pacientes con recidiva de las metástasis hepáticas[47]. Estas situaciones pueden condicionar que el tamaño del remanente hepático sea pequeño en relación al peso corporal del paciente y por tanto incapaz de suplir las necesidades metabólicas. Este hecho aumenta el riesgo de insuficiencia hepática postoperatoria[48], causa principal de morbilidad y mortalidad postresección hepática[45-47].

Debido a la falta de consenso en la definición, valoración de la severidad y pronóstico de la insuficiencia hepática posthepatectomía en los diferentes estudios publicados en la literatura[49,50], en el año 2010, Rahbari y otros miembros del Grupo Internacional de Cirugía Hepática (IGLS)[51] establecieron una nueva definición de

insuficiencia hepática posthepatectomía (PHLF). Ésta se define como el deterioro en la habilidad del hígado para mantener sus funciones sintética, excretora y de eliminación de tóxicos, lo cuál se caracteriza por un incremento del **INR** (ratio normalizada internacional) y **bilirrubina** respecto a los valores basales prequirúrgicos, a partir del quinto día postoperatorio. Este grupo diferenció también la **severidad** de la insuficiencia hepática en tres grados A, B y C, evaluando tanto parámetros clínicos como analíticos (tabla 1). Los pacientes del **grupo A** presentarán una alteración analítica que no condicionará ningún cambio en el manejo clínico del mismo; en el **grupo B** se necesitará un cambio en el manejo clínico de los pacientes pero sin necesidad de terapias invasivas y en **el grupo C**, será necesario un tratamiento con técnicas invasivas. Cada uno de estos grados de severidad condicionará un diferente pronóstico evolutivo. La mortalidad se incrementa con los grados siendo del 0% en el grado A, 12% en el B y un 54% en el C.

La incidencia de PHLF está cifrada en más de un 8% de los casos dependiendo de las condiciones clínicas previas del paciente o de la reserva funcional hepática previa a la cirugía[52]. Debida a su relevancia clínica es importante identificar y tratar los factores que influyen en su aparición. La edad inferior a 65 años, la obesidad, la diabetes, la patología hepática previa o el tratamiento con quimioterapia son conocidos factores de riesgo preoperatorio[53]. Asimismo, la severidad de la lesión por IR[54], hemorragia intraoperatoria[45,47,55] y el volumen insuficiente del hígado remanente[48] son factores quirúrgicos que inciden de manera importante en el desarrollo posterior de la PHLF. Por otro lado, un **diagnóstico y tratamiento precoces** de esta entidad en el postoperatorio marcarán la disminución de la morbimortalidad en los pacientes[56].

Tabla 1. Grados de insuficiencia hepática posthepatectomía

	Grado A	Grado B	Grado C
Tratamiento específico	No	PFC,Albúmina,diuréticos diarios, ventilación no invasiva, transferencia semicríticos o UCI	Transferir a UCI, drogas vasoactivas,hemodiálisis, intubación y ventilación mecánica, soporte hepático externo o trasplante
Función hepática	Coagulación adecuada (INR<1.5). Sin sintomatología neurológica	Coagulación inadecuada (INR<1.5>2). Inicio síntomas neurológicos (somnolencia, confusión)	Coagulación inadecuada (INR>2). Síntomas neurológicos severos/encefalopatía hepática
Función renal	Diuresis adecuada (>0.5mL/kg/h). BUN <150 mg/dL. No síntomas de uremia	Diuresis inadecuada (<0.5 ml/kg/h). BUN <150 mg/dL. No síntomas de uremia	Disfunción renal no tratable con diuréticos. BUN>150 mg/dL. Síntomas de uremia
Función pulmonar	Saturación O_2 >90%. Posibilidad de aporte de O_2 por cánulas nasales o mascarilla facial.	Saturación de O_2 <90% con necesidad de aporte de O_2 mediante cánulas nasales o mascarilla facial.	Hipoxemia severa y refractaria con Saturación de O_2 <85% a pesar de aporte de O_2 a altas concentraciones
Evaluación adicional	No	Ecografía o TC abdominal. Radiografía de tórax. Hemocultivo, cultivo de esputo o orina. TC craneal	Ecografía o TC abdominal. Radiografía de tórax. Hemocultivo, cultivo de esputo o orina. TC craneal. Necesidad de monitorización PIC.

PFC: plasma freco congelado. BUN: nitrógeno ureico sanguíneo. PIC: presión intracraneal (Modificada de Rahbari NN, Surgery 2011;149:713-24)

2.2 LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN HEPÁTICA Y RELEVANCIA CLÍNICA

La lesión por IR es un proceso multifactorial que se produce al interrumpir el flujo sanguíneo de un órgano (isquemia) y posteriormente, la recuperación del mismo (reperfusión). La **isquemia** provoca muerte celular por sí misma, tiempo dependiente, pero el daño principal se produce durante la **reperfusión** al restablecerse el aporte de oxígeno[57]. El resultado final es una alteración estructural y funcional de la célula que provoca muerte celular y fallo de las funciones del órgano[58-60].

La isquemia y consiguiente reperfusión del hígado puede ocurrir en diferentes situaciones clínicas. Éstas incluyen la oclusión vascular temporal durante la **cirugía hepática**[35,61], en situaciones de bajo flujo hepático como la utilización de **circulación extracorpórea** en cirugía cardiovascular[62] o en estados de **shock** hemorrágico o cardiogénico[63,64] y como elemento central en los procedimientos de **trasplante hepático**[65]. Esta secuencia de IR causará una lesión celular que puede provocar diferentes grados de disfunción hepática que incrementarán la morbimortalidad de los pacientes[59,66,67].

2.2.1 FISIOPATOLOGÍA

En la fisiopatología de la lesión por IR están implicados múltiples mecanismos moleculares e interacciones celulares[57,58,67-69]. La consecuencia de estos procesos son una serie de **alteraciones estructurales** caracterizados por edema celular, vacuolización, disrupción de células sinusoidales endoteliales (SECs) e infiltración de polimorfonucleares[58], que en última instancia producirán **muerte celular** por apoptosis o necrosis[70]. Esto se manifiesta **clínicamente** con la elevación de los enzimas hepáticos, alteración de las estructuras biliares, disfunción clínica e incluso, **fallo hepático**[66]. Además, otros órganos como el pulmón, riñón, corazón y vasos sanguíneos, desarrollarán una disfunción secundaria a la insuficiencia hepática[71].

Aunque clásicamente la lesión por IR se ha dividido en dos fases, la lesión debida a la isquemia y la causada por la reperfusión, la separación de los episodios celulares que ocurren en cada fase no es absoluta, ya que el daño celular en el órgano hipóxico se acentúa después de la restauración del aporte de oxígeno, lo que sugiere que los episodios que suceden en la reperfusión son la consecuencia de los que se inician durante la isquemia[60,72].

2.2.1.1 Lesión en el período de isquemia

Durante la isquemia, con la pérdida de aporte de oxígeno se altera la función de la cadena mitocondrial inhibiéndose el proceso de fosforilación oxidativa, lo que comporta una **reducción** en la síntesis de **adenosíntrifosfato (ATP)** en las células hepáticas[73]. Esta disminución de ATP provoca una inhibición de las bombas de membrana dependientes del mismo produciéndose alteraciones en el transporte iónico a través de la membrana plasmática. La consecuencia es un **incremento** del **sodio** intracelular con el consiguiente edema de los hepatocitos, células Kupffer y SECs, y un aumento del **calcio** citoplasmático, que provocará la activación de las fosfolipasas de la membrana celular con degradación de los fosfolípidos y disrupción de la misma (peroxidación lipídica). Todos estos procesos conducirán a la muerte celular[74,75] .

Por otro lado, el catabolismo del ATP lleva a la acumulación de **hipoxantina** que con el restablecimiento del aporte de oxígeno durante la reperfusión será la fuente de producción de **radicales libres de oxígeno (RLO)** a través del sistema Xantina-Oxidasa[74,75], activada por el incremento de calcio y consiguiente producción de proteasas. Los RLO tendrán un papel preponderante en la reperfusión[73,76,77] (figura 7)

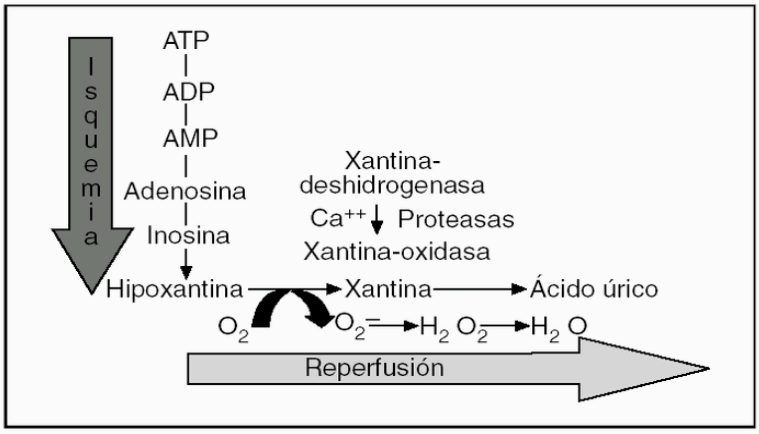

Figura 7: Catabolismo ATP en fase isquemia y producción de radicales libres de oxígeno en la reperfusión. *(procedente de Grande L, Cir. Esp. 2006 Nov;80(5):275-82.)*

Durante la isquemia, también se activan una serie de cascadas inflamatorias y protrombóticas debidas a la liberación de moléculas de adhesión de leucocitos, citoquinas y agentes bioactivos (endotelina, tromboxano A_2) a nivel endotelial, y a una inhibición de la transcripción de algunos genes protectores como la óxido nítrico sintetasa (NOS). Todo ello provoca un desequilibrio entre sustancias vasodilatadoras como el **óxido nítrico** (NO) y vasoconstrictoras como la **endotelina**[69,72,78]. Este hecho y el edema de las SECs producirán un estrechamiento de los sinusoides que dará lugar a fenómenos de **"ausencia de flujo"** que incrementará la situación de isquemia y alterará aún más la microcirculación hepática. Los procesos anteriormente mencionados darán lugar a un estado proinflamatorio que aumentará la vulnerabilidad del tejido durante la reperfusión y producirá la muerte celular[68,76].

2.2.1.2 Lesión en el período de reperfusión

La reperfusión del hígado previamente isquémico inicia toda una serie de fenómenos inflamatorios en los que están implicados múltiples mediadores de la inflamación, plaquetas, leucocitos y endotelio vascular, los cuáles, al interaccionar, derivan en la lesión por reperfusión[57,59,68,69]. La evidencia experimental muestra que existen dos fases[67,69,72,79](Figura 8).

2.2.1.2.1 Fase inicial o aguda

Esta fase se inicia **inmediatamente** después de la reperfusión y dura aproximadamente **seis horas**. El hecho principal es la activación de las células **Kupffer** con producción de RLO, activación de factores del complemento y reclutamiento y activación de linfocitos T CD4[58,67,80].

2.1.2.2.2 Fase tardía o subaguda

La fase **tardía** comprende desde la **6ª a las 24ª horas**, con un máximo a las 18-24 horas. Se caracteriza por la infiltración masiva de linfocitos **polimorfonucleares** (PMN)[67,81]. En esta fase, las citoquinas proinflamatorias, especialmente el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), interleucina 1[82], factor plaquetario[83], quimioquinas y factores activados del complemento[84] liberados en la fase inicial son los responsables del reclutamiento de PMN. Estos PMN activados liberan RLO y proteasas causantes ambos del estrés oxidativo y de la lesión hepatocelular en esta fase subaguda, que es mucho más grave que la fase precoz[67,81].

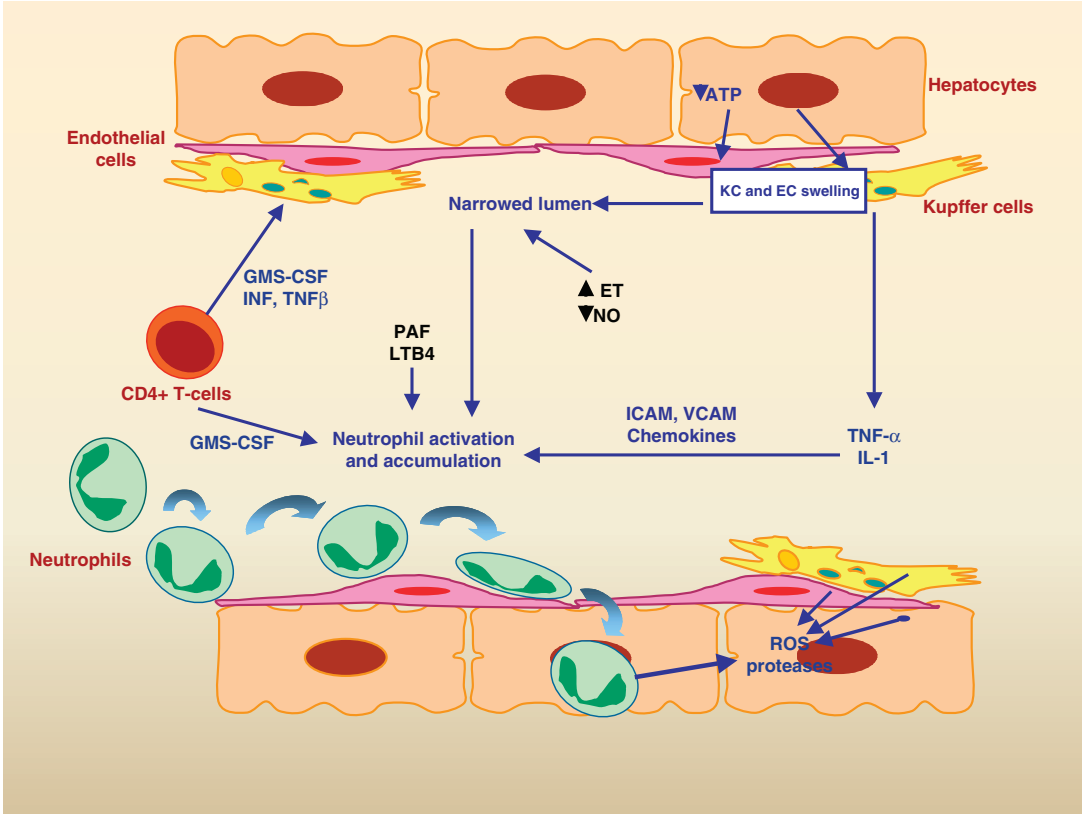

Figura 8: Fases de la lesión hepática por IR. EC: Endothelial cell; KC: Kupffer cell; ATP: Adenosine triphosphate; TNF: Tumor necrosis factor; IL: Interleukin; ICAM: Intercellular adhesion molecule; VCAM: Vascular adhesion molecule; PAF: Platelet activation factor; LTB4: Leukotriene B4; GMS-CSF: Granulocyte macrophage colony stimulating factor; INF: Interferon; ROS: Reactive oxygen species (procedente *de Massip-Salcedo, Liver Int. 2007 Feb;27(1):6-16.*)

2.2.1.3 Bases moleculares y mecanismos celulares

Si bien los mecanismos precisos que dan lugar a la lesión por IR no están del todo dilucidados, existe una clara evidencia de la implicación principal de una serie de componentes celulares y sustancias bioactivas[85] (figura 9) : 1) los **RLO**, que producen una lesión directa mediante oxidación y degradación proteica, peroxidación lipídica y

lesión del DNA, así como una inducción directa y regulación de la muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis[70,86]; 2) las células **Kupffer**, que una vez activadas, producen la liberación de sustancias proinflamatorias y RLO[72,80]; 3) la activación del **complemento** que provoca la adherencia leucocitaria en el endotelio vascular, diapédesis de los neutrófilos y migración de los mismos a los focos inflamatorios con su posterior liberación de productos citotóxicos[69,84]; 4) el **endotelio vascular** cuya importancia es crucial en la lesión hepática por IR, pues al activarse su superficie se liberan mediadores de la inflamación, sustancias vasoconstrictoras como la endotelina y moléculas de adhesión de leucocitos que provocarán una serie de cambios estructurales que conllevarán al estrechamiento de los sinusoides y alteraciones en la microcirculación[57,69,72,87]; y 5) los **neutrófilos**, responsables de la mayoría de las lesiones producidas durante la reperfusión[60,69,72].

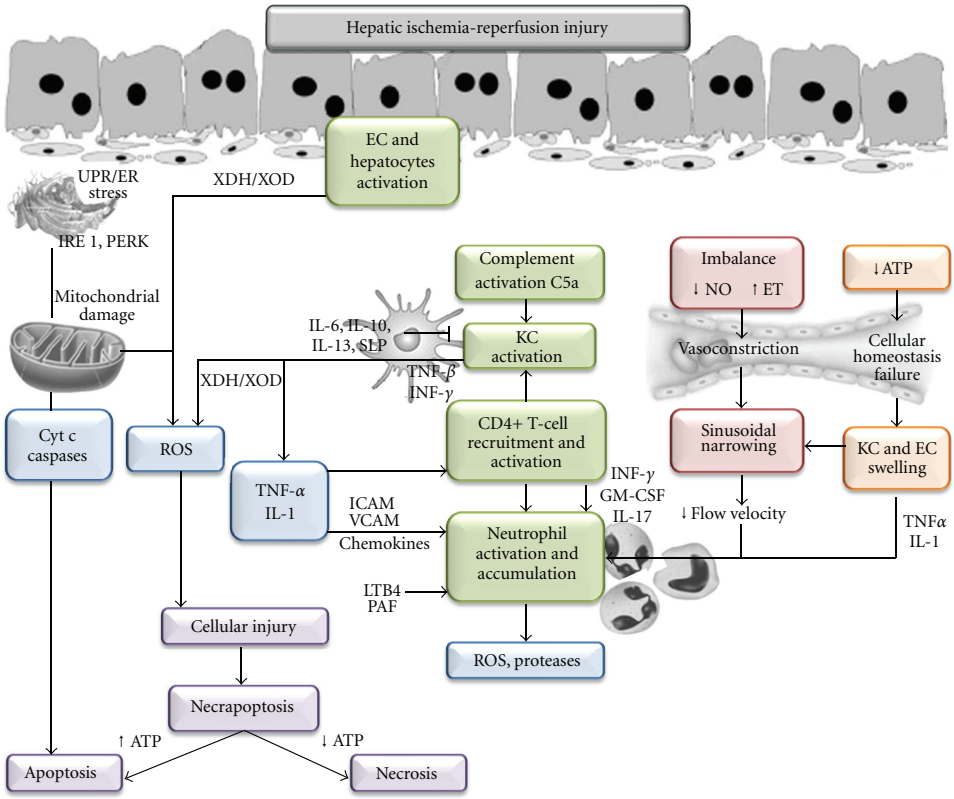

Figura 9: Mecanismos moleculares involucrados en la lesión hepática por IR. EC, endothelial cell; ET, endothelin; UPR/ER, unfolded protein response/endoplasmic reticulum; IRE1, inositol-requiring enzyme 1; PERK, PKR-like ER kinase; SLP, secretory leukocyte protease inhibitor; ICAM, intracellular cell adhesion molecule; VCAM, vascular cell adhesion molecule; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL, interleukin; INF, interferon; TNF, tumor necrosis factor; PAF, platelet-activating factor; LTB4, leucotriene B4; KC, Kupffer cell; X/XOD, xanthine/xanthine oxidase; Cyt c: cytochrome c. (procedente *de Mendes-Braz, J Biomed Biotechnol. 2012; 2012: 298657*)

2.2.1.3.1 Óxido nítrico

Un mediador crucial en la patogenia de la lesión por IR es el NO o factor de relajación endotelial[78]. El NO se genera en el hígado a partir de la L-arginina por la acción de la NO sintetasa endotelial (eNOS) o la NO sintetasa inducible (iNOS)[88]. La **eNOS** sólo se expresa en las células endoteliales, mientras que la iNOS se encuentra también en hepatocitos y células Kupffer[67]. La iNOS no se encuentra constitutivamente en el hígado normal pero puede inducirse por mediadores proinflamatorios en situaciones patológicas como la IR y da lugar a grandes cantidades de NO[89]. En condiciones fisiológicas únicamente la eNOS está presente en el hígado y las bajas cantidades de NO producidas regulan la perfusión hepática, previenen la adhesión plaquetar y la trombosis, la acumulación de neutrófilos y la producción de mediadores inflamatorios[90].

El NO es un potente **vasodilatador** que difunde libremente a través de las membranas. En respuesta a la vasoconstricción, el NO puede inducir vasodilatación a nivel sinusoidal y presinusoidal, manteniendo un equilibrio con sustancias vasoconstrictoras como la endotelina[91]. Además de su efecto vasodilatador, el NO reacciona con el superóxido formando un potente oxidante, el peroxinitrito[92].

La inducción de NO por vía de la **iNOS** que comienza aproximadamente una hora postreperfusión, puede tener tantos efectos protectores como deletéreos, esto dependerá del tipo de agresión, del nivel y duración de la expresión de iNOS y de la producción simultánea de anión superóxido[67,93].

En respuesta a la lesión por IR se produce un aumento y activación de la NOS[69,78]. El papel del NO en esta lesión no está del todo dilucidado y tiene un efecto dual. Mientras que el NO endógeno o exógeno protege al hepatocito y células endoteliales contra la lesión por IR, grandes cantidades de NO, posiblemente por la formación del peroxinitrito, tienen el efecto contrario[94]. En los estudios sobre el NO procedente de la iNOS, los resultados son contradictorios[95-98].

2.2.1.4 Muerte celular en la isquemia-reperfusión hepática

El daño hepático debido a lesión por IR genera dos tipos de muerte celular, apoptosis y necrosis de las células hepáticas. Aunque la necrosis y apoptosis son dos entidades diferentes e independientes[99] (figura 10), los dos modelos de muerte celular coexisten en este tipo de lesión hepática[70,100]. Este fenómeno se conoce con el nombre de necroapoptosis celular[101].

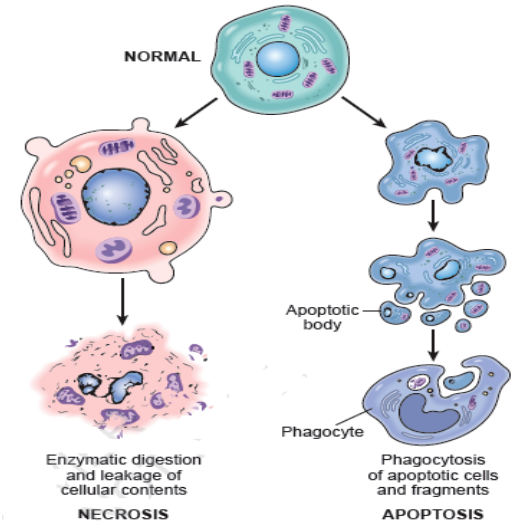

Figura 10: Diferencias estructurales entre apoptosis y necrosis. *(procedente de Gerald Karp. Biología celular y molecular. 4º Edición. Mexico: Mcgraw-Hill; 2005.)*

2.2.1.4.1 Necrosis

La **necrosis** es un término referente a la muerte celular asociada a pérdida del control del balance iónico, edema y lisis celular. Esta última provoca liberación de enzimas y otros elementos celulares, dando lugar a una **respuesta inflamatoria**[102]. Este tipo de muerte celular está relacionada con la depleción de ATP como sucede en la lesión hepática por IR[100].

2.2.1.4.2. Apoptosis

La **apoptosis** o muerte celular programada fue descrita para describir una morfología particular de muerte celular común a la gran mayoría de muertes celulares **fisiológicas**[103]. Esta morfología incluye condensación del núcleo, marginación de la cromatina y fragmentación del núcleo y citoplasma en cuerpos **apoptoicos** que son fagocitados por las células vecinas[103,104]. En la descripción original, las organelas permanecen intactas, no hay liberación del contenido celular ni respuesta inflamatoria y afecta a células individuales en un determinado órgano. La vía apoptoica en el hígado isquémico es compleja, involucra liberación de TNFα, diversas caspasas y citocromo C de la mitocondria, resultando todo ello en una activación de la **caspasa-3**, que es la principal efectora, la cuál produce la fragmentación del DNA. Todo este proceso es dependiente de **ATP**[70,86,105].

2.2.1.4.3 Necroapoptosis

En la muerte celular debida a lesión hepática por IR están implicados los dos tipos de muerte celular, necrosis y apoptosis. Aunque algunos autores defienden que la mayor parte es debida a necrosis oncótica[106] otros consideran a la apoptosis el mecanismo principal de la misma[70,86]. En estudios recientes se ha demostrado que ambas pueden existir simultáneamente e incluso compartir algunas de las vías de

señalización en particular a nivel mitocondrial, siendo la presencia o ausencia de ATP la determinante de la producción de necrosis o apoptosis[107] (figura 11). Si al inducirse las alteraciones a nivel mitocondrial durante la reperfusión, existe una depleción de ATP, se bloquearán las señales apoptoicas y se producirá necrosis, mientras que si se dispone de un sustrato para glucólisis se evitará la depleción de ATP, por lo que continuará la vía apoptoica[70].

La interrelación entre las dos vías de muerte celular indica que estos dos procesos no son totalmente independientes, por lo que se ha considerado la **muerte celular por IR** con el nombre de **necroapoptosis**[100,101].

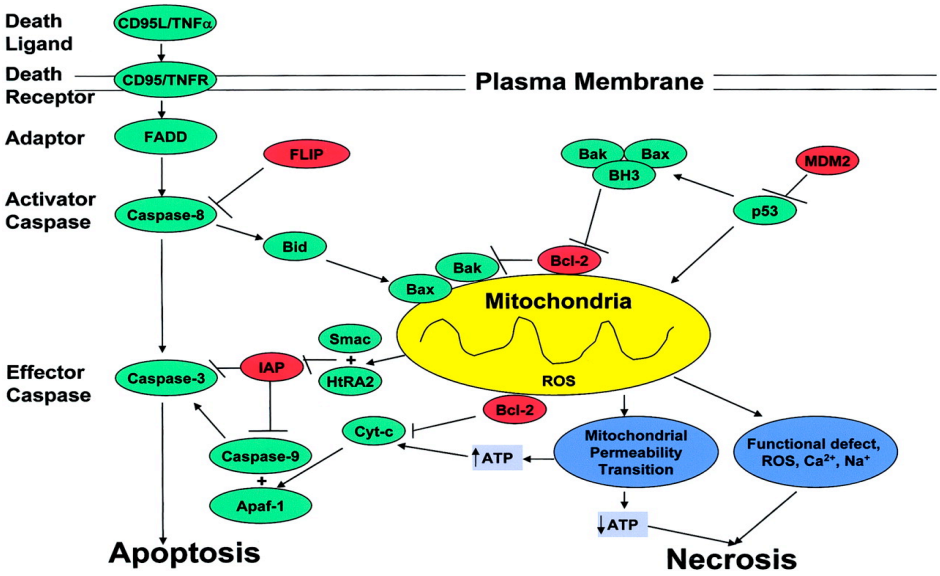

Figura 11 : Integración de las dos vías de muerte celular: apoptosis y necrosis. En esta figura se muestran las vías comunes de la apoptosis y necrosis a nivel mitocondrial dependiendo de los niveles de ATP. Los componentes en rojo inhiben la apoptosis y los que están en verde la activan. Los factores como los canales transicionales de permeabilidad mitocondrial o las especies reactivas de oxígeno (azul) pueden causar apoptosis o necrosis dependiendo de los nivels de ATP. FLIP, FLICE-like inhibitory protein; IAP, inhibitor of apoptosis proteins; Apaf, apoptotic protease activating factor; Cyt-c, cytochrome *c*; TNFR, TNF receptor; BH3, Bcl-2 homology-3.(Procedente de *Bathia M, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004 Feb;286(2):G189-96.)*

2.3 PRECONDICIONAMIENTO

2.3.1 GENERALIDADES

Una de las principales estrategias descritas para disminuir la lesión por IR es el fenómeno de precondicionamiento. El término de **precondicionamiento** fue introducido por primera vez al describir una observación experimental en corazones caninos expuestos a cortos períodos de isquemia de forma repetida. Murry y cols[108] expusieron al miocardio a un protocolo de **precondicionamiento isquémico (IPC)**

con cortos períodos de isquemia regional. De manera sorprendente encontraron que este protocolo inducía un incremento de la tolerancia a posteriores isquemias de mayor duración, reduciendo específicamente el tamaño del infarto. Desde su descripción en 1986, se han publicado más de 200 artículos por año tratando diferentes aspectos de dicho fenómeno.

Actualmente, el precondicionamiento se considera como un fenómeno adaptativo general. Un efecto protector similar al producido por el IPC puede ser inducido por agentes farmacológicos[109] y algunos estímulos estresantes físicos[110]. El precondicionamiento también puede existir en otros órganos además del corazón como el sistema nervioso central (SNC)[111], músculo esquelético[112], **hígado**[113], intestino[114], pulmón[115] y riñón[116].

El precondicionamiento se desarrolla en tres fases: 1. **Inducción o isquemia transitoria:** aplicación de sustancias y/o estímulos precondicionantes o bien oclusiones vasculares, seguidas de su período de reperfusión, de corta duración para no causar necrosis pero suficientemente prolongadas para inducir un estado de tolerancia frente a la lesión por isquemia-reperfusión. Distintos estudios demuestran que 90 segundos de isquemia transitoria y la repetición del estímulo precondicionante más de 45-60 veces no produce protección[117]; 2. **Isquemia** por oclusión vascular prolongada determinante de la aparición del área de lesión, pero de determinada duración, para que la gravedad de la lesión no impida que se manifieste el efecto beneficioso del precondicionamiento y 3. **Reperfusión**, donde se producen las lesiones por IR.

El precondicionamiento puede ser dividido en dos etapas dependiendo del tiempo que tarda en aparecer después del estímulo inicial, una **precoz,** que fue la descrita por Murry[108], que ocurre **inmediatamente** y produce una mayor protección durante **1-2 horas** (reduciendo el tamaño del infarto, mejorando la recuperación funcional postisquemia y disminuyendo las arritmias), y una **tardía,** que se descubrió simultáneamente en 1993 e independientemente por otros grupos de estudio japoneses[118] e ingleses[110], que ocurre después de **12-24 horas** y puede durar hasta **72h**, y que induce una protección menor[119].

Una característica del precondicionamiento es la **"memoria"**. Las células "recuerdan" que han sido expuestas al estrés y se hacen más resistentes a estímulos estresantes posteriores[109].

También se ha propuesto el precondicionamiento como un proceso de "todo o nada": algunas células se precondicionan y otras no. Alternativamente y dependiendo del grado del estímulo, el precondicionamiento induce un grado de respuesta. Es

posible que cada célula reaccione con **"todo o nada"** pero que los órganos exhiban un grado de respuesta dependiendo de cuantas células sean afectadas[120] .

2.3.2 MECANISMOS MOLECULARES

Existe un gran interés para identificar los mecanismos celulares involucrados en el precondicionamiento. Inicialmente Murry[121] demostró que el precondicionamiento reduce la actividad metabólica durante el período prolongado de isquemia, preservando los depósitos de ATP, pero este efecto es de corta duración (minutos) y la importancia para la supervivencia celular no está clara. Downey y colaboradores, fueron los primeros en estudiar la posible activación de las **señales intracelulares**. Demostraron que el pretratamiento con adenosina o con un agonista del receptor A_2 puede inducir una protección en corazones de conejos similar al IPC. Y por el contrario, la administración de antagonistas de estos receptores antes del IPC, puede abolir este efecto protector[122].

La **hipótesis** del mecanismo de producción del precondicionamiento se basa en la estimulación de una señal en las células inducidas por un iniciador, con activación de uno o más mediadores y posterior activación de uno o más efectores finales. Se considera al precondicionamiento como un fenómeno mediado por receptor. Es posible que sustancias endógenas producidas en el órgano durante la isquemia o reperfusión, como la adenosina, puedan iniciar esta activación. Se cree que la sustancia-señal unida a la proteína G inhibitoria (Gi), se acopla a los receptores (adenosina, bradiquinina, adrenalina, péptidos opioides, acetilcolina) jugando un papel central en el inicio del fenómeno. Otras sustancias también han sido involucradas, como el NO, RLO, calcio, metabolitos del ácido araquidónico, angiotensina 2, endotelinas y citoquinas[123].

Una vez iniciada la señal por la sustancia iniciadora, ésta se propaga activando otros sistemas de señales intracelulares por medio de mediadores intracelulares y se cree que el mecanismo de activación se debe a modificación en las proteínas (translocación y fosforilación)[124]. Dentro de los **mediadores intracelulares**, la proteinquinasa C (PKC) juega un papel central[125]. Durante la fase **precoz** del precondicionamiento se cree que la memoria intracelular está relacionada con la translocación de la **PKC** al citosol, causando una activación de la misma durante el período prolongado de isquemia. La PKC tiene un papel relevante en la protección celular.

No ha sido del todo identificado un único efector final del precondicionamiento. Los potenciales candidatos como **efectores finales** son los **canales K-ATP** dependientes en la membrana celular de la mitocondria[126]. El mecanismo exacto por el

cual la activación de estos canales causa el efecto protector es desconocido. Se postula que podría involucrar incrementos de salida de K que alteraría el gradiente iónico y el potencial electroquímico de la membrana mitocondrial, con menor acumulación del calcio y mejor preservación de depósitos de energía (ATP) y /o producción de radicales libres[127].

Durante la fase **tardía** del precondicionamiento se cree que la memoria celular está relacionada con la síntesis proteica[110]. Es la enzima **NOS** la que parece que juega un papel central en esta fase aunque otros enzimas podrían estar involucrados, como la cicloxigenasa, hemoxigenasa 1(HO-1) y proteínas que intervienen en la regulación del calcio[128].

En la figura 12 se pueden observar los diferentes mecanismos moleculares involucrados en el precondicionamiento.

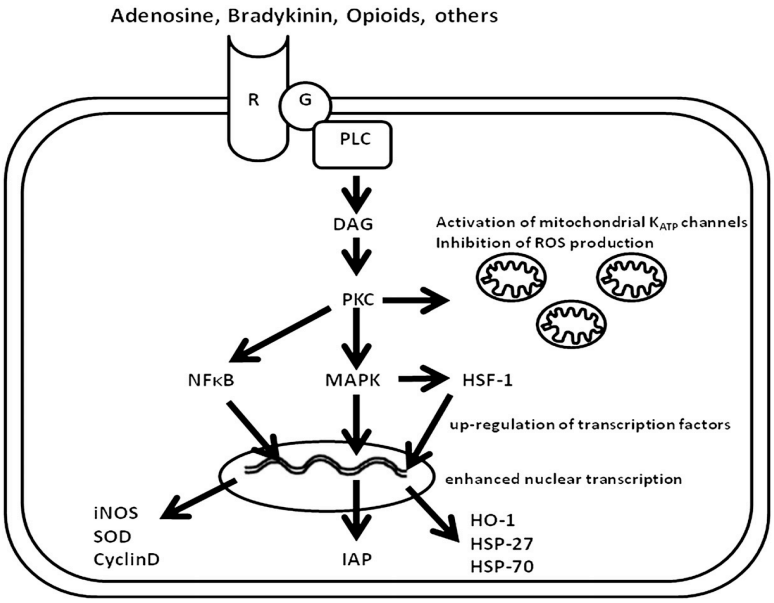

Figura 12 : Mecanismos moleculares del precondicionamiento: La unión de las sustancias iniciadoras como la adenosina con sus receptores produce la activación de mediadores como la PKC, la cuál por diferentes vías activa los canales de k_{ATP} , y mediante la activación de otras sustancias como el NK_kB incide a nivel mitocondrial produciendo la transcripción de nuevas proteínas como la iNOS claves en la fase tardía del precondicionamiento. R:receptors; G:(G-protein–coupled receptors); PLC: phospholipase-C; PKC:protein Kinase C; DAG:diacylglycerol; MAPK: mitogen-activated protein Kinase; HSF1: heat shock factor 1;NF κ B: nuclear factor κ B; iNOS: inducible oxide nitric synthase; SOD:superoxide dismutase; IAP:inhibitor of apoptosis proteins; HO-1: heme oxigenase 1; HSP-27 and HSP-70: heat shock proteins 27 and 70. (procedente de *Selzner L,Transplantation Reviews 26 (2012) 115–124*).

2.3.3 PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO HEPÁTICO Y RELEVANCIA CLÍNICA

El hígado es un órgano altamente vulnerable a la isquemia y en el que la lesión por IR es la mayor causa de morbimortalidad tras la cirugía hepática y trasplante[59,66,67].

El incremento de tolerancia a la isquemia del hígado debido al IPC podría protegerle de la lesión por IR y así ayudar a la preservación de los hígados para trasplante y mejorar la recuperación después de cirugía hepática realizada con oclusión vascular. Los mecanismos intrínsecos y mediadores implicados en el IPC en los diferentes órganos, incluyendo el **hígado**, han sido extrapolados de los estudios en corazón. Sin embargo, la tolerancia a la isquemia es específica para cada órgano y cada especie, es decir, para cada uno de ellos el número de ciclos de IR y su duración varían. De tal forma que en el miocardio se consigue protección tras varios ciclos de IR[108] pero en el hígado se obtiene tras aplicar un único ciclo de 10 minutos de isquemia seguido de 10 minutos de reperfusión[129].

2.3.3.1 Bases moleculares y mecanismos de protección

Aunque los mecanismos precisos por los cuales el IPC confiere protección al hígado frente a la IR son todavía desconocidos, en el efecto hepatoprotector del IPC se han implicado a diversos mecanismos diferentes que se producen tanto en la fase de isquemia como la de reperfusión[77,130]. El IPC preserva el **metabolismo energético** durante la isquemia, reduciendo el consumo de ATP y la acumulación de lactato[131,132]; limita el paso de **iones** a través de las membranas plasmática y mitocondrial[133] y disminuye el **estrés oxidativo** preservando el estado redox mitocondrial[77]. También reduce la acumulación de xantina durante la isquemia y por lo tanto la producción de **RLO** y sus efectos deletéreos sobre las células[134,135] (ver figura 7).

Por otro lado, el IPC modula la **respuesta inflamatoria** disminuyendo la acumulación de neutrófilos que se produce después de la IR y la producción de citoquinas proinflamatorias[136,137]. Además el IPC mejora la **perfusión sinusoidal** y la disfunción microvascular posterior a la lesión por IR debido a la liberación de NO e inhibición de sustancias vasoconstrictoras como la endotelina[138]. La prevención de la **apoptosis** celular debida al IPC se produce por la reducción de producción de citoquinas proapoptoicas o interferencia directa con los mecanismos de la apoptosis a nivel mitocondrial[139,140].

En la fase **precoz** del IPC hepático los mecanismos moleculares involucrados son principalmente la acumulación de **adenosina y NO,** y la activación de PKC y durante la fase **tardía** del IPC están implicadas la síntesis de diversas proteínas como la **NOS** y HO-1.

2.3.3.1.1. Adenosina y óxido nítrico

El IPC induce producción y liberación de **adenosina**, que activando los receptores de adenosina $\mathbf{A_2}$ aumentan la producción de **NO** y protegen las células endoteliales[141,142]. La adenosina por sí misma inhibe la adhesión leucocitaria, disminuye la expresión y adhesión de moléculas, inhibe los neutrófilos, la función plaquetar y la producción de radicales libres y además, tiene un efecto vasodilatador potente[143]. El **NO** tiene un papel central tanto en el IPC precoz como tardío, actuando como **iniciador** en el primero y como **mediador** en el segundo[144]. Parece ser que la fase precoz del precondicionamiento es síntesis proteica-independiente, en cambio la fase tardía requiere nueva síntesis de proteínas[145]. Se cree que la eNOS permite la activación de la PKC y otras quinasas[146] y que el factor nuclear Kβ (NF Kβ) y otros factores de transcripción producen un aumento en la transcripción de la iNOS[128,147]. El NO inhibe la adhesión de los **neutrófilos** al endotelio sinusoidal y el efecto vasoconstrictor de la endotelina; actúa como secuestrador de **RLO**, como el superóxido y modifica la **apoptosis** celular mediante la inhibición de la actividad de las caspasas y previniendo la liberación del citocromo C[148,149].

2.3.3.2 Relevancia clínica en cirugía hepática

En modelos experimentales se ha demostrado que el IPC protege al hígado directamente frente a la lesión por IR[141,150,151]. En la clínica humana tanto a nivel de isquemia fría como normotérmica hay evidencias del efecto beneficioso del IPC. Los primeros en mostrar el efecto del IPC en cirugía hepática humana fueron P.Clavien y cols en el año 2000[129] demostrando una disminución de las transaminasas, así como de la apoptosis celular en los pacientes precondicionados isquémicamente, aplicando un clampaje del hilio hepático de 10 minutos de duración seguido de una reperfusión de 10 minutos antes de la realización de la resección hepática con oclusión vascular continua. Estudios posteriores del mismo grupo confirmaron los hechos pero únicamente en pacientes jóvenes y con hígados esteatósicos, y sin detectar repercusión clínica evidente en relación a la morbimortalidad[152]. El beneficio de IPC fue confirmado posteriormente también por otros autores[136,153]. Sin embargo, en una revisión sistemática de estudios controlados y randomizados en resecciones hepáticas realizadas con oclusión vascular, se demostró que el IPC disminuye directamente los marcadores hepáticos de lesión por IR, aunque no se traduce en un claro beneficio clínico[154]. En el contexto del trasplante hepático, a pesar de que hay estudios que demuestran su eficacia en los hígados precondicionados[155,156], un metanálisis reciente de estudios randomizados analizando 270 trasplantes no encuentra diferencias significativas en cuanto a mortalidad, malfunción del injerto, retrasplante, ingreso en

UCI y días de hospitalización por lo que no aconseja la aplicación sistematica del IPC en estos pacientes[157].

Por tanto, el IPC hepático se propone como mecanismo adaptativo endógeno fácilmente reproducible en diferentes modelos de isquemia caliente y fría, tanto en animales como en humanos. Diversos estudios clínicos demuestran este efecto. Sin embargo, la relación causal entre el evento inicial, las vías bioquímicas y las células efectoras finales permanecen indefinidas y en controversia, así como su relevancia clínica.

2.3.4 PRECONDICIONAMIENTO ANESTÉSICO

Diversos agentes farmacológicos han actuado simulando al IPC pero sin necesidad de realizar un período de isquemia transitoria[158,159]. El término de precondicionamiento anestésico (APC) fue descrito por primera vez en 1997 por dos grupos independientes[160,161] al demostrar el efecto directo de precondicionamiento del anestésico halogenado isoflorane, vía canales K-ATP, disminuyendo el tamaño del infarto en dos estudios experimentales en animales. Posteriormente, múltiples estudios experimentales han evidenciado el efecto beneficioso del APC con anestésicos inhalatorios, especialmente isoflorane y **sevoflorane** en la célula cardíaca, reduciendo el tamaño del infarto, mejorando la contractilidad cardíaca y preservando la viabilidad después de isquemia global en los miocitos[162-165]. En el contexto clínico de la cirugía cardíaca, debido a la administración concomitante durante la cirugía de diferentes fármacos anestésicos que también pueden producir protección miocárdica, la evidencia es más limitada. A pesar de ello, diversos estudios clínicos[166-168] que evalúan el precondicionamiento con anestésicos halogenados demuestran una disminución de la incidencia de infarto miocárdico, niveles de troponinas, estancia hospitalaria y mortalidad postoperatoria.

2.3.4.1 Bases moleculares y mecanismos de protección

Los estudios en modelos aislados de células cardíacas humanas y experimentales en animales sugieren que los **compuestos** y vías de **señalización** intracelular implicados en el **APC** son similares a los de **IPC** (figura 13). La preservación del estado redox mitocondrial, la disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias y del acúmulo de neutrófilos y la modulación de la apoptosis son, al igual que en el IPC, los mecanismos de protección frente a la lesión por IR referenciados en la literatura en el APC con anestésicos inhalatorios[123,162].

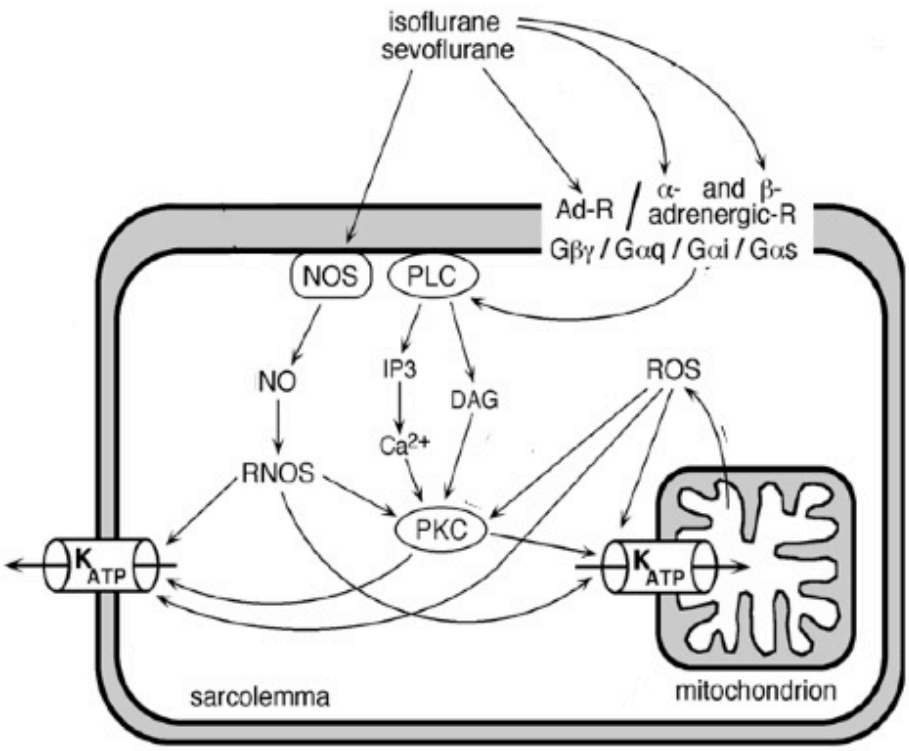

Figura 13: **Mecanismos moleculares en el precondicionamiento anestésico**: La activación de sustancias iniciadoras como la adenosina por los anestésicos inhalatorios como el sevoflorane e isoflorane activan diferentes vías de señalización intracelular que convergen en el aumento de producción de NO o en la activación de la PKC que activa los canales de K_{ATP}, ambos mecanismos implicados en el precondicionamiento anestésico. Ad-R: adenosine receptor; Gαs, Gαi, Gαq, Gβγ : classes of G-protein; α and β adrenergic-R: adrenergic receptors; NOS: nitric oxide synthase; NO: nitric oxide; PLC: phospholipase-C; IP3: inositoltrisphosphate; DAG: diacylglycerol; PKC: protein kinase-C; ROS:reactive oxide species; RNOS: reactive nitrogen oxide species. (modificado *de Zaugg M, J Muscle Res Cell Motil. 2003;24(2-3):219-49*).

2.3.4.2 Precondicionamiento anestésico con anestésicos halogenados y cirugía hepática

A diferencia del APC a nivel cardíaco, las referencias del APC con anestésicos halogenados en estudios experimentales en cirugía hepática demostrando diferentes grados de protección frente a la IR son muy limitadas, siendo el sevoflorane y el isoflorane los anestésicos inhalatorios implicados[169-173].

En la práctica clínica, las referencias de APC con anestésicos halogenados son escasas. Algunos trabajos comparan la administración de sevoflorane durante todo el procedimiento con otros anestésicos en cirugía hepática[174,175] con resultados contradictorios. Únicamente el estudio clínico randomizado de Beck-Schimmer y cols[176] realizado en hepatectomías, en el que se administraba un pretratamiento con

sevoflorane previo a la oclusión vascular continua para la resección hepática, demuestra el efecto protector del mismo reduciendo significativamente las enzimas hepáticas, las complicaciones postoperatorias y la estancia hospitalaria.

En resumen, los mecanismos moleculares implicados en el IPC y APC con anestésicos halogenados son similares. Existe una amplia evidencia de la existencia de ambos tipos de precondicionamiento tanto a nivel experimental como clínico en cirugía cardíaca. En el contexto de la cirugía hepática, el IPC ha demostrado su efecto de protección frente a la IR y los estudios experimentales y clínicos realizados hasta ahora en el APC con anestésicos inhalatorios, especialmente con sevoflorane son esperanzadores aunque no concluyentes.

2.4 JUSTIFICACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS

La resección quirúrgica es el único tratamiento potencialmente curativo de los enfermos con tumores hepáticos[17,18,21], siendo la etiología principal los tumores metastásicos de origen colorrectal[5]. El cáncer colorrectal es el tercero más frecuente en todo el mundo y un 50 % de los pacientes desarrollarán metástasis hepáticas a lo largo de la evolución de la enfermedad[19,20]. Por ello, una parte importante de la población va a precisar cirugía de resección hepática, cirugía considerada de alto riesgo[45,46]. Cualquier medida que mejore la función del remanente hepático disminuirá la morbimortalidad postoperatoria y la supervivencia a largo plazo de un gran número de pacientes.

La resección hepática se realiza, generalmente, con la oclusión del pedículo vascular o maniobra de Pringle[32] para evitar el sangrado masivo, una de las complicaciones más frecuentes y que implican mayor mortalidad[29-31]. La lesión por isquemia reperfusión (IR) es inherente a las maniobras de clampaje-desclampaje del hilio hepático, siendo la consecuencia principal de la misma la disfunción hepática postoperatoria que puede condicionar un aumento de la morbimortalidad de los pacientes[59,66,67]. En situaciones en que los pacientes precisan resecciones mayores ampliadas para obtener un resultado oncológicamente curativo o en aquellos que han recibido tratamiento con quimioterapia adyuvante, las consecuencias de la lesión por IR tienen un gran impacto en la función hepática en el postoperatorio inmediato[,49,54].

El precondicionamiento isquémico ha sido utilizado para modular la lesión por IR en cirugía hepática realizada con clampaje continuo con resultados beneficiosos[129,136,152,153]. Existen evidencias científicas de que en cirugía cardíaca el efecto protector de la lesión por IR en la función del miocardio con anestésicos halogenados (precondicionamiento anestésico) es semejante al que se obtiene con el

precondicionamiento isquémico[166-168]. Aunque los mecanismos moleculares precisos no son del todo bien conocidos, se han implicado predominantemente a la adenosina y óxido nítrico en la génesis de ambos tipos de precondicionamiento[123,162].

A pesar de los beneficios del precondicionamiento anestésico, comparables con los del precondicionamiento isquémico en cirugía cardíaca, en la cirugía de resección hepática el precondicionamiento anestésico sólo ha recibido una atención anecdótica en la literatura[176].

La utilización del clampaje intermitente del hilio hepático durante la cirugía de resección hepática condiciona una menor lesión por IR que la realizada con clampaje continuo[34]. La combinación de la resección hepática efectuada con oclusión vascular intermitente con otras estrategias que disminuyen la lesión por IR, precondicionamiento isquémico o anestésico con halogenados, podría disminuir la incidencia de complicaciones en este tipo de cirugía, lo que mejoraría el pronóstico de los pacientes.

3. HIPÓTESIS

El precondicionamiento inducido por isquemia transitoria y el producido farmacológicamente con el anestésico halogenado sevoflorane provocan una disminución de la lesión celular debida a isquemia-reperfusión durante la cirugía de resección hepática realizada con oclusión vascular intermitente del hilio hepático. La disminución del daño hepático se asociará a una menor incidencia de complicaciones postoperatorias disminuyendo la morbimortalidad de los pacientes.

4. OBJETIVOS

General

Determinar la influencia sobre la función hepática, lesión histológica y evolución clínica del precondicionamiento isquémico y del precondicionamiento anestésico con sevoflorane, durante la cirugía de resección de las tumoraciones hepáticas realizada con clampaje vascular intermitente.

Específicos

1. Determinar el impacto del precondicionamiento en la función hepática monitorizada mediante parámetros bioquímicos de transaminasas, bilirrubina e INR , tras la resección hepática con maniobra de Pringle intermitente.

2. Evaluar la implicación del precondicionamiento en los cambios de la circulación sinusoidal mediante la función excretora de las células del endotelio sinusoidal con la determinación del acido hialurónico.

3. Evaluar la influencia del precondicionamiento en la lesión histológica postresección: esteatosis, infiltración leucocitaria, congestión sinusoidal, necrosis y activación de caspasas.

4. Analizar la expresión tisular del oxido nítrico en los dos tipos de precondicionamiento.

5. Analizar la evolución e incidencia de complicaciones postoperatorias de las resecciones hepáticas efectuadas con maniobra de Pringle intermitente con y sin precondicionamiento.

6. Evaluar la supervivencia actuarial al año en los pacientes con y sin precondicionamiento tras la resección hepática con oclusión vascular intermitente.

7. Valorar la influencia de ambos tipos de precondicionamiento según el tamaño de la resección hepática realizada.

5. PACIENTES Y MÉTODOS

Este estudio prospectivo y aleatorizado se realizó de enero del 2004 a febrero 2011. El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitari Mútua de Terrassa y el consentimiento informado fue obtenido por escrito de cada paciente.

5.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Se incluyeron de manera consecutiva 121 pacientes con el diagnóstico de tumoración hepática e indicación de resección como tratamiento electivo.

Se consideraron criterios de exclusión: edad inferior a 18 años, diagnóstico de cirrosis hepática, alteración bioquímica de la función hepática, enfermedad pulmonar, cardíaca o renal severa y estado físico preoperatorio ASA IV (American Society of Anesthesiologists).

5.2 PROTOCOLO DE ESTUDIO

En todos los pacientes se aplicó el mismo protocolo de actuación: evaluación preoperatoria; técnica anestésica; técnica quirúrgica y cuidados postoperatorios. El procedimiento anestésico-quirúrgico fue realizado en todos los casos por el mismo equipo de anestesiólogos y cirujanos.

5.2.1 TÉCNICA ANESTÉSICA

El protocolo anestésico fue rigurosamente aplicado a todos los pacientes del estudio. En el área quirúrgica los pacientes se premedicaron con midazolan endovenoso y tras la monitorización básica (electrocardiografía, presión arterial incruenta y pulsioximetría) se procedió a la colocación de catéter epidural a nivel torácico (T9-T11) para control analgésico postoperatorio. La inducción anestésica se efectuó con Propofol (2-3 mg/kg) y fentanilo (2 µg/kg) y la relajación muscular con besilato de atracurium (0.5 mg/kg). El mantenimiento anestésico se realizó con perfusión continua iv de propofol TCI (target-controlled infusion) según monitorización del nivel de consciencia mediante análisis biespectral (B.I.S.), manteniendo valores entre 40-60, remifentanilo (0.1-0.3 µg/kg /min) y bolus suplementarios de fentanilo. El bloqueo neuromuscular se mantuvo con perfusión iv de besilato de atracurium (0.3 µg/kg/min). Las características de la ventilación mecánica (Datex-Ohmeda S/5) se adaptaron para mantener una PaCO2 entre 35-38 mmHg y una PaO2 entre 180-220 mmHg. La monitorización incluyó electrocardiografía continua (DII y V5), análisis continuo del segmento ST, analizador de gases inspirados y espirados, pulsioximetría y ETCO2 (Datex-Ohmeda S/5). Se colocó un catéter de doble luz en la vena yugular interna derecha para control de la presión venosa central (PVC), y un catéter arterial

radial, para la monitorización continua de la presión arterial. El índice cardíaco se obtuvo de forma no invasiva mediante doppler esofágico (CardioQ. Deltex Medical) (Figura 14).

El objetivo terapéutico durante la cirugía estuvo dirigido a mantener una presión arterial media (PAM) ≥65 mm Hg, índice cardíaco ≥2,4 l/min/m^2, y una PVC ≤5mmHg. La reposición de la volemia se realizó con el criterio de restricción hídrica. A todos los pacientes se les administró una perfusión iv de dopamina 2-2,5 µg/kg/min. Si la PAM era inferior a 60 mmHg y las dosis requeridas de dopamina eran superiores a 8 µg/kg/min, se iniciaba una perfusión iv de noradrenalina (0,04-0,08 µg/kg/ min). El punto de corte transfusional fue de hemoglobina ≤ 8,5 g/dl. A los pacientes con resección mayor o con una ratio normalizada internacional (INR) >1,5, se les administraron dos unidades de plasma fresco congelado, una vez finalizada la resección. Al inicio del cierre de la laparotomía, se retiró la perfusión de remifentanilo y se administró por vía epidural bupivacaína al 0,25% 6-8 ml y 6 mgr de metadona, analgesia que se continuó en el postoperatorio. Todos los pacientes se extubaron en quirófano y fueron trasladados a la unidad de reanimación postquirúrgica donde permanecieron las primeras cinco o seis horas para ser posteriormente transferidos a la unidad de semicríticos.

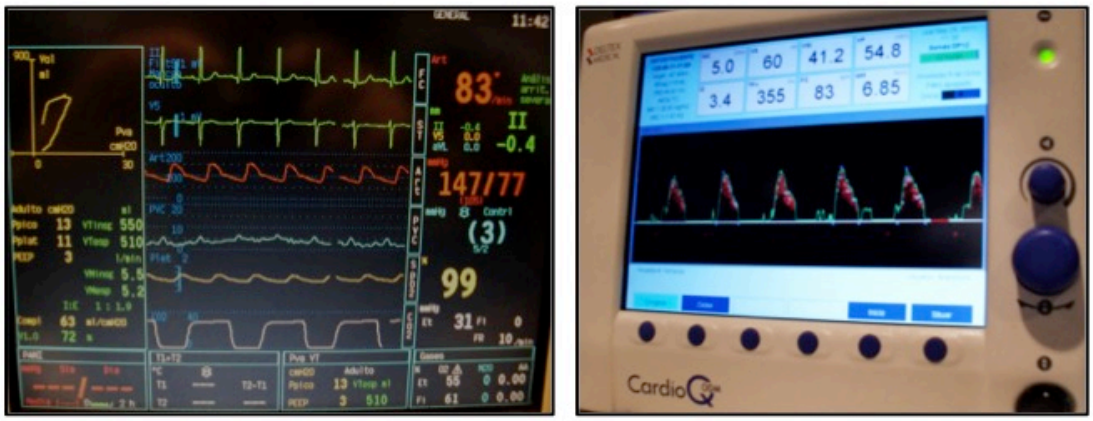

Figura 14: Monitor Datex-Omheda S/5 y Monitor CardioQ : monitorización hemodinámica incluyendo PVC, PA e IC en un paciente del estudio.

5.2.2 TÉCNICA QUIRÚRGICA

Las lesiones hepáticas se localizaron preoperatoriamente por tomografía computerizada, resonancia magnética y/o tomografía por emisión de positrones. La cirugía se llevó a cabo mediante laparotomía subcostal bilateral o laparotomía en "J" cuando la resección afectó a los segmentos posteriores derechos del hígado. Tras la movilización hepática, se efectuó una ecografía intraoperatoria sistemática para identificar con exactitud todas las metástasis hepáticas presentes, sus relaciones con

los elementos vasculares y decidir el tipo de resección a practicar (terminología de Brisbane)[27,28]. Se consideró hepatectomía mayor si el número de segmentos resecados era igual o superior a tres y hepatectomía menor si era inferior.

La resección hepática se realizó mediante transección parenquimatosa con aspirador ultrasónico (Cavitron^{R}) y un coagulador por radiofrecuencia (Tissuelink^{R}) (Figura 15). En todos los pacientes la resección se efectuó con la maniobra de Pringle intermitente (15 minutos de oclusión del pedículo hepático y 5 minutos sin clampaje) (Figura 16), para evitar la pérdida sanguínea durante la transección hepática. El margen de resección se controló intraoperatoriamente mediante ecografía y se comprobó al finalizar la intervención. Sistemáticamente se utilizaron los drenajes de "silastic" seguido del cierre de la laparotomía. Se realizó una biopsia hepática al inicio y una hora posterior a la resección hepática, para la obtención de muestras necesarias para el estudio.

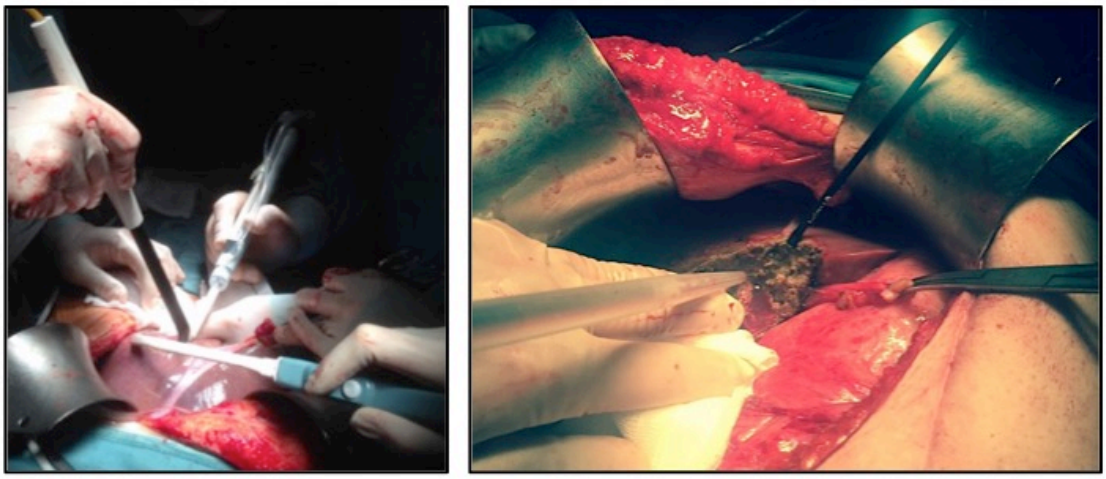

Figura 15: **Transección hepática:** aspirador ultrasónico y coagulador por radiofrecuencia.

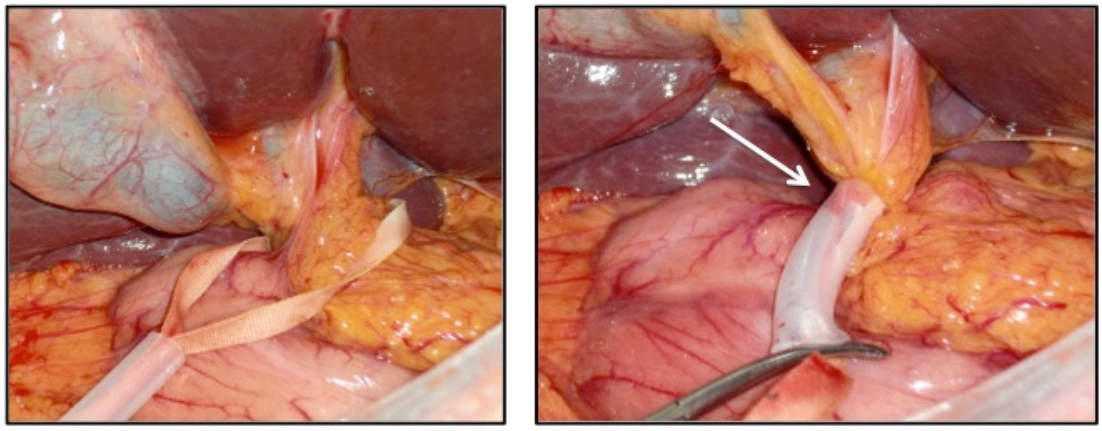

Figura 16: Clampaje del hilio hepático (maniobra de Pringle)

5.3 ALEATORIZACIÓN Y GRUPOS DE ESTUDIO

Tras la inducción anestésica**,** los pacientes se aleatorizaron en tres grupos (figura 17):

a **Grupo de precondicionamiento isquémico (IPC):** En este grupo de pacientes se realizó clampaje del hilio hepático durante 10 minutos seguido de 10 minutos de reperfusión previo al clampaje vascular intermitente para realizar la resección.

b. **Grupo de precondicionamiento anestésico (APC):** En este grupo del estudio, previo al clampaje vascular intermitente, se interrumpió la administración de la perfusión de propofol y se administró durante 20 minutos sevoflorane a una concentración alveolar mínima (CAM) de 1,5, siguiendo posteriormente la intervención con propofol.

c. **Grupo de clampaje vascular intermitente (INT):** En este grupo, durante los 20 minutos previos al clampaje intermitente para realizar la resección, no se realizó ningún tipo de precondicionamiento isquémico ni anestésico. Por tanto pueden considerarse a estos pacientes como un grupo control.

La secuencia de aleatorización se generó por ordenador y los pacientes fueron distribuidos en una tabla simple de números aleatorios. También se estratificó la cohorte de estudio según la extensión de la resección, hepatectomía mayor o menor, para valorar si la extensión de la cirugía podía influir en el análisis de los resultados del precondicionamiento. Los protocolos de precondicionamiento del estudio se basaron en publicaciones previas[152,177].

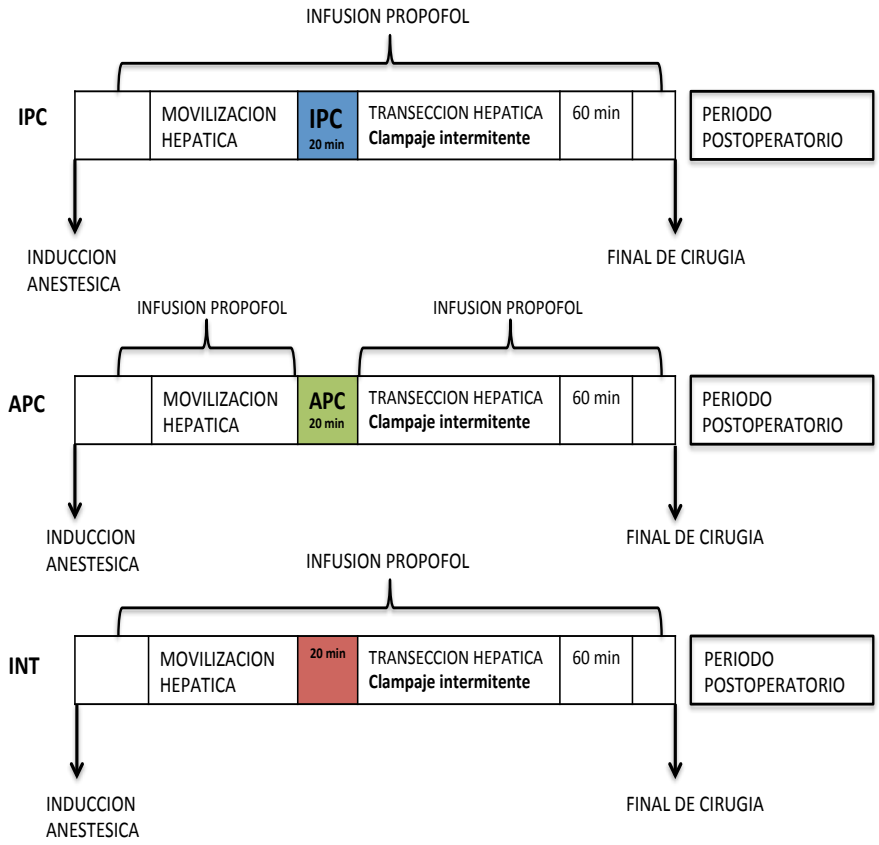

Figura 17: Protocolo de estudio. IPC: precondicionamiento isquémico; APC: precondicionamiento anestésico; INT: clampaje intermitente.

5.4 DETERMINACIONES, METODOLOGÍA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

5.4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS

Se analizaron: a) **características demográficas**: sexo, edad, índice de masa corporal (IMC); b) **características clínicas**: estado físico según la escala de la American Society of Anesthesiologists (ASA), condiciones médicas de comorbilidad categorizadas con el índice de severidad de Charlson[178] (enfermedad pulmonar, cardiopatía, diabetes mellitus); c) **datos bioquímicos basales**: hemoglobina, plaquetas, creatinina, aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), bilirrubina, tiempo de protrombina expresado según la ratio internacional normalizada (INR) y ácido hialurónico (HA). Además se registraron otros factores que

influyen en la enfermedad hepática: quimioterapia adyuvante, presencia de esteatosis y etiología tumoral.

5.4.2. DATOS INTRAOPERATORIOS

Las variables quirúrgicas analizadas en este período fueron: el tipo de resección y la duración de la misma; el número de clampajes de la tríada portal; el tiempo de isquemia total y la pérdida hemática estimada, calculada como la suma de la cantidad de sangre presente en los aspiradores externos y el diferencial del peso de las gasas.

Las variables hemodinámicas evaluadas fueron: frecuencia cardíaca (**FC**, latidos por minuto), **PAM** (mm Hg), **PVC** (mm Hg), **IC** (litros/minuto/m^2) y el índice de resistencia vascular sistémica (**IRVS**, dinas.seg.m^2.cm^5). Todas ellas fueron registradas en unos tiempos concretos del procedimiento anestésico-quirúrgico: a) **T1**: tiempo basal: después de la inducción anestésica; b) **T2**: después de los 20 minutos del precondicionamiento; c) **Px**: durante la transección hepática, a los 10 minutos de cada maniobra de Pringle y **Ux** : al minuto posterior a cada desclampaje del hilio hepático y d) **T3**: a los 60 minutos de finalizada la resección hepática.

Se registraron los siguientes datos clínicos: transfusión de derivados sanguíneos, necesidad de soporte vasoactivo con administración de noradrenalina y complicaciones intraoperatorias médicas y quirúrgicas tal como se detallan a continuación:

1. Hipotensión: Definida como disminución de la PAM un 20% de la basal o inferior a 65 mm Hg.

2. Hipertensión: Definida como un aumento de la tensión arterial por encima del 20% de la basal.

3. Taquicardia: Definida como aumento de la frecuencia cardíaca por encima de 100 latidos por minuto.

4. Bradicardia: Definida como disminución de la frecuencia cardíaca por debajo de 40 latidos por minuto.

5. Otras arritmias: arritmias supra y ventriculares.

6. Disminución del gasto cardíaco: Definida como IC <2,4 litros/minuto/m^2

9.Embolia aérea: Definida por una disminución brusca de la ETCO2, hipotensión y desaturación por pulsioximetría.

10.Hemorragia intraoperatoria: Se consideró como complicación cuando fue superior a una pérdida total de 15ml/kg

11. Fallecimiento

5.4.3 DETERMINACIONES ANALÍTICAS Y BIOPSIAS

Las muestras sanguíneas para la determinación de los datos bioquímicos y las biopsias de tejido hepático para la valoración de la lesión histológica, actividad de caspasa 3 y determinación de la expresión tisular de NO, se obtuvieron en los siguientes momentos específicos del intra y postoperatorio:

a.Después de la **inducción** anestésica, muestra sanguínea basal: marcadores de función hepática y HA.

b.Durante la **movilización** hepática previo al período de precondicionamiento (biopsia hepática basal) (Figura 18)

c.A los 60 minutos del **final** de la resección hepática (muestra sanguínea: marcadores de función hepática , HA y biopsia hepática)

e.A las seis y 24 horas del final de la resección hepática y **diariamente** durante la primera **semana** posterior a la intervención (muestra sanguínea: marcadores de función hepática).

Las biopsias hepáticas para la determinación de la expresión tisular de NO se congelaron inmediatamente a -170ºC en nitrógeno líquido. (Figura 19)

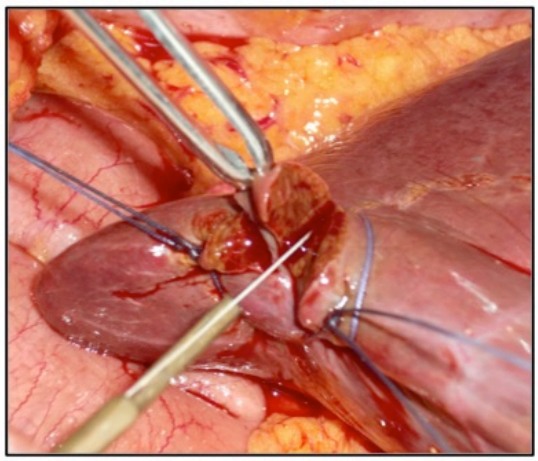

Figura 18: Biopsia hepática: Obtención de muestra para biopsia hepática.

Figura 19: Preservación de la biopsia hepática: inmersión en nitrógeno líquido.

5.4.3.1 Marcadores de función hepática.

Las **AST** y **ALT** como indicadoras de lesión hepatocelular, **bilirrubina** total como marcador de la función de extracción hepática y el **INR** como marcador de síntesis hepática fueron medidos en los analizadores Hitachi 7 179 A y STA Neoplastin Plus en el laboratorio del Hospital Universitari Mútua de Terrassa.

5.4.3.2 Ácido hialurónico sérico (HA).

Para la valoración de la lesión de las células sinusoidales endoteliales se determinó el ácido **hialurónico** en sangre de la vena cava superior, para ello se obtuvieron 5ml de sangre que se centrifugaron a 8000 rpm durante 15 minutos y la alícuota del plasma sobrenadante se colocó en un tubo de 3ml inespecífico congelándose a -80ºC hasta su procesamiento. Los niveles séricos de HA fueron obtenidos utilizando un Kit comercial de radioinmunoensayo (RIA). Los resultados se expresaron en µg/L. Este análisis se realizó en el Hospital Clínic de Barcelona.

5.4.3.3 Lesión histológica.

Las muestras de tejido se fijaron inmediatamente tras su extracción en una solución al 4% de formaldehído. Posteriormente fueron incluidas en bloques de parafina, seccionadas y teñidas con la tinción de hematoxilina-eosina (H-E) para su estudio histológico. La severidad de la **esteatosis** micro y macrovesicular se valoró de forma cuantitativa (ninguna: ≤10%; leve: >10% a ≤20%; moderada: >20% a ≤30%; severa: >30%). El grado de **congestión sinusoidal** y dilatación fue clasificado en grado 1 (mínima dilatación centrolobular), grado 2 (dilatación ocupando 2/3 del lóbulo) y grado 3 (dilatación de todo lóbulo). Finalmente, la **infiltración leucocitaria**, lesión histológica clave en la lesión hepática por IR, y la **necrosis** fueron evaluadas y clasificadas cualitativamente en leve, moderada y severa. Cada biopsia fue evaluada por el mismo patólogo, desconociendo el grupo al que pertenecía la muestras.

5.4.3.4 Determinación enzimática de Caspasa 3.

La actividad enzimática de la **Caspasa 3** se determinó mediante una reacción inmunohistoquímica utilizando una técnica peroxidasa-antiperoxidasa. Los bloques de parafina fueron cortados en unas secciones de 4-µm, colocados en laminillas e incubados con el anticuerpo primario, conejo policlonal, clon caspasa 3 N/A (prediluido, Biocare Medical). Las reacciones se compararon siempre con un control positivo (amígdala humana). Para evaluar la expresión proteica, se seleccionaron las células coloreadas de cada laminilla. El porcentaje de células positivas (positividad nuclear) se calculó en tres campos microscópicos a 405 nm, con un total de 300 células contadas (positivas y negativas). Para la evaluación cuantitativa del estado

apoptoico, el número de células apoptoicas presentes en cada sección se expresó como fracción del total de hepatocitos, esto se conoce como índice apoptoico[179,180], el cuál se calculó para cada biopsia.

5.4.3.5 Forma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa

Las muestras de tejido fueron inmediatamente congeladas a -170ºC en nitrógeno líquido para evitar su rápida degradación. Se determinó la expresión tisular de la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa **(iNOS)** en los hepatocitos mediante aislamiento de RNA y determinación cuantitativa de PCR (polymerase chain reaction). El total del RNA fue aislado del tejido hepático utilizando Trizol como reactivo (Invitrogen) según las indicaciones del protocolo del producto. La concentración de RNA fue determinada utilizando un espectrofotómetro de 1000 nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Para la cuantificación de RNAm, fue sintetizado DNAc utilizandose un Kit específico (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Life Technologies) de acuerdo con los protocolos de actuación del Kit. La determinación cuantitativa de PCR fue realizada de forma duplicada utilizando sondas TaqMan para iNOS humana (Applied Biosystems) en un lightCycler 480 System (Roche). Los niveles de mRNA fueron normalizados a la expresión 18s, que fue utilizado como gen control. Los resultados fueron expresados como incremento de cambio respecto al basal. Estas determinaciones se realizaron en el Centro Esther Koplowitz de Barcelona.

5.4.4 EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA

Las complicaciones postoperatorias se clasificaron según la clasificación Dindo-Clavien[181]. Consideramos complicaciones menores los grados I y II y complicaciones mayores los grados III, IV y V de dicha clasificación. El grado de PHLF fue definido según las guías del ISGL[51] (tabla 1).

Las variables postoperatorias analizadas incluyeron morbilidad, definida como una complicación que prolonga la estancia hospitalaria o afecta la evolución postoperatoria, mortalidad (muerte durante la estancia hospitalaria o durante los 30 días posteriores a la intervención), ingreso en la unidad de cuidados intensivos, estancia hospitalaria y supervivencia actuarial anual.

Se registraron específicamente las siguientes complicaciones en los primeros 7 días del postoperatorio:

1.Complicaciones quirúrgicas:

a. Reintervención y motivo de la misma

b. Infección quirúrgica: pared abdominal, absceso subfrénico

c. Fístula biliar: definida como concentración de bilirrubina en el líquido del drenaje superior a tres veces la sérica.

3. Hiperbilirrubinemia: Definida como niveles de bilirrubina >3mgr/dL

3. Ascitis: diagnosticada clínicamente.

4. Encefalopatía en sus diferentes grados de 1 a 4

5. PHLF moderada o severa : PHLF B o C

6. Disfunción renal: aumento del 50% de los valores basales de creatinina

7. Anemia: Definida como valores de hemoglobina<8 mg/dL

8. Fallecimiento

5.5 RECOGIDA DE DATOS

Los pacientes tributarios de resección hepática que no cumplían ninguno de los criterios de exclusión y que aceptaron participar en el estudio fueron aleatorizados y se les asignó a uno de los grupos de estudio previo a la inducción anestésica. Los parámetros clínicos y de laboratorio se recogieron en la historia clínica y se incluyeron en una base de datos diseñada para tal efecto mediante el programa MS-ACCESS. La determinación sanguínea de ácido hialurónico y de iNOS en tejido hepático se llevaron a cabo cuando se hubo incluido el último paciente, mientras tanto permanecieron congeladas a -80ºC.

5.6 TAMAÑO MUESTRAL

El ***cálculo de la muestra*** se llevó a cabo teniendo en cuenta los valores de AST como marcador principal de daño hepático celular. Según lo referenciado en la bibliografía[129,152,182] la diferencia porcentual de los pacientes en los que se aplica un IPC y en los que se realiza el tiempo de isquemia directamente es de un 30% menor a favor del grupo en el que se aplica el precondicionamiento. Así en nuestro estudio sería significativo obtener un índice de lesión tisular (mediante la medición de las AST) del 30% o menor en los grupos de precondicionamiento isquémico y/o anestésico respecto al obtenido en el grupo control con un error tipo I (alfa) del 0,05 y una potencia del 80%. El resultado de la **N** calculada con estos parámetros es de 105 pacientes, 35 por cada grupo.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cualitativas se expresaron como frecuencia absoluta y relativa (porcentajes). Las variables cuantitativas se expresaron como medias (desviación estándar [SD]) si su distribución seguía la normal y, mediana (rango de interquartil [IQR]) cuando no. Para comparar medias entre grupos utilizamos la prueba de análisis de la Varianza (ANOVA) cuando las distribuciones seguían la normal, y la prueba de Kruskal-Wallis en caso contrario. La prueba de Chi cuadrado fue utilizada para comparar proporciones. La prueba del análisis de la varianza para medidas repetidas fue utilizado para analizar las variables hemodinámicas y bioquímicas a lo largo del tiempo del estudio. La representación gráfica de las variables hemodinámicas se expresaron en medias y su 95% de intervalo de confianza (IC) y la representación gráfica de los parámetros bioquímicos se expresaron en medianas y su 95% de IC. Para comparar los picos de aumento de las variables bioquímicas, se realizó un análisis de regresión lineal. Asimismo, se ajustó el modelo por edad, ALT, AST y bilirrubina basal, esteatosis, quimioterapia, tiempo de isquemia total y tipo de resección para excluir posibles diferencias entre los grupos de pacientes a pesar de la aleatorización. La correlación entre variables categóricas fue evaluada por la prueba V de Cramer (entre variables nominales) y Kendall tau-b (entre variables ordinales). La correlación entre variables cuantitativas fue valorada mediante la prueba de Rho Spearman en caso de distribuciones no normales o la R de Pearson para distribuciones normales. Se utilizó el paquete estadístico IBM-SPSS (versión 19.0, 2010). Valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

5.8 EFECTOS DE LA DURACIÓN DEL ESTUDIO

Como la duración del estudio fue durante casi 8 años, se estratificaron los pacientes incluidos en tres períodos (2004-2006, 2007-2009, 2010-2011) analizando si había diferencias estadísticamente significativas entre diferentes variables de los tres períodos, para verificar si la muestra seguía siendo homogénea. Se analizaron especialmente las variables preoperatorias que podían tener influencia en los resultados, como la edad, comorbilidad cardiovascular y diabetes mellitus, el tratamiento con quimioterapia y la presencia de esteatosis. En ninguna de las variables estudiadas se encontraron diferencias significativas (tabla 2)

Tabla 2 : Comparación de los datos preoperatorios en los diferentes años de estudio

	2004/06 (n=36)	2007/09 (n=15)	2010/11 (n=55)	*P*
Edad*	59 (22)	63 (21)	64 (15)	0,588
Comorbilidad cardiovascular**	14 (38,9)	3 (20)	28 (50,9)	0,087
Diabetes Mellitus**	5 (13,9)	4 (26,7)	7 (12,7)	0,397
Quimioterapia adyuvante**	24 (66,7)	9 (60)	41 (74)	0,487
Esteatosis preoperatoria**	10 (28,6)	3 (20)	14 (25,5)	0,815

*Datos expresados en medianas (IQR). **Datos expresados en números de casos (porcentaje)

Durante los años del estudio, se realizaron una serie de modificaciones en el mismo, debido al cambio en la disponibilidad para la obtención de los datos en unos parámetros específicos:

Monitorización del Gasto Cardíaco

La monitorización del GC fue de forma no invasiva en todos los pacientes del estudio, pero en la fase inicial estaba a nuestra disposición el método NICO (Monitor NICO Novametrix), que posteriormente fue sustituido por el método CardioQ (Deltex Medical). La eficacia de ambos es comparable con el Swanz-Ganz, como se ha publicado en diferentes estudios[183,184]. Un 27% de los pacientes estuvo monitorizado con NICO y un 73% con cardioQ.

Determinación de la expresión tisular de Adenosina

En el diseño del estudio, se definió la expresión tisular de adenosina como parámetro para evaluar la implicación de esta molécula en los dos tipos de precondicionamiento. Durante los primeros 15 pacientes del estudio, en el año 2004, pudo determinarse la adenosina en tejido hepático por el laboratorio del Hospital Clínic de Barcelona, donde tenían puesta a punto la técnica debido a otros estudios. Posteriormente, una vez incluidos todos los pacientes, en el 2011, esto no fue posible, ni en este laboratorio ni en otros laboratorios españoles, por lo que se decidió cambiar la determinación de la molécula implicada en el mecanismo de protección del precondicionamiento. Como se postula que el efecto protector de la adenosina se debe a la activación de los receptores A_2 y a la posterior liberación de óxido nítrico[69,141,142] y se considera a este último involucrado en el mecanismo molecular del precondicionamiento hepático; se decidió la determinación de NO en tejido hepático para valorar su implicación en el efecto protector de los dos tipos de precondicionamiento evaluados en nuestro estudio.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Se aleatorizaron 121 pacientes. En la figura 20 se representa el proceso de inclusión. Doce pacientes fueron excluidos debido a la presencia de enfermedad diseminada. Los 109 pacientes restantes fueron aleatorizados en los tres grupos de estudio. Posteriormente, tres pacientes ASA III y Charlson >6, uno en cada grupo de estudio, se excluyeron por necesitar durante los clampajes del hilio hepático altas dosis de noradrenalina, realizándose la resección hepática sin maniobra de Pringle. Finalmente 106 pacientes fueron incluidos en el análisis del estudio.

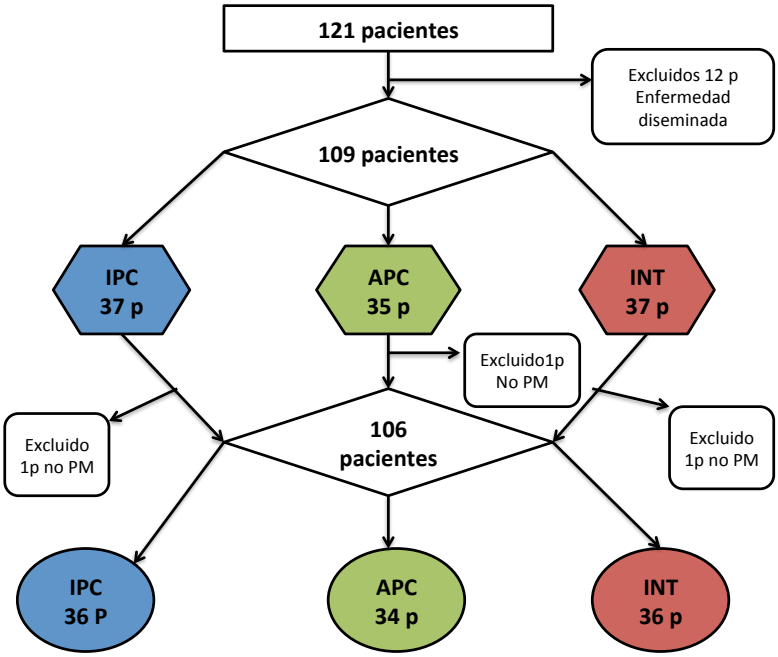

Figura 20: Algoritmo de inclusión. IPC: precondicionamiento isquémico; APC: precondicionamiento anestésico; INT: clampaje intermitente. PM: maniobra de Pringle.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las características demográficas y clínicas de los pacientes entre los distintos grupos del estudio (tabla 3). El 80% de los pacientes se encontraban en una franja de edad comprendida entre los 60-70 años. No había predomino de sexo. La comorbilidad más frecuente era la cardiovascular. A pesar de que un 70% de los pacientes habían recibido quimioterapia adyuvante, la incidencia de esteatosis basal fue del 25% y de carácter leve. Las cifras basales de ácido hialurónico (HA) se encontraban también dentro de la normalidad. La indicación más frecuente fue la cirugía de metástasis hepáticas por cáncer de colorrectal (80%).

Tabla 3. Características demográficas, clínicas y bioquímicas de los pacientes

	IPC (n = 36)	APC (n = 34)	INT (n = 36)	*P*
Edad, a	59,5 (21)	65 (12)	62 (20)	0,072
Sexo masculino, (n [%]).	15 (41,7)	23 (67,6)	20 (58,8)	0,092
IMC	25,9 (6,1)	27 (4,8)	25,8 (6,3)	0,547
ASA I/II/III, nº	1/31/4	0/28/6	2/29/5	0,643
Índice Charlson	6 (0)	7 (1)	6 (1)	0,107
Comorbilidad, (n [%]).				
Cardiovascular	14 (38,8)	20(58,8)	14 (38,8)	0,062
Enfermedad Pulmonar	5 (13,8)	9 (26,4)	10 (27,7)	0,301
Diabetes mellitus	3 (8,3)	9 (26,4)	4 (11,1)	0,076
ALT, U/L	21 (16,5)	19,8 (15)	18,8 (11,7)	0,133
AST, U/L	24,1 (16,5)	21,6 (15)	19,9 (9)	0,083
Bilirrubina, mg/dL	0,44 (0,38)	0,5 (0,33)	0,5 (0,21)	0,924
INR	1 (0,07)	0,99 (0,08)	0,99 (0,08)	0,771
Hemoglobina, mg/dL	13,7 (3,03)	13,5 (1,88)	12,9 (2,57)	0,465
Plaquetas, $x\ 10^3$	213 (118)	224 (95)	198 (92)	0,644
Creatinina, mg/dL	0,8 (0,31)	0,9 (0,35)	0,89 (0,40)	0,450
Quimioterapia adyuvante,(n [%]).	28 (77,8)	25 (73,5)	21 (58,3)	0,169
Esteatosis leve-mod. (n [%]).	8 (22,22)	10 (29,4)	9 (25)	0,789
Ácido hialurónico (µgr/L)	42,5 (39,5)	45,8 (49,6)	36,7 (33,8)	0,671
Etiología tumoral (n [%]).				0,438
Metástasis ca. colorrectal	27 (75)	30 (88,3)	28 (77,7)	0,345
Tumor hepático primario				
Adenoma	0	0	2 (5,6)	0,138
Hepatocarcinoma	1 (2,8)	1 (2,9)	1 (2,8)	0,998
Colangiocarcinoma	1 (2,8)	1 (2,9)	2 (5,6)	0,787
Otras metástasis	7 (19,4)	2 (5,9)	3 (8,3)	0,158

IPC: precondicionamiento isquémico; APC: precondicionamiento anestésico; INT: clampaje intermitente; IMC: índice de masa corporal; ALT: alanino aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; INR: ratio normalizada internacional. Datos presentados como mediana (interquartil, IQR) o número y porcentaje.

6.2 DATOS INTRAOPERATORIOS

El tipo de resección hepática realizada, número de clampajes y tiempo de isquemia total, tiempo quirúrgico, hemorragia intraoperatoria y requerimientos transfusionales fueron similares en los tres grupos como se muestra en la tabla 4. La indicación de resección mayor fue aproximadamente de un 50 % en todos los grupos. Se realizó una media de tres clampajes del hilio hepático para finalizar la resección. La pérdida sanguínea media estimada fue de aproximadamente unos 500 ml y un 14% de los pacientes precisaron transfusión de concentrados de hematíes.

Tabla 4. Datos intraoperatorios : variables quirúrgicas y requerimiento transfusional

	IPC (n = 36)	APC (n = 34)	INT (n = 36)	*P*
Resección mayor/menor, nº	21/15	18/16	19/17	0,866
Hemorragia. ml	500 (100)	500 (100)	450 (200)	0,593
Pacientes transfundidos, nº	6	4	5	0,559
Tiempo isquemia total, min	50 (22,8)	46.3 (26,6)	52.6 (29,3)	0,144
Número de clampajes	3 (1)	3 (1)	3 (1)	0,265
Tiempo quirúrgico, min	300 (45)	300 (64)	300 (60)	0,291

Datos presentados como mediana (IQR) o número de casos.

6.3.1 HEMODINAMIA Y COMPLICACIONES INTRAOPERATORIAS

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros hemodinámicos basales entre los diferentes grupos de estudio (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros hemodinámicos basales

	IPC (n = 36)	APC (n = 34)	INT (n = 36)	*P*
PAM (mm Hg)	91,54 (11,7)	99,1 (12,2)	94,19 (11,7)	0,050
FC (latidos por minuto)	72,03 (13,01)	72,47 (16,9)	71,67 (13,1)	0,973
PVC (mm Hg)	4,47 (1,5)	4,97 (2,2)	5,25 (2,2)	0,255
IC (Litros/minuto/m^2)	3,16 (0,94)	2,73 (0,55)	2,88 (0,62)	0,157
IRVS (dinas.seg.m^2.cm^5)	2366,2 (145,1)	2856,7 (100,9)	2549,1 (111,06)	0,130

PAM: Presión arterial media; FC: frecuencia cardíaca; PVC: presión venosa central; IC: índice cardíaco; IRVS: índice resistencia vascular sistémica. Datos expresados en media y su desviación estándar.

6.3.1.1 Presión arterial media.

La presión arterial media experimentó un aumento no significativo en todos los pacientes durante las diferentes maniobras de Pringle y un descenso durante sus desclampajes, pero sin diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos del estudio (p=0,794) (figura 21)

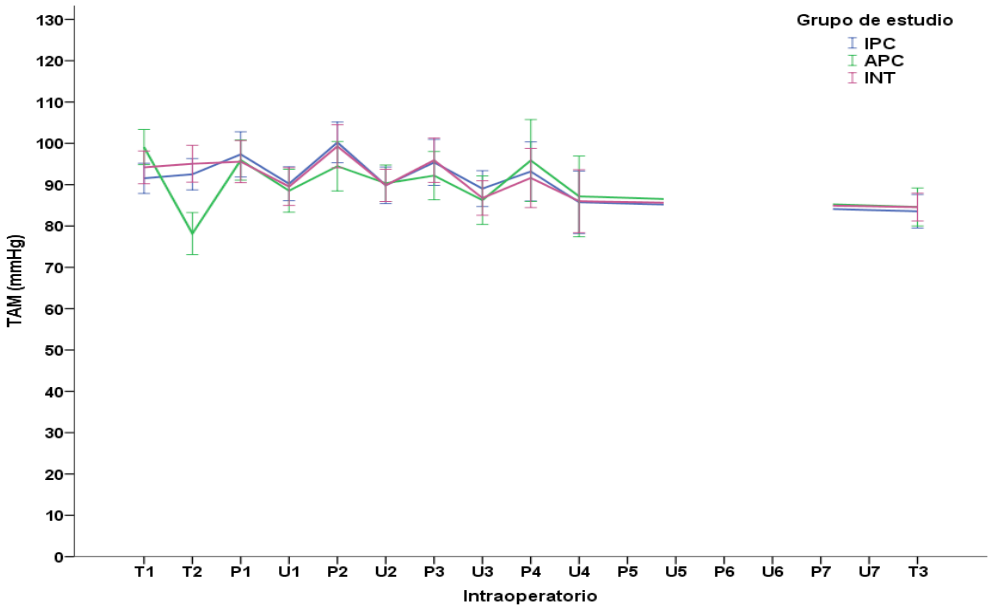

Figura 21: Representación gráfica de la evolución de la presión arterial media en los tres grupos de estudio. PAM (presión arterial media); T1 (tiempo basal); T2 (postprecondicionamiento); Px (a los 10 minutos de cada clampaje);Ux (al minuto de cada desclampaje) y T3 (1 hora postresección). Los valores expresan la media y su intervalo de confianza del 95 %.* Los valores de los tiempos de Pringle P5, P6 y P7 no se desarrollan por falta de efectivos en los grupos de estudio

6.3.1.2 Frecuencia cardíaca.

Todos los pacientes presentaron un ligero aumento de la frecuencia cardíaca sin significancia durante las diferentes fases de la transección. Aunque no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (p=0,194), el grupo de clampaje intermitente (INT) tenían unos valores más elevados (figura 22)

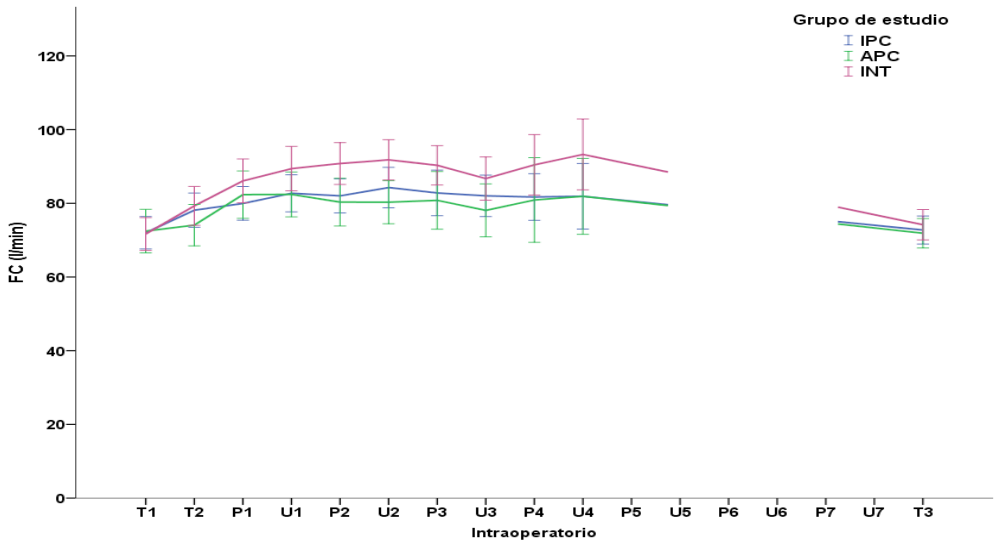

Figura 22: Representación gráfica de la evolución de la frecuencia cardíaca en los tres grupos de estudio. FC (frecuencia cardiaca); T1 (tiempo basal); T2 (postprecondicionamiento); Px (a los 10 minutos de cada clampaje);Ux (al minuto de cada desclampaje) y T3 (1 hora postresección). Los valores expresan la media y su intervalo de confianza del 95 %. * Los valores de los tiempos de Pringle P5, P6 y P7 no se desarrollan por falta de efectivos en los grupos de estudio

6.3.1.3 Presión venosa central.

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio (p=0,421), permaneciendo en todos los casos durante la transección, en valores inferiores a 6 mmHg y con valores más elevados durante la fase posterior (figura 23)

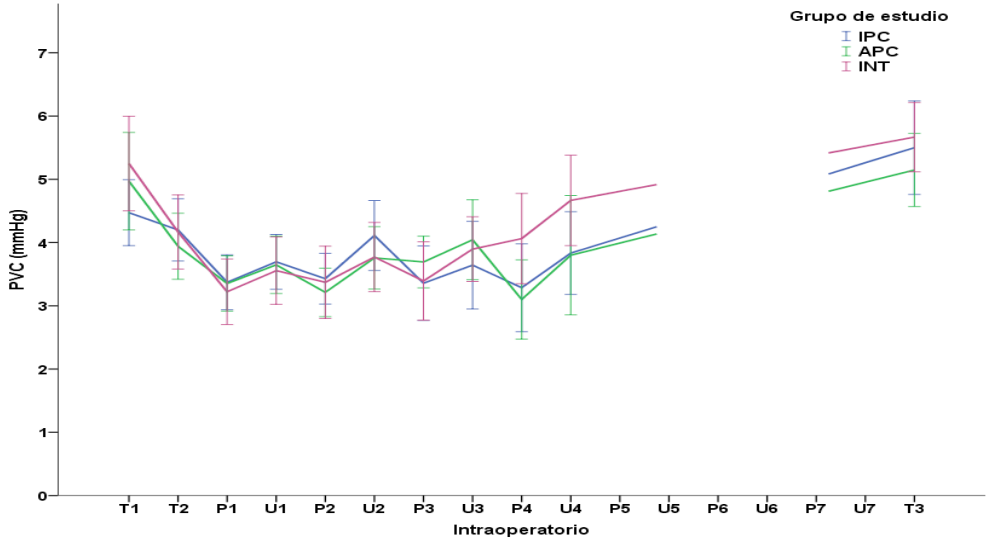

Figura 23: Representación gráfica de la evolución de la presión venosa central en los tres grupos de estudio. PVC (presión venosa central); T1 (tiempo basal); T2 (postprecondicionamiento); Px (a los 10 minutos de cada clampaje);Ux (al minuto de cada desclampaje) y T3 (1 hora postresección). Los valores expresan la media y su intervalo de confianza del 95 %. * Los valores de los tiempos de Pringle P5, P6 y P7 no se desarrollan por falta de efectivos en los grupos de estudio.

6.3.1.4 Índice cardíaco.

De forma similar en los tres grupos (p=0,706), durante la transección hepática, con cada clampaje del hilio hepático, todos los pacientes presentaban una disminución estadísticamente no significativa del IC y un aumento no significativo del mismo durante los desclampajes (figura 24)

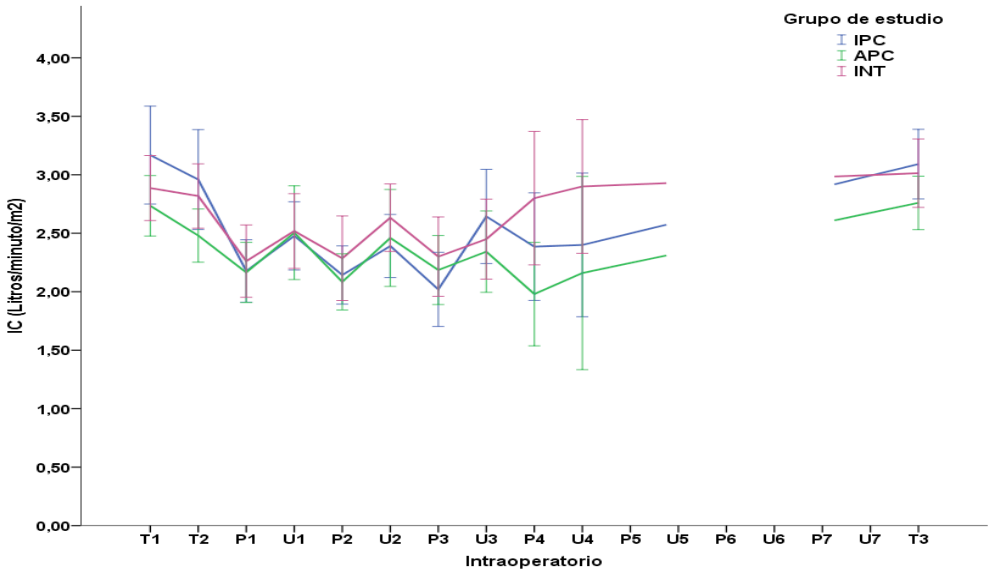

Figura 24: Representación gráfica de la evolución del índice cardiaco en los tres grupos de estudio. IC (índice cardíaco); T1 (tiempo basal); T2 (postprecondicionamiento); Px (a los 10 minutos de cada clampaje);Ux (al minuto de cada desclampaje) y T3 (1 hora postresección). Los valores expresan la media y su intervalo de confianza del 95 %. * Los valores de los tiempos de Pringle P5, P6 y P7 no se desarrollan por falta de efectivos en los grupos de estudio

6.3.1.5 Índice de resistencias vasculares sistémicas:

El IRVS experimentó un aumento, aunque estadísticamente no significativo, en todos los pacientes durante las diferentes maniobras de Pringle y un descenso igualmente no significativo, en los desclampajes del hilio hepático. Este comportamiento fue similar en todos los grupos de estudio (p=0,996). (figura 25)

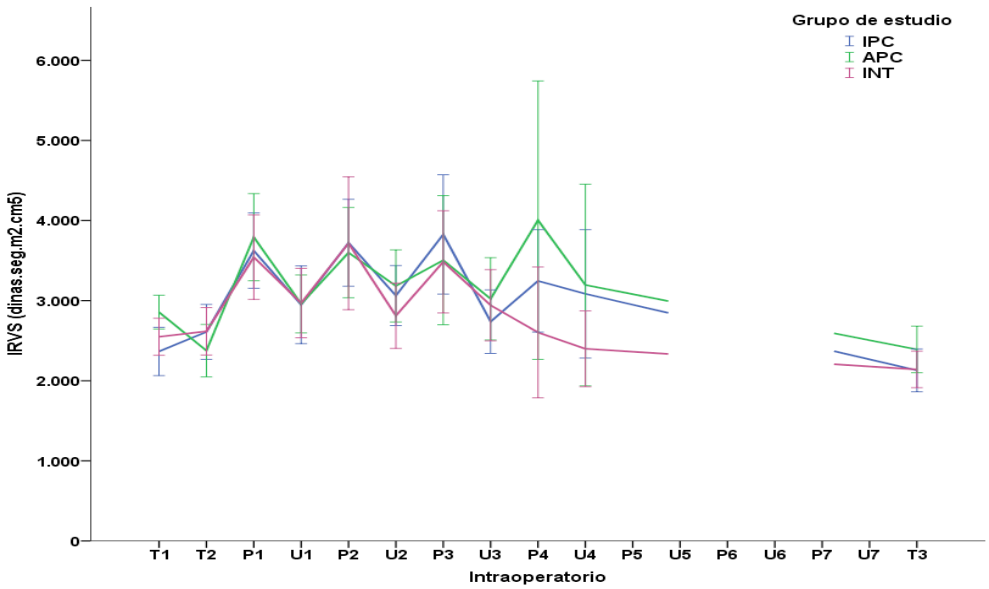

Figura 25: Representación gráfica de la evolución de las resistencias vasculares sistémicas en los tres grupos de estudio. IRVS (índice de resistencias vasculares sistémicas); T1 (tiempo basal); T2 (postprecondicionamiento); Px (a los 10 minutos de cada clampaje);Ux (al minuto de cada desclampaje) y T3 (1 hora postresección). Los valores expresan la media y su intervalo de confianza del 95 %.* Los valores de los tiempos de Pringle P5, P6 y P7 no se desarrollan por falta de efectivos en los grupos de estudio.

6.3.1.6 Complicaciones intraoperatorias

La hipertensión arterial (29,2%), taquicardia (23,6%), disminución del índice cardíaco (19,8%) e hipotensión (17,9%) fueron las complicaciones más frecuentes, aunque sin diferencias entre grupos. La administración de perfusión de noradrenalina fue necesaria en un 6,6% de los pacientes sin diferencias entre los tres grupos de estudio. Otras complicaciones a destacar, fueron bradicardia (5,6%), Broncoespasmo (1,8%) y neumotórax (1,8%).

6.4 FUNCIÓN HEPÁTICA POSTOPERATORIA

6.4.1 LESIÓN HEPATOCELULAR.

6.4.1.1 Transaminasas

La evolución de las transaminasas (AST y ALT) durante los 7 días postoperatorios fue similar en los tres grupos de estudio (AST: p=0,128; ALT: p=0,674). Todos los pacientes presentaron un incremento significativo de éstas a las 6-24 horas postintervención, disminuyendo progresivamente a partir de 2º día (figura 26).

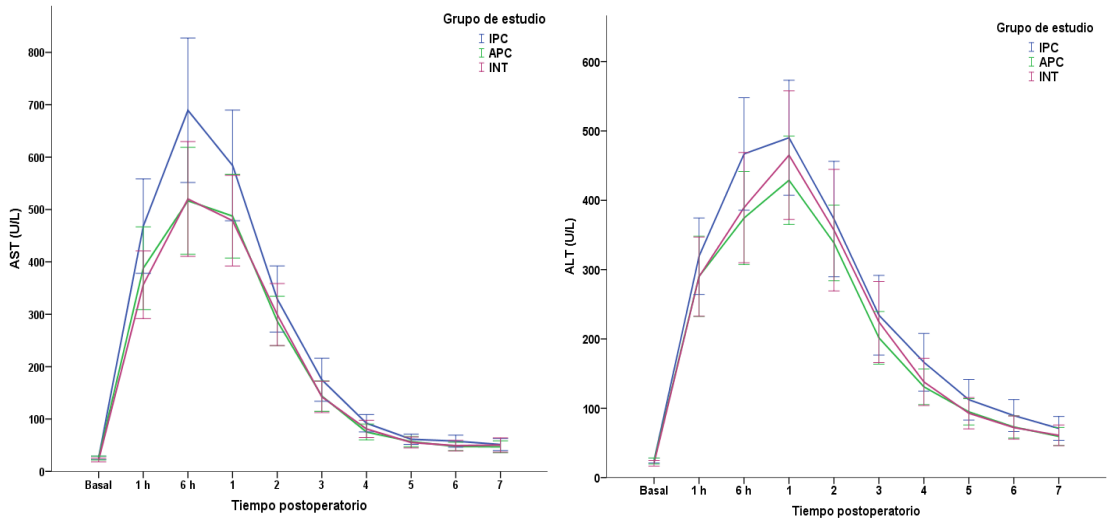

Figura 26: Cinética de las transaminasas durante el período postoperatorio. Los grupos presentan un incremento significativo (p<0,001) en los parámetros estudiados pero sin diferencias entre los grupos de estudio. Los valores expresan medianas e intervalo de confianza 95% de la mediana.

6.4.1.2 Bilirrubina y tiempo de protrombina

Estos dos parámetros analíticos de función hepática presentaron una evolución similar (bilirrubina: p=0,964; INR: p=0,343) en los tres grupos, en todo el período postoperatorio, con un incremento significativo en todos los pacientes en el primer y segundo día para descender posteriormente al final de la primera semana de la intervención (figura 27)

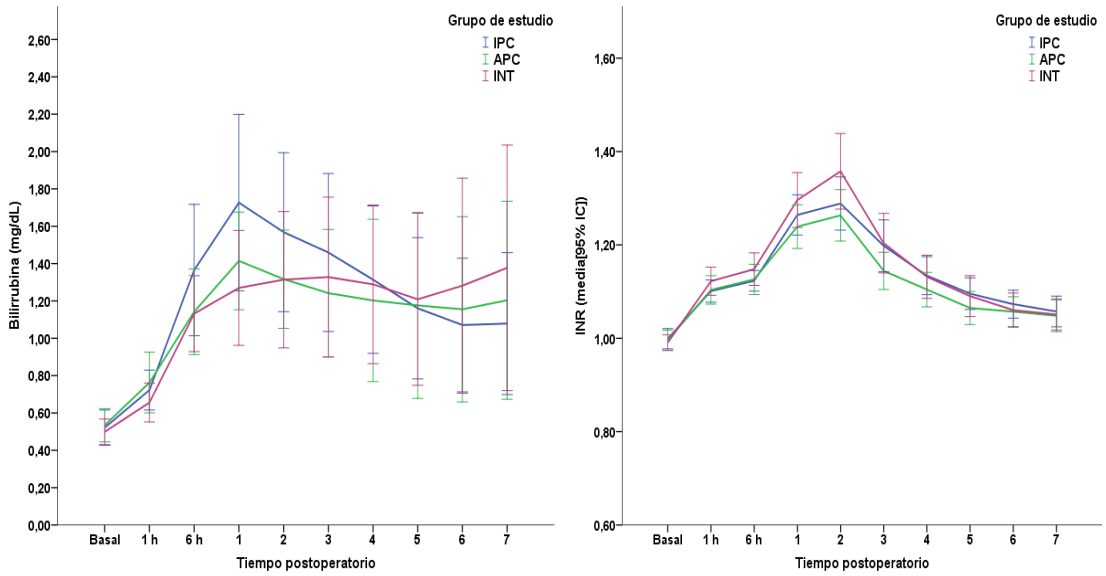

Figura 27: Cinética de los valores de bilirrubina y INR durante el postoperatorio. Los grupos presentan un incremento significativo (p<0,001) en los parámetros estudiados pero sin diferencias entre los grupos de estudio. Los valores expresan mediana e intervalos de confianza 95% de la mediana.

Si analizamos los niveles de máximo incremento de las transaminasas durante el período postoperatorio, podemos observar un incremento significativo (p=0,041) de los niveles AST en el grupo de precondicionamiento isquémico, pero si ajustamos los resultados por edad, ALT, AST, INR, ácido hialurónico y bilirrubina basales, esteatosis, quimioterapia, tiempo de isquemia total y tipo de resección para excluir posibles diferencias entre los grupos de pacientes a pesar de la aleatorización, esta diferencia desaparece (p=0,053). En cambio, en el caso de la bilirrubina y INR, al analizar los niveles pico de los mismos, no observamos ninguna diferencia entre los grupos, de forma ajustada y no ajustada a los parámetros anteriormente descritos (tabla 6)

Tabla 6: Niveles pico de los parámetros bioquímicos

	IPC (n = 36)	APC (n = 34)	INT (n = 36)	*P*
AST, U/L	590,8 (543.3)	438,5 (307)	441,4 (307)	0,053
ALT, U/L	459,3 (271,7)	407,5 (271,7)	394,9 (269,1)	0,599
Bilirrubina, mg/dL	1,2 (1,25)	1,3 (0,95)	1,04 (0,63)	0,134
INR	1,2 (0,21)	1,2 (0,23)	1,3 (0,33)	0,232

Los datos se expresan en medianas (IQR). IPC, precondicionamiento isquémico; APC, precondicionamiento anestésico; INT, clampaje intermitente; ALT, alanino aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; INR, ratio normalizada internacional . Los datos han sido ajustados por edad, niveles basales de transaminasas, bilirrubina, ácido hialurónico, esteatosis, quimioterapia, tipo de resección y tiempo de isquemia total.

6.4.2 LESIÓN DEL SINUSOIDE ENDOTELIAL. ÁCIDO HIALURÓNICO.

Una hora post-resección, todos los pacientes experimentaron un aumento significativo (p<0,001) de los niveles basales de ácido hialurónico, pero sin diferencias significativas entre los tres grupos de estudio p=0,514. (figura 28).

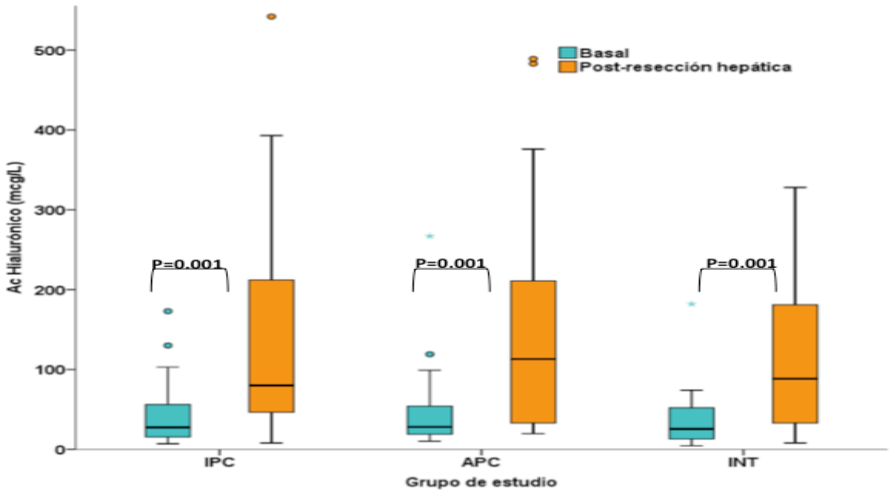

Figura 28. Niveles de ácido hialurónico basal y post-resección.

6.4.3 CORRELACIONES ENTRE LOS DIFERENTES PARÁMETROS BIOQUÍMICOS, CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS PACIENTES Y VARIABLES QUIRÚRGICAS.

Considerando todos los pacientes en conjunto, no se encontró ninguna correlación entre las variables bioquímicas analizadas y edad, esteatosis o tiempo de isquemia total. Únicamente los niveles postresección de HA y el máximo incremento de nivel de bilirrubina en el postoperatorio presentaron una correlación significativa (r=0,370) (figura 29)

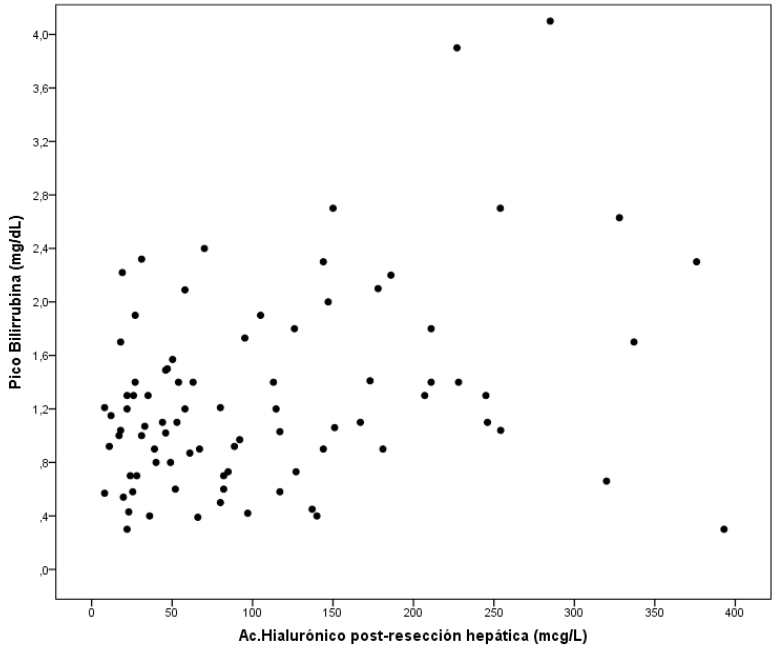

Figura 29: Correlación entre los niveles pico de bilirrubina en el postoperatorio y los niveles de ácido hialurónico postresección.

6.4.4 LESIÓN HISTOLÓGICA

El análisis histológico del parénquima hepático a los sesenta minutos postresección demostró lesiones leves en la mayoría de los pacientes del estudio. Las diferentes alteraciones histológicas evaluadas: esteatosis; infiltración leucocitaria y congestión sinusoidal se observaron en un porcentaje similar, del 60%. Un grado de esteatosis <30% fue objetivada en 52 pacientes (49,05%) y >30% en seis pacientes (5,6%); en 51 pacientes (48%) se constató infiltración leucocitaria leve y en 14 pacientes (13,2%) moderada; en tres pacientes (2,8%) la infiltración leucocitaria fue severa. Con relación a la congestión sinusoidal, 61 pacientes (57,5%) tenían un grado 1, ocho pacientes(7,5%) presentaron un grado 2 y una congestión grado 3 fue observada en un paciente (0,9%); Finalmente, la necrosis hepatocelular, que fue la

lesión histológica menos frecuente, sólo se observó en cuatro pacientes (3,7%) y fue de bajo grado (grado 1). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos del estudio tal como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Lesión histológica determinada por método colorimétrico (hematoxilina-eosina) 1 hora post-resección.

		IPC (n = 36)	APC (n = 34)	INT(n = 36)	*P*
Infiltración leucocitaria	Leve/moderada	23	22	20	0,527
	Severa	-	-	3	NC
Congestión sinusoidal	Leve/moderada	22	23	24	0,621
	Severa	-	-	1	NC
Esteatosis	Leve/moderada	18	18	16	0,808
	Severa	2	2	2	0,536
Necrosis hepatocelular	Leve/moderada	1	1	2	0,536
	Severa	-	-	-	NC

Datos expresados en número de casos. NC: no calculado.

En la siguiente figura (figura 30) podemos observar imágenes de lesiones histológicas de algunos pacientes del estudio.

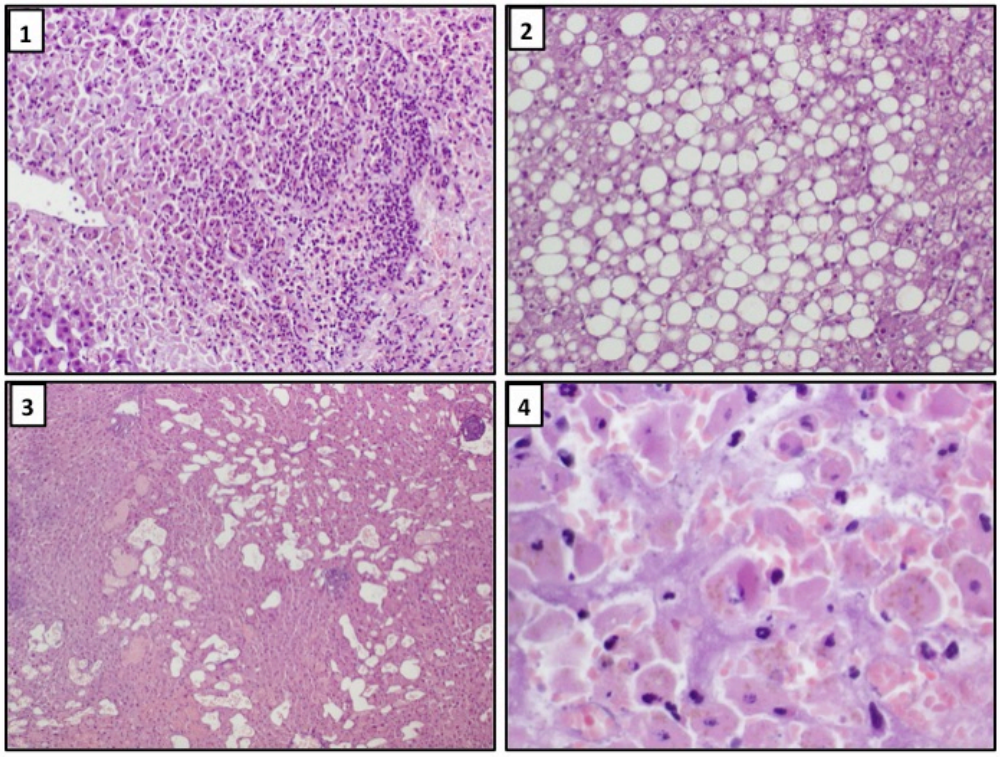

Figura 30: 1. Infiltración leucocitaria; 2. Esteatosis; 3. Congestión sinusoidal; 4. Necrosis hepatocelular.

6.4.5 ACTIVIDAD DE CASPASA 3

La apoptosis de las células hepáticas fue evaluada de forma indirecta a través de la expresión de caspasa 3 mediante inmunohistoquímica, 60 minutos postresección. Se observó un grado significativo de apoptosis en un 40% de los pacientes distribuidos de manera similar entre los tres grupos (figura 31). El índice apoptoico no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos del estudio (IPC, 38,9%; APC, 35,3%; INT, 40%; *P* = 0,683). No se encontró ninguna correlación entre índice apoptoico y ácido hialurónico (r=0,058), lesión histológica: esteatosis (r=0,064); infiltración leucocitaria (r=0,076); congestión sinusoidal (r=0,055); necrosis (r=0,048) u otros marcadores de función hepática: AST (r=0,128); ALT(r=0,145); bilirrubina (r=0,103); INR(r=0,023).

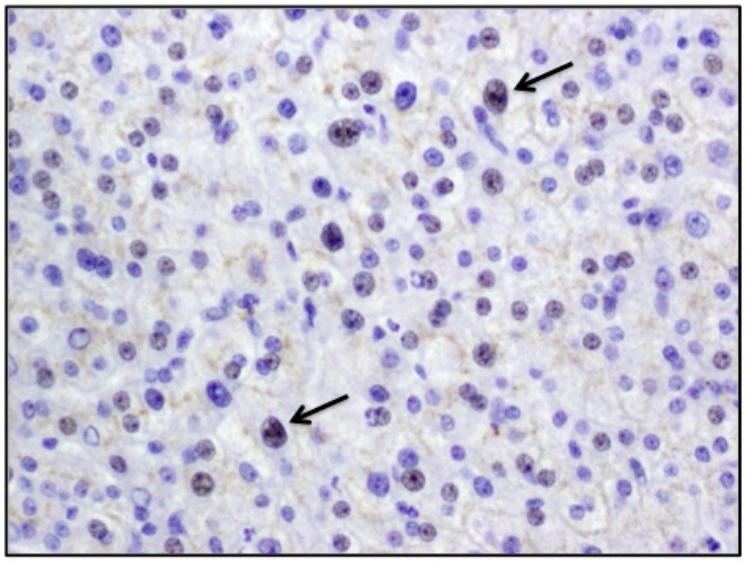

Figura 31: Tinción para caspasa 3: Células con expresión de caspasa 3 (flechas)

6.4.6 FORMA INDUCIBLE DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA

Una hora post-resección, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en la expresión tisular de iNOS (p=0,186). Asímismo ninguno de los grupos estudiados mostró cambios significativos de la misma con respecto al basal como se puede observar en la figura 32.

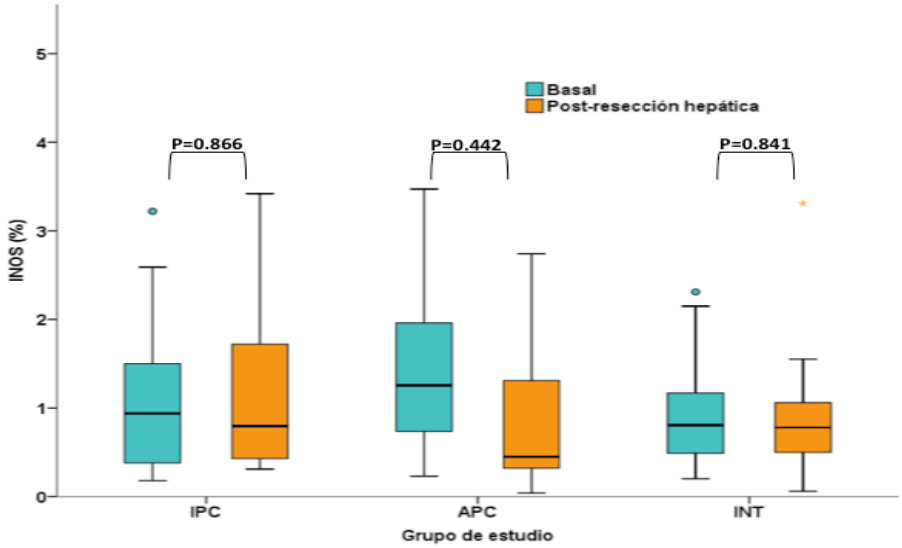

Figura 32. Expresión tisular de la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS), basal y una hora postresección.

6.5 EVOLUCIÓN CLÍNICA POSTOPERATORIA

Todos los pacientes fueron extubados en quirófano y trasladados a la unidad de reanimación postquirúrgica, donde permanecieron durante las primeras 3-4 horas para ser transferidos posteriormente, según protocolo hospitalario, a la unidad de semicríticos.

6.5.1 COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS

La severidad y frecuencia de las complicaciones, estancia en la Unidad de semicríticos, necesidad de ingreso en la Unidad de Cuidados intensivos (UCI) y días de ingreso hospitalario fue similar entre los grupos (tabla 8)

Tabla 8. Número, severidad de complicaciones y días de ingreso.

	IPC (n = 36)	APC(n = 34)	INT (n = 36)	*P*
Ausencia de complicaciones	20 (58,8)	19 (52,7)	17 (47,2)	0,409
Complicaciones menores	12 (35,2)	14 (38,8)	17 (47,2)	0,272
Complicaciones mayores	4 (11,7)	1 (2,7)	3 (8,3)	0,353
Estancia en semicríticos (días)*	5 (1)	5 (3)	5 (2)	0,915
UCI	0	0	1	NC
Fallecimiento	0	0	1	NC
Días de ingreso (días)*	11,6 (7,0)	11,6 (5,6)	11,8 (6,5)	0,986

Datos expresados como numero de casos (%).* mediana (IQR).NC: no calculado.

Cincuenta y seis pacientes no presentaron ninguna complicación y 43 pacientes presentaron complicaciones menores (grados I y II clasificación Clavien-Dindo[181]). La Tabla 9 muestra las complicaciones encontradas. Las complicaciones más frecuentes de grado I fueron la hiperbilirrubinemia >3mg/dl en nueve pacientes (8,4%), el incremento del INR > 1,5 en el 7,5% de los pacientes y la presencia de ascitis en siete pacientes (6,6%). Cuatro pacientes presentaron encefalopatía grado I y tres fistula biliar transitoria de bajo débito y duración inferior a tres días. Las complicaciones respiratorias se evidenciaron en seis pacientes, tres de ellos fueron diagnosticados de atelectasia y los otros tres de derrame pleural. Dos pacientes presentaron íleo paralítico que se solucionó espontáneamente. Las complicaciones cardiológicas y renales únicamente se observaron en tres pacientes.

Las complicaciones más frecuentes de grado II fueron el íleo paralítico (n=4; 3,7%) que requirió la colocación de sonda nasogástrica y administración de nutrición parenteral total (NPT), y la fístula biliar (n=3; 2,8%) de duración superior a una semana que se trató con somatostatina y NPT. La ascitis se diagnosticó en tres pacientes, precisando la administración seroalbúmina y diuréticos para su resolución definitiva. Cuatro pacientes presentaron una insuficiencia hepática moderada (PHLF grado B) que se resolvió sin tratamiento invasivo pero que precisaron de una mayor estancia en la unidad de semicríticos. Se transfundieron tres pacientes durante el postoperatorio aunque no se requirió ninguna reintervención por hemorragia. Las complicaciones infecciosas se evidenciaron en tres pacientes y fueron solucionadas únicamente con tratamiento antibiótico, dos de ellos presentaron una infección de la pared abdominal y un paciente fue diagnosticado de neumonía.

Entre las complicaciones grado III, fue necesario una sutura de la pared abdominal con anestesia local por persistencia de ascitis en cuatro pacientes del estudio. Se colocaron dos drenajes percutáneos (guiados ecográficamente) por un absceso subfrénico y por una fistula biliar refractaria al tratamiento conservador. Únicamente se realizó una reintervención en un paciente del grupo IPC, debido a la presencia de isquemia cutánea de una parte de la incisión quirúrgica. Las complicaciones grado IV y V se presentaron en un paciente del grupo INT, al que se le había realizado una hepatectomía derecha extendida, que presentó una insuficiencia hepática grave (PHLF C), sepsis y fallo multiorgánico, falleciendo a los 20 días postintervención.

Tabla 9. Complicaciones postoperatorias

	IPC	APC	INT	P
Grado I				
Hiperbilirrubinemia	2	3	4	
INR>1.5	2	2	4	
Fuga biliar transitoria	1	1	1	
Encefalopatia	2		2	
Ascitis	2	2	3	
Ileo	2			
Derrame pleural		1	2	
Atelectasia	2	1		
Disfunción renal			1	
Hipertension		1	1	
Angor			1	
Total	13	11	19	0,24
Grado II				
Fistula biliar	2		1	
Ileo (NPT)	2	2		
Ascitis	1		2	
Infección pared	1	1		
Anemia (transfusión)	1	1	1	
PHLF (B)	1	1	2	
Neumonia			1	
Total	8	5	7	0,29
Grado IIIa				
Ascitis (sutura)	2	1	1	
Absceso(drenaje)	1			
Fuga biliar (drenaje)			1	
Total	3	1	2	0,62
Grado IIIb				
Re-IQ infección	1			0,37
Grado IV				
PHLF(C)			1	0,37
Grado V (fallecimiento)			1	0,37

Datos expresados como número de casos. PHLF: insuficiencia hepática post-hepatectomía.

6.6. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA ACTUARIAL ANUAL

No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre grupos en cuanto a la supervivencia al año de la cirugía (p=0,433) como se puede observar en la figura 33. En el grupo IPC no hubo ningún fallecimiento mientras que en el grupo APC y INT se evidenciaron dos en cada grupo. Un paciente falleció a los 20 días en el grupo INT por complicaciones postoperatorias y los otros tres pacientes murieron por evolución de su enfermedad, diseminación metastásica.

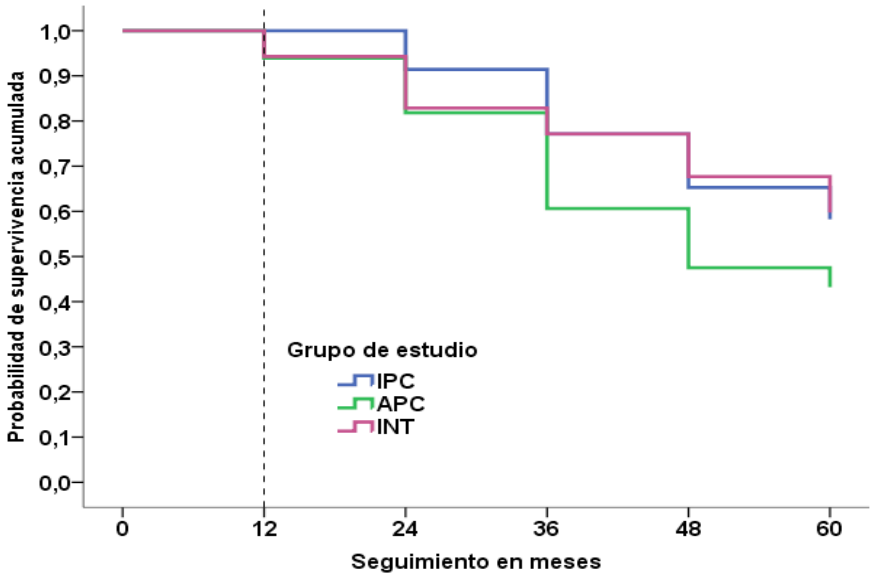

Figura 33: Supervivencia actuarial anual hasta los 5 años.

6.7 HEPATECTOMÍA MAYOR Y MENOR

Cuando estratificamos los tres grupos de estudio por tipo de hepatectomía (resección mayor y menor), no encontramos diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables estudiadas (evolución hemodinámica intraoperatoria, marcadores de función hepática, ácido hialurónico, índice apoptoico, lesiones histológicas, iNOS, complicaciones postoperatorias y supervivencia actuarial al año de la cirugía). A continuación presentamos las tablas (10 a 14) y figuras (34 a 40) según el tipo de cirugía en los tres grupos del estudio.

Tabla 10: Comparación de características demográficas, clínicas , datos intraoperatorios nivel de apoptosis e incidencia de complicaciones postoperatorias de las hepatectomías mayores en los tres grupos de estudio.

	IPC (n = 21)	APC (n = 18)	INT (n = 19)	*P*
Edad, a	59 (16)	65 (14)	63 (18)	0,247
Sexo masculino, (n [%]).	8 (38,1)	13 (72,2)	13 (68,4)	0,056
IMC	27 (5,9)	25,7 (8,9)	25,4 (4,4)	0,675
ASA I/II/III, nº	1/16/4	0/17/1	0/16/3	0,447
Índice Charlson	6 (0)	7 (1)	6 (1)	0,272
Comorbilidad, (n [%]).				
Cardiovascular	9 (42,9)	12 (66,7)	8 (42,1)	0,074
Enfermedad Pulmonar	3 (14,3)	4 (22,2)	8 (42,1)	0,122
Diabetes mellitus	1 (4,8)	5 (27,8)	2 (10,5)	0,102
ALT, U/L	24,9 (21,6)	20,4 (25,2)	19,3 (13,9)	0,230
AST, U/L	27,9 (16,5)	21,3 (22,9)	20 (11,2)	0,121
Bilirrubina, mg/dL	0,4 (0,2)	0,5 (0,5)	0,5 (0,3)	0,558
INR	1,03 (0,07)	0,99 (0,09)	1,00 (0,07)	0,528
Quimioterapia adyuvante, (n [%])	15 (71,4)	14 (77,8)	9 (47,8)	0,117
Esteatosis leve-moderada, (n [%])	5 (23,8)	4 (22,2)	3 (15,8)	0,807
Hemorragia (ml)	500 (150)	500 (0)	500 (300)	0,677
Transfusión (n [%])	5 (23,8)	3 (16,7)	3 (15,6)	0,551
Tiempo de isquemia (min)	58.2 (17,7)	45,7 (25,5)	64,2 (25,2)	0,059
Número de clampajes	3 (1)	3 (0)	3 (1)	0,653
Tiempo quirúrgico (min)	300 (60)	300 (60)	330 (60)	0,093
Índice apoptoico (n [%])	8 (38,1)	5 (27,8)	7 (36,8)	0,768
Complicaciones postop (n [%])	13 (61,9)	11 (61,1)	14 (73,7)	0,658
Estancia hospitalaria (días)	10 (5)	11,5 (6)	11 (4)	0,958

IPC: precondicionamiento isquémico; APC: precondicionamiento anestésico; INT: clampaje intermitente; IMC: índice de masa corporal; ALT: alanino aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; INR: ratio normalizado internacional. Datos presentados como mediana (IQR) o número y porcentaje.

Tabla 11: Comparación de las características demográficas, clínicas, datos intraoperatorios , apoptosis, incidencia de complicaciones postoperatorias y estancia hospitalaria de las hepatectomías menores en los tres grupos de estudio.

	IPC (n = 15)	APC (n = 16)	INT (n = 17)	*P*
Edad, a	60 (21)	65 (12)	62 (20)	0,339
Sexo masculino, (n [%]).	7 (46,4)	10 (62,5)	7 (41,2)	0,450
IMC	25,5 (8,8)	27,2 (3,4)	26,7 (6,9)	0,465
ASA I/II/III, nº	0/15/0	0/11/5	2/13/2	0,081
Índice Charlson	6 (0)	6.5 (1)	6 (1)	0,370
Comorbilidad, (n [%]).				
Cardiovascular	5 (33,3)	8 (50)	6 (35,3)	0,576
Enfermedad Pulmonar	2 (13,3)	5 (31,2)	2 (11,8)	0,290
Diabetes mellitus	2 (13,3)	4 (25)	2 (11,8)	0,545
ALT, U/L	19 (7,2)	16,9 (13)	18,2 (11,8)	0,314
AST, U/L	20,4 (6,8)	21,6 (10,6)	18,6 (6,6)	0,253
Bilirrubina, mg/dL	0,6 (0,5)	0,4 (0,2)	0,5 (0,2)	0,617
INR	0,98 (0,08)	0,98 (0,07)	0,97 (0,09)	0,971
Quimioterapia adyuvante, (n [%])	13 (86,7)	11 (68,8)	12 (70,6)	0,450
Esteatosis leve-moderada, (n [%])	3 (20)	6 (37,5)	6 (35,3)	0,487
Hemorragia (ml)	450 (100)	500 (150)	400 (100)	0,859
Transfusión (n [%])	1 (6,7)	1 (6,2)	2 (11,8)	0,406
Tiempo de isquemia (min)	48,5 (17,7)	31 (25,5)	45 (25,2)	0,081
Número de clampajes	3 (1)	2 (2)	3 (2)	0,411
Tiempo quirúrgico (min)	300 (23)	300 (75)	300 (60)	0,901
Índice apoptoico (n [%])	6 (40)	7 (43,8)	7 (41,2)	0,976
Complicaciones postop. (n [%])	3 (20)	4 (25)	6 (35,3)	0,608
Estancia hospitalaria (días)	9 (2)	8 (3)	9 (5)	0,652

IPC: precondicionamiento isquémico; APC: precondicionamiento anestésico; INT: clampaje intermitente; IMC: índice de masa corporal; ALT: alanino aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; INR: ratio normalizada internacional. Datos presentados como mediana (IQR) o número y porcentaje.

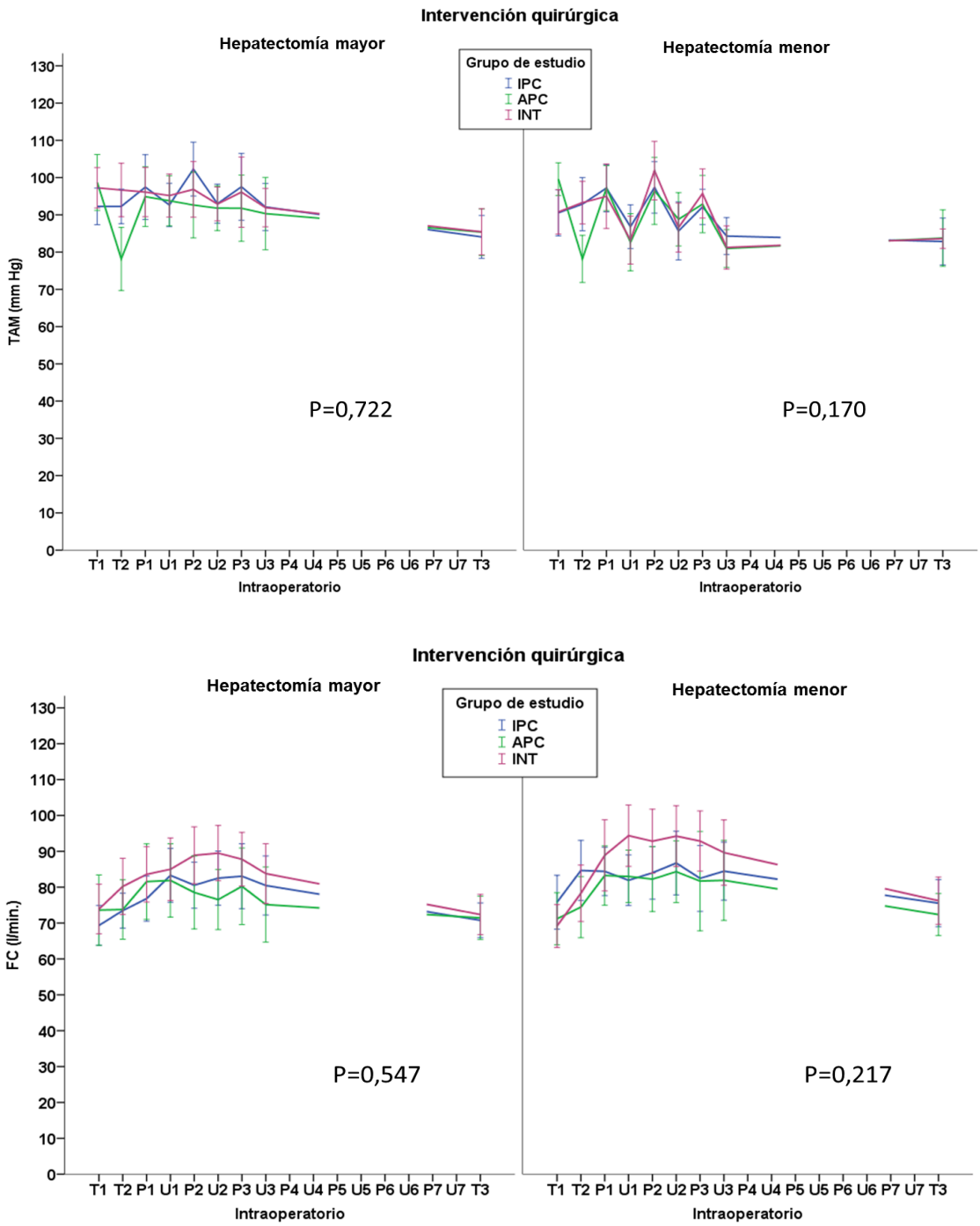

Figura 34: Comparación de la evolución intraoperatoria de la PAM y FC de las hepatectomías mayores y menores en los tres grupos de estudio. PAM (presión arterial media); FC (frecuencia cardíaca); T1 (tiempo basal); T2 (postprecondicionamiento); Px (a los 10 minutos de cada clampaje);Ux (al minuto de cada desclampaje) y T3 (1 hora postresección). Los valores expresan la media y su intervalo de confianza del 95 %.* Los valores de los tiempos de Pringle P5, P6 y P7 no se desarrollan por falta de efectivos en los grupos de estudio

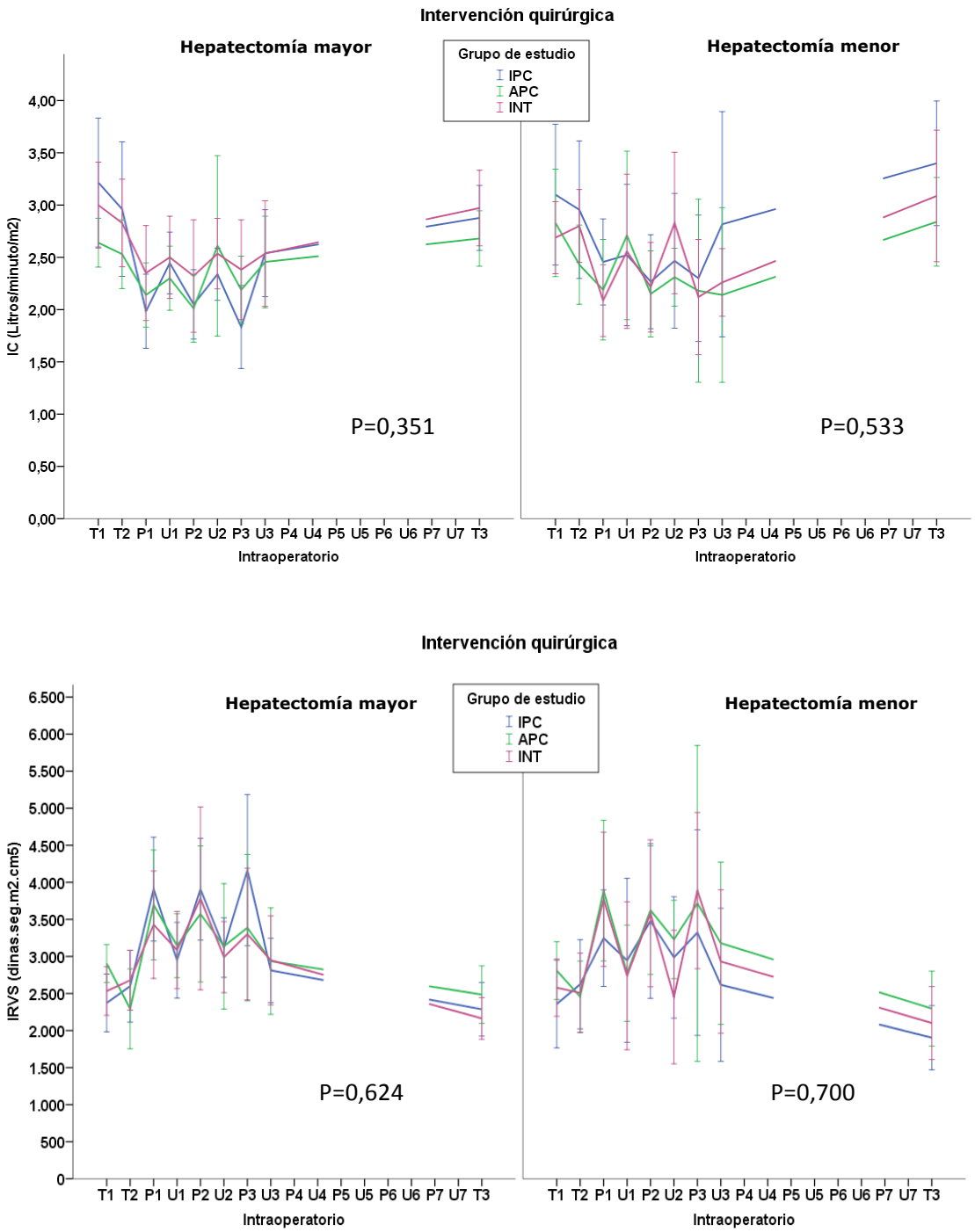

Figura 35: Comparación de la evolución intraoperatoria del IC y IRVS de las hepatectomias mayores y menores en los tres grupos de estudio. IC (índice cardíaco); IRVS (índice de resistencias vasculares sistémicas); T1 (tiempo basal); T2 (postprecondicionamiento); Px (a los 10 minutos de cada clampaje);Ux (al minuto de cada desclampaje) y T3 (1 hora postresección). Los valores expresan la media y su intervalo de confianza del 95 %.* Los valores de los tiempos de Pringle P5, P6 y P7 no se desarrollan por falta de efectivos en los grupos de estudio.

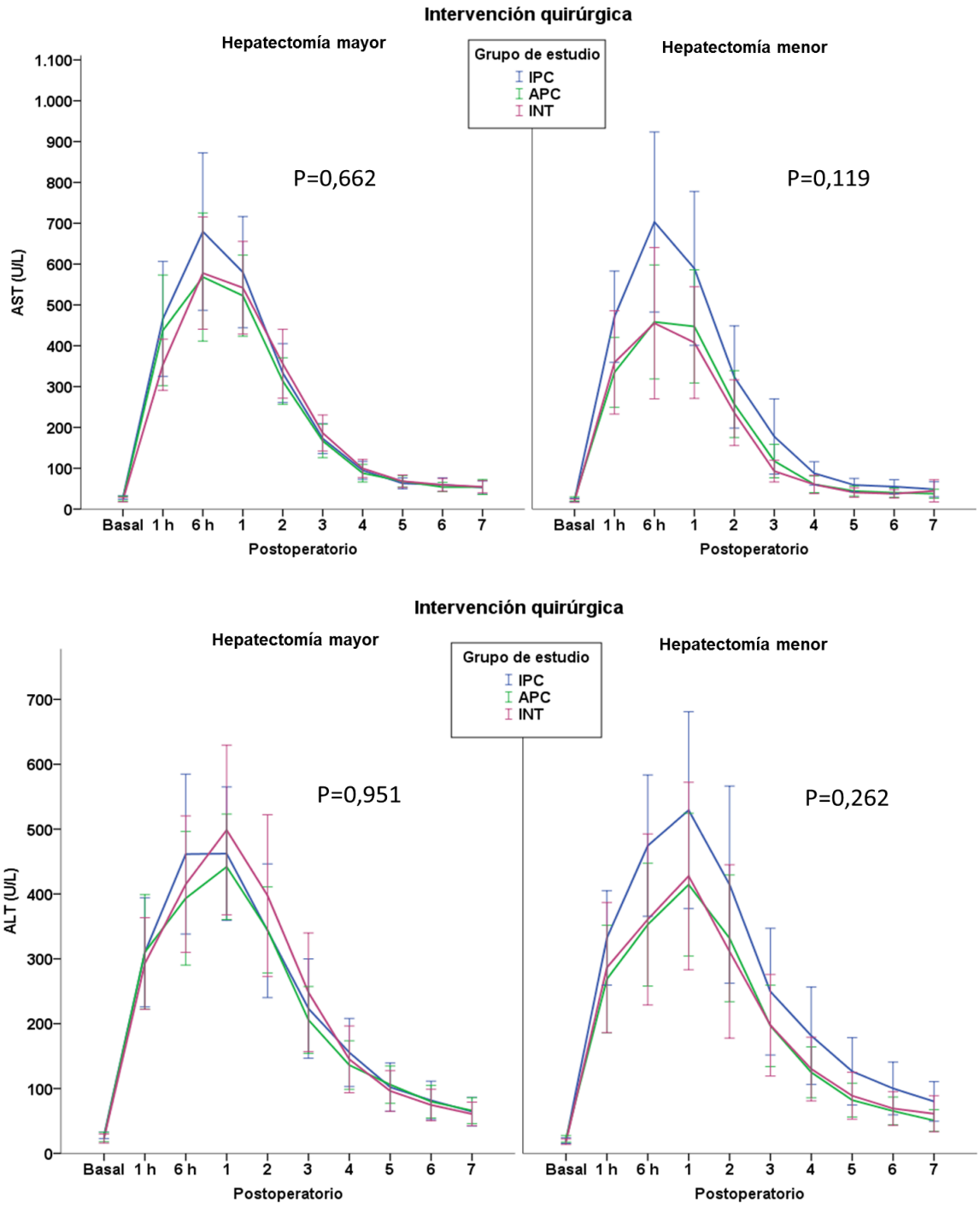

Figura 36 : Comparación de la evolución postoperatoria de las transaminasas de las hepatectomías mayores y menores en los tres grupos de estudio. Los valores expresan medianas e intervalo de confianza 95% de la mediana. IPC, precondicionamiento isquémico; APC, precondicionamiento anestésico; INT, clampaje intermitente; ALT, alanino aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa.

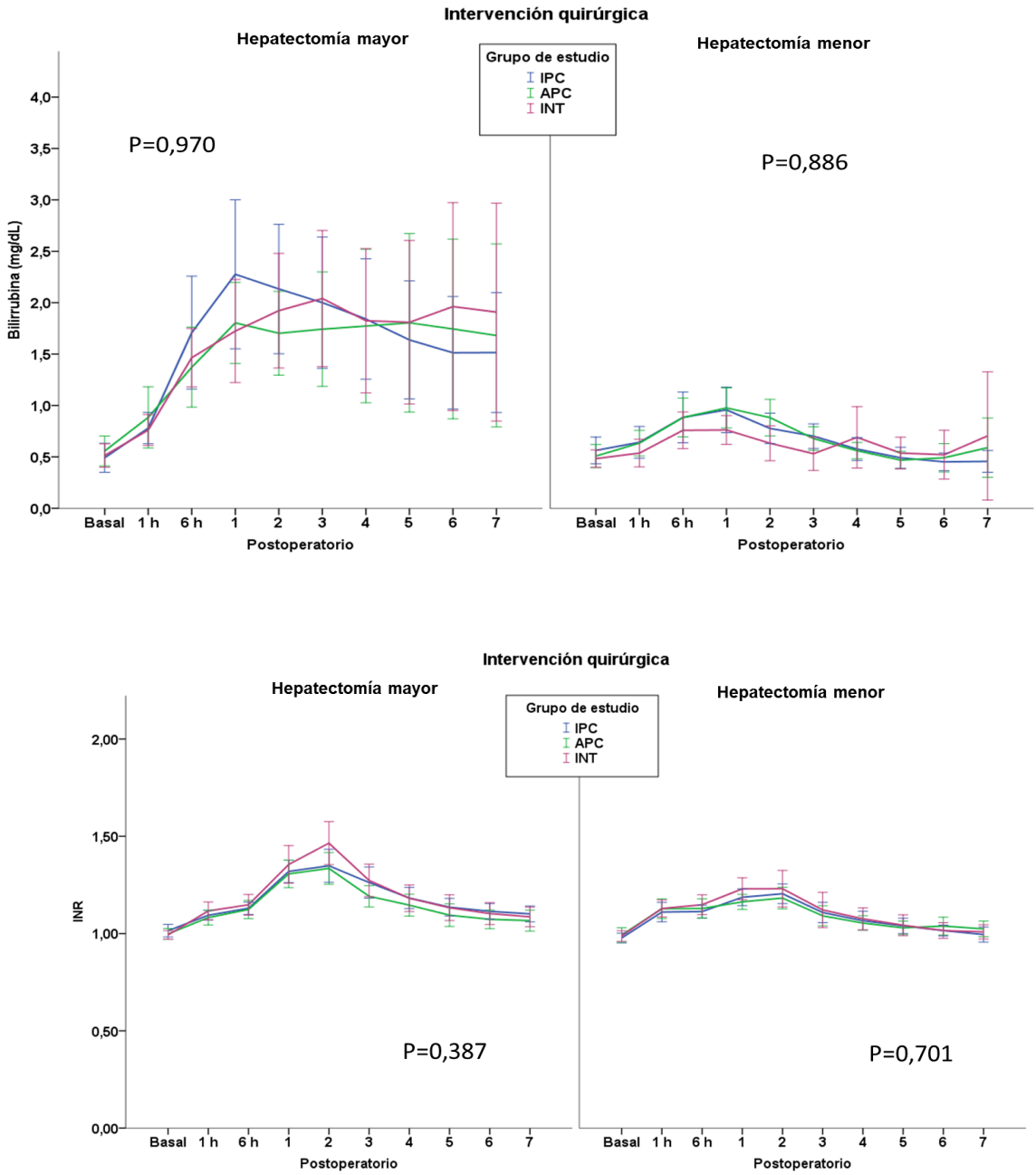

Figura 37. Comparación de la evolución postoperatoria de la bilirrubina e INR de las hepatectomías mayores y menores en los tres grupos de estudio. Los valores expresan medianas e intervalo de confianza 95% de la mediana. IPC, precondicionamiento isquémico; APC, precondicionamiento anestésico; INT, clampaje intermitente; INR: ratio normalizada internacional.

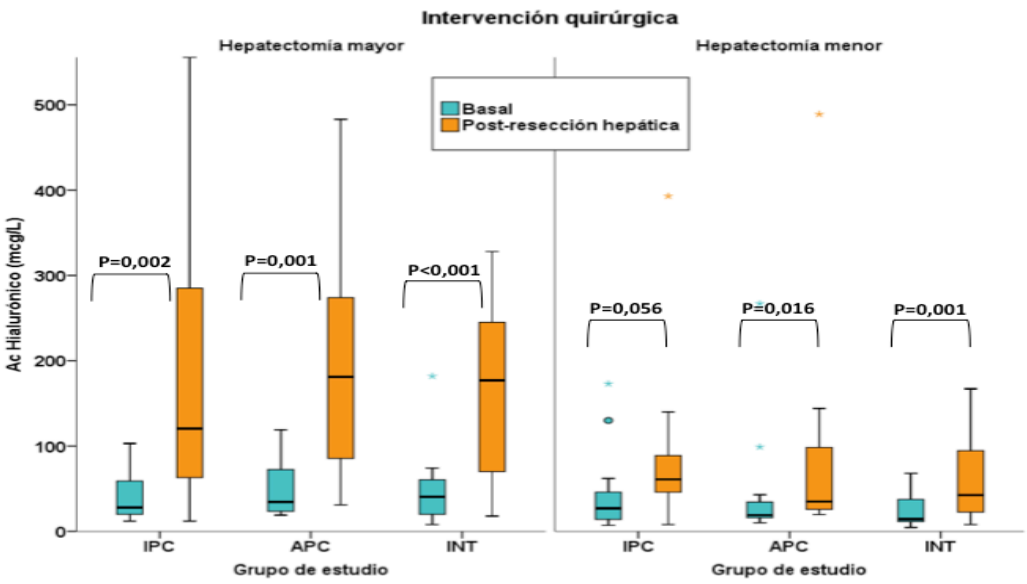

Figura 38 : Comparación de los niveles basales y postresección de ácido hialurónico en las hepatectomías mayores y menores en los tres grupos de estudio. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos: hepatectomías mayores (p=0,739) y hepatectomías menores (p=0,649).

Tabla 12. Comparación de los valores pico de los parámetros de función hepática de las hepatectomías mayores y menores en los tres grupos de estudio.

Hepatectomía mayor

	IPC (n = 21)	APC (n = 18)	INT (n = 19)	*P*
AST, U/L	585,6 (445,3)	489,5 (407)	538,2 (332,4)	0,319
ALT, U/L	422 (326,9)	407,5 (222.7)	405,8 (269,1)	0,442
Bilirrubina, mg/dL	1,9 (1,6)	1,6 (0,9)	1,3 (1,2)	0,282
INR	1,3 (0,3)	1,3 (0,3)	1,4 (0,3)	0,156

Hepatectomía menor

	IPC (n = 15)	APC (n = 16)	INT (n = 17)	*P*
AST, U/L	650,4 (610)	438,5 (252,5)	342 (237,5)	0,151
ALT, U/L	471 (342,8)	385,3 (362,6)	341 (286,1)	0,253
Bilirrubina, mg/dL	1,0 (0,6)	1,0 (0,68)	0,8 (0,5)	0,395
INR	1,2 (0,3)	1,2 (0,3)	1,2 (0,3)	0,957

Los datos se expresan en medianas (IQR). IPC, precondicionamiento isquémico; APC, precondicionamiento anestésico; INT, clampaje intermitente; ALT, alanino aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; INR, ratio normalizada internacional. Los datos han sido ajustados por edad, niveles basales de transaminasas, bilirrubina, ácido hialurónico, esteatosis, quimioterapia, tipo de resección y tiempo de isquemia total.

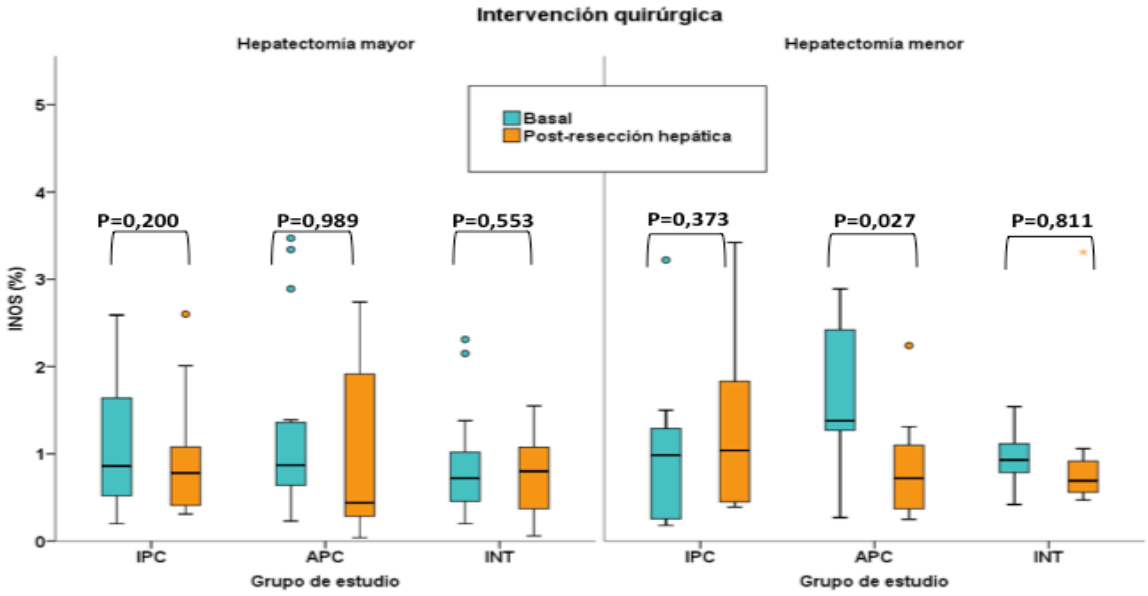

Figura 39: Comparación de los valores de iNOS basal y postresección de las hepatectomías mayores y menores en los tres grupos de estudio. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos: hepatectomías mayores (p=0,769) y hepatectomías menores (p=0,971)

Tabla 13: Comparación de la lesión histológica en las hepatectomías mayores en los tres grupos de estudio

		IPC(n=21)	APC(n=18)	INT(n=19)	*P*
Infiltración leucocitaria	Leve/moderada	13	10	11	0,622
	Severa	-	-	1	NC
Congestión sinusoidal	Leve/moderada	14	10	12	0,838
	Severa	-	-	-	NC
Esteatosis	Leve/moderada	12	9	7	0,052
	Severa	-	-	-	NC
Necrosis hepatocelular	Leve/moderada	-	-	1	NC
	Severa	-	-	-	NC

Datos expresados en número de casos. NC: no calculado.

Tabla 14: Comparación de la lesión histológica en las hepatectomías menores en los tres grupos de estudio

		IPC(n=15)	APC(n=16)	INT(n=17)	*P*
Infiltración leucocitaria	Leve/moderada	10	12	9	0,626
	Severa	-	-	2	NC
Congestión sinusoidal	Leve/moderada	8	13	12	0,310
	Severa	-	-	1	NC
Esteatosis	Leve/moderada	6	9	9	0,876
	Severa	2	2	2	NC
Necrosis hepatocelular	Leve/moderada	1	1	2	0,797
	Severa	-	-	-	NC

Datos expresados en número de casos. NC: no calculado.

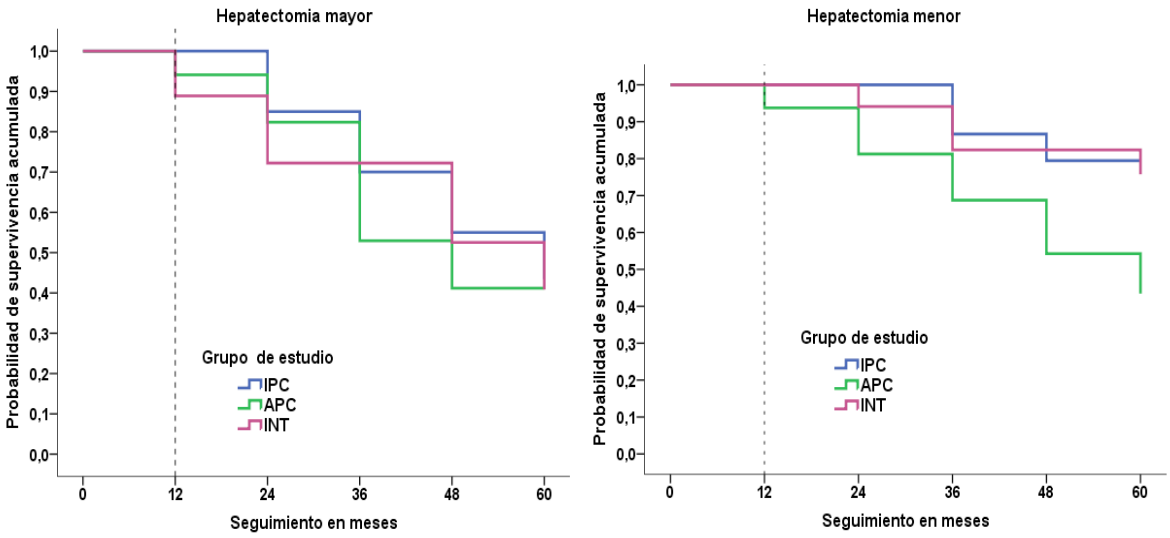

Figura 40: : Supervivencia actuarial anual hasta los 5 años de las hepatectomías mayores y menores en los tres grupos de estudio.

7. DISCUSIÓN

Actualmente la resección hepática es una cirugía muy frecuente debido a que su principal indicación son las metástasis de cáncer colorrectal, neoplasia con alta prevalencia en todo el mundo. A consecuencia de la estructura vascular del hígado, esta cirugía tiene un riesgo elevado de hemorragia por lo que se realiza generalmente con clampaje vascular. Este hecho condiciona una lesión celular debido a la isquemia y posterior reperfusión del órgano, lo que se conoce como lesión por isquemia-reperfusión (IR), la cuál provoca un aumento de la morbimortalidad en los pacientes sometidos a este tipo de cirugía. Para modular el efecto deletéreo sobre la célula hepática se han descrito diversas estrategias, entre ellas el fenómeno del precondicionamiento isquémico (IPC), con resultados contradictorios. El precondicionamiento anestésico (APC) ampliamente aceptado en el corazón ha sido poco estudiado en el hígado. En esta tesis evaluamos la influencia de ambos tipos de precondicionamiento en la lesión hepática por IR durante la cirugía de resección hepática.

En nuestro estudio, la cirugía hepática realizada con oclusión vascular intermitente, la aplicación de IPC o APC con sevoflorane previo al clampaje no supone ningún beneficio adicional, y este resultado lo hemos podido demostrar mediante la utilización de una metodología especialmente sensible para valorar el daño celular hepático.

Durante la última década se han efectuado diversos trabajos en humanos evaluando el efecto protector del IPC en cirugía hepática con resultados contradictorios. La mayoría de ellos se han basado principalmente en datos bioquímicos de disfunción hepatocelular e incidencia de complicaciones postoperatorias a corto y medio plazo. Dado que la lesión hepática por IR es un fenómeno de gran complejidad y en el que están involucrados múltiples mecanismos moleculares e interacciones celulares, relacionar únicamente el impacto de dicha lesión con estos parámetros es insuficiente y consideramos que es la causa de la discrepancia de los resultados en la literatura. Es decir, en nuestra opinión la metodología utilizada hasta el momento da una información parcial, visualizando sólo una parte del impacto de la IR sobre el órgano. Con esta información incompleta no se puede correlacionar directamente el posible efecto protector del precondicionamiento con la disminución de la intensidad de la lesión hepática por IR.

Para intentar analizar en su totalidad las consecuencias de la lesión hepática por IR, en el estudio de esta tesis, además de monitorizar la función hepática mediante los test estándar de laboratorio y evolución postoperatoria, hemos aplicado métodos de análisis de la lesión histológica y apoptosis celular para evaluar si el tratamiento con IPC o APC ofrece beneficios en las alteraciones de la estructura

histológica hepática. Son escasos los trabajos que emplean el estudio histológico para valorar el efecto del precondicionamiento[129,139,140,185,186], los dos metanálisis recientemente publicados[154,187] referencian las conclusiones de los estudios en base a parámetros bioquímicos de función hepática, complicaciones postoperatorias, insuficiencia hepática y mortalidad. Por tanto nosotros aportamos la información del análisis de la lesión histológica para dar más peso a los resultados de nuestro estudio.

Otra aportación de esta tesis fue poder definir un marcador de disfunción rápida y accesible que correlaciona el daño sinusoidal mediante la determinación del ácido hialurónico (HA) al final de la cirugía. Aunque algunos trabajos demuestran que los niveles de ácido hialurónico son marcadores predictivos de la función de las células endoteliales sinusoidales tras la resección hepática[188,189] y de la viabilidad del injerto post-trasplante hepático[190], este es el primer estudio clínico en cirugía de resección hepática que evalúa la influencia del precondicionamiento en la afectación sinusoidal posterior a IR normotérmica mediante la determinación sérica de HA.

Debido a la complejidad de los pacientes sometidos a cirugía hepática es necesario analizar todas las variables que pueden sesgar los resultados, siendo de especial importancia un control estricto de la población de estudio. Por tanto se han tenido en cuenta todos los factores que podrían haber tenido influencia en la gravedad de la lesión por IR hepática y en el curso postoperatorio de los pacientes.

Análisis de la población

Todos los pacientes siguieron los protocolos de actuación perioperatoria descritos en el diseño del estudio. El equipo anestésico-quirúrgico responsable de la indicación, cirugía y seguimiento fue el mismo en todos ellos y durante todos los años del estudio. Se excluyeron todos los pacientes con alteración en la funcionalidad hepática preoperatoria y/o con diagnóstico de hepatopatía crónica o cirrosis, ya que debido a la menor reserva funcional del órgano enfermo, la respuesta al insulto isquémico es más intensa, con mayor afectación de la funcionalidad hepática y consecuentemente una incidencia superior de complicaciones postoperatorias[191]. Todo ello podría haber dado lugar a confusión en la interpretación de los resultados, con necesidad de una muestra poblacional muy alta difícil de obtener en un solo centro. También fueron excluidos los pacientes con antecedentes de enfermedad pulmonar, cardíaca o renal severa, pues la lesión hepática por IR también puede afectar a diferentes órganos distantes[192] y una enfermedad preexistente grave aumentaría de por sí la incidencia de complicaciones postoperatorias. Aún así, la comorbilidad media de los pacientes del estudio fue superior a 6 en la escala de Charlson en todos los

grupos, con una predominancia de la comorbilidad cardiovascular (45%). Este índice de complejidad demuestra el alto riesgo de la población de estudio de esta cirugía y la necesidad e importancia de mejorar el curso postoperatorio en los pacientes. En este contexto se encuentra una plena justificación para los estudios como el nuestro, dirigidos a identificar medidas con beneficio en la función hepática postoperatoria.

Aunque los pacientes incluidos en el estudio se consideraron sin hepatopatía previa, un 70% de los mismos había recibido quimioterapia antes de la cirugía. Es bien conocido el hecho de la hepatotoxicidad de la quimioterapia, aunque la influencia en la evolución postoperatoria no está bien definida, dependiendo de los quimioterápicos utilizados, duración del tratamiento y tiempo previo a la resección hepática[193,194]. Por lo tanto no podemos descartar, a pesar de unos valores normales de función hepática preoperatoria, cierto grado de afectación hepática subclínica en nuestros pacientes.

La incidencia de esteatosis basal en los pacientes del estudio de esta tesis fue del 25%, similar a publicaciones previas[129,152], sin diferencias entre grupos. Aunque la lesión hepática por IR es mayor en los hígados esteatósicos[195] el efecto protector del precondicionamiento en ellos ha resultado superior[152,176]. En nuestro trabajo no realizamos ningún análisis independiente en el grupo de pacientes afectos de esteatosis preoperatoria por lo que no pudimos evaluar el efecto directo del precondicionamiento en este grupo.

La edad media de nuestros pacientes fue de 60 años, similar en los tres grupos. La edad tiene un impacto en la respuesta frente a la IR. Estudios experimentales demuestran que la respuesta es más intensa en los animales de más edad y que el tratamiento de la lesión por IR es más efectiva en ellos[196]. En estudios en humanos, por el contrario, se demuestra que el efecto protector del IPC es mayor en pacientes menores de 60 años de edad[152]. Dado que la edad es una variable que puede influir en la evaluación del daño hepático y en el efecto del IPC, en este trabajo hemos ajustado los resultados según ésta para evitar posibles sesgos.

Debido a la duración del estudio, una de nuestras preocupaciones fue que la muestra incluida mantuviese la homogeneidad y por ello hicimos un análisis adicional de la población. Para ello efectuamos un estudio comparativo, dividiendo en tres bloques todo el período que duró el estudio. Evaluamos específicamente las variables preoperatorias que influyen negativamente en la lesión hepática por IR como la edad, presencia de esteatosis, quimioterapia preoperatoria y comorbilidad previa[192-196]. Al analizar estas variables en los diferentes años del trabajo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ellos, por lo que consideramos la muestra homogénea y válida para la interpretación de los resultados. Otro aspecto que pudiera haber variado a lo largo de los años es la experiencia del equipo anestésico-quirúrgico

y que ésta hubiera podido influir en los resultados. Sin embargo, creemos que la influencia de este aspecto se puede considerar escasa pues el equipo que intervino en todos los pacientes ya era muy experto cuando se inició el estudio.

La resección hepática se realizó con oclusión vascular intermitente y a un 50% de los pacientes se les efectuó una resección mayor. Factores del intraoperatorio como el tamaño de resección hepática realizada, el tiempo quirúrgico y el tiempo de clampaje total de la tríada portal que influyen en la gravedad de la lesión hepática por IR[34,41,72,79,197] no presentaron diferencias entre los tres grupos estudiados.

Tras este análisis consideramos que la población incluida era la óptima para estudiar la influencia del precondicionamiento en la cirugía de resección hepática, habiendo minimizado al máximo los factores de sesgo que presenta esta población tan compleja.

Análisis del impacto del precondicionamiento en la cirugía de resección hepática

El objetivo de esta tesis fue evaluar y comparar la efectividad del IPC y APC con sevoflorane frente a la lesión hepática por IR durante la cirugía de resección hepática realizada con oclusión vascular intermitente. Es importante destacar que la aplicación del APC, cuya utilidad se ha demostrado en el corazón, es una estrategia muy atractiva y fácil de incorporar al procedimiento anestésico para la cirugía hepática. Además no son necesarias maniobras específicas y no existe ningún riesgo para el paciente. El nuestro es el primer estudio que analiza los efectos del sevoflorane en la lesión hepática por IR en cirugía de resección hepática realizada con clampaje del hilio hepático de forma intermitente.

El fenómeno del IPC en cirugía hepática ha sido ampliamente discutido en la literatura de las últimas décadas. En cirugía experimental, en condiciones de normotermia (isquemia caliente), se ha demostrado un efecto beneficioso del IPC en resecciones hepáticas[138,141,150,151]. Los estudios clínicos, sin embargo, muestran resultados contradictorios[129,136,139,140,152,153,185,186,198-200] . Aunque algunos de estos estudios demuestran protección contra las consecuencias de la lesión por IR, evidenciadas por un menor incremento de las enzimas hepáticas en el postoperatorio y disminución de las complicaciones[129,136,139,152,153] otros autores no encuentran ningún beneficio[154,187,200,201].

Tal como hemos ya comentado, el precondicionamiento puede ser inducido farmacológicamente[158,159] y los anestésicos han sido un grupo de fármacos estudiados en la IR cardíaca. El APC es el precondicionamiento debido a agentes anestésicos, especialmente anestésicos halogenados[161,162] como el isoflorane y sevoflorane. Los agentes halogenados, opioides y un pequeño grupo de anestésicos utilizados

inicialmente en experimentos animales, han demostrado inducir cambios de precondicionamiento en tejido cardíaco[162-165] y los agentes halogenados han demostrado protección clínica en cirugía cardíaca[166-168].

Dada su inocuidad y facilidad de aplicación, resulta especialmente interesante poder mejorar la función hepática debida a lesión por IR con agentes anestésicos. Por ello, en los últimos años han sido diseñados diversos estudios experimentales para valorar la protección del precondicionamiento anestésico en el hígado[170,173,202,203]. Referente a la cirugía hepática y cirugía no cardíaca, parece complicado demostrar el efecto de precondicionamiento de los agentes anestésicos en pacientes anestesiados. Es decir, en la clínica es difícil demostrar un efecto farmacológico directo de estos agentes sin influencias, debido a dos problemas importantes: En primer lugar, en los estudios clínicos, existen una serie de factores asociados (tratamiento médico, opioides, corticoesteroides, precondicionamiento debido a diferentes clampajes-desclampajes intermitentes durante la cirugía) que podrían influenciar en la modulación de los marcadores, como la apoptosis, expresión de óxido nítrico (NO) o interleuquinas; en segundo lugar, todos los agentes anestésicos (halogenados, endovenosos, locales) tienen unos efectos similares en cuanto a la modulación de la respuesta inflamatoria inhibiendo o regulando la producción de NO[204]. Como en los estudios en humanos, no es posible inhibir o activar los mecanismos involucrados en la modulación de la protección anestésica para valorar si el mecanismo está o no implicado, los resultados de los estudios en la literatura son contradictorios. Por este motivo, mientras un estudio reciente sugiere que la anestesia con administración continua de halogenados comparada con la anestesia intravenosa con propofol no confiere ningún tipo de protección en el hígado remanente después de la resección[205]; un estudio previo del mismo grupo aplicando APC con sevoflorane en resecciones hepáticas realizadas con clampaje continuo, habían demostrado un efecto beneficioso[176]. En este contexto, es interesante destacar que el propofol a las dosis utilizadas durante la anestesia tiene propiedades antiinflamatorias, modifica la expresión de óxido nítrico, inhibe la función de los neutrófilos y es un potente antioxidante[206]. También el remifentanilo, en un estudio experimental, aunque a dosis superiores a las utilizadas en la clínica, presenta un efecto protector a nivel hepático[207]. Sin embargo, a excepción de los anestésicos halogenados, no existen estudios clínicos a nivel cardíaco que demuestren un efecto protector del precondicionamiento de otros agentes anestésicos frente a la lesión por IR.

La mayoría de estas estrategias de protección hepática, tanto isquémicas como farmacológicas, han sido realizadas en cirugía de resección hepática efectuadas con clampaje continuo de la tríada portal[129,136.139,140,152,153,176,185,186,198-200]. Su efecto en el

caso de cirugías practicadas con oclusión intermitente, tal como se realizó en nuestro estudio, es menos conocido, particularmente el APC.

Para valorar el efecto protector del precondicionamiento contra la lesión hepática por IR en los pacientes de esta tesis, se determinaron parámetros descritos en la literatura y similares a estudios previos[129,139,140,152,154,185-187], pero además analizamos parámetros indicadores de lesión sinusoidal endotelial, lesión histológica y apoptosis celular para completar el estudio del efecto de los dos tipos de precondicionamiento en la lesión hepática por IR en nuestros pacientes.

En el presente trabajo se analizaron parámetros de función y de síntesis hepatocelular, transaminasas e INR ampliamente aceptados como parámetros de evaluación de la lesión del hepatocito secundaria a IR[129,152] y otros marcadores de excreción hepática, como es la bilirrubina, uno de los mejores indicadores de la función hepática posthepatectomía[51].

Determinamos el HA, un parámetro de función sinusoidal. La lesión de las células sinusoidales del endotelio tiene gran relevancia en la lesión hepática por IR[72,208]. El HA es un polisacárido de alto peso molecular presente en el espacio extracelular, sintetizado por las células mesenquimales, que es captado predominantemente por el hígado por las células endoteliales del sinusoide (SCEs) dónde se lleva a cabo principalmente su degradación. Su vida media en el torrente circulatorio es de 2.5 a 5 minutos, por lo que sus niveles en suero reflejan la función de las SCEs, considerándose un buen marcador de la función de estas células[209]. Diferentes trabajos han demostrado la correlación entre la duración del período de isquemia y el grado de lesión endotelial que aparece. Incluso se sugiere que las células endoteliales del sinusoide se lesionan de forma más precoz que las parenquimatosas[208]. El mecanismo que explicaría la alteración de su función durante la isquemia, son los fenómenos de adherencia leucocitaria, la liberación de enzimas proteolíticos por parte de las células kupffer y la dilatación y congestión sinusoidal, que facilitarían la adhesión plaquetaria y la formación de agregados con los neutrófilos activados que actuarían directamente sobre esta línea celular[72].

Al incrementarse los niveles de HA de forma precoz en estudios de trasplante hepático, se ha sugerido como indicador de viabilidad del injerto en la fase de reperfusión[190]. Diferentes estudios correlacionan sus niveles con la severidad de fibrosis hepática en pacientes afectos de hepatopatía cronica[210] y el aumento de los niveles de este parámetro ha sido sugerido como factor pronóstico precoz de funcionalidad hepática postcirugía[188,189,211]. Sin embargo, no existen estudios clínicos previos a esta tesis de la influencia del precondicionamiento en el HA.

Analizamos la lesión histológica definida como la presencia de esteatosis, infiltración leucocitaria, congestión sinusoidal y necrosis[58,106,212]. También evaluamos la presencia de apoptosis, uno de los mecanismos principales de muerte celular en la lesión hepática por IR, mediante la determinación de caspasas en tejido hepático, enzimas consideradas como efectoras principales en este tipo de muerte celular[70,86,105].

Determinamos la expresión tisular de NO, molécula esencial en los mecanismos moleculares e intracelulares presentes tanto en el IPC hepático y cardíaco como en el APC cardíaco[69,141,213-216].

Con los resultados de todas estas determinaciones realizadas en nuestro estudio, consideramos que podemos aportar más información sobre el efecto del IPC y APC en cirugía hepática de resección que los estudios publicados anteriormente en la literatura.

Aunque con las diferentes determinaciones analíticas e histológicas anteriormente descritas obtendríamos una amplia valoración del efecto protector del precondicionamiento en el contexto global de la lesión hepática por IR, es importante correlacionar el efecto clínico de este efecto protector en la posible disminución de las complicaciones postoperatorias y mortalidad de nuestros pacientes. Por ello, para la evaluación clínica del precondicionamiento, al igual que otros autores[154,187,201], analizamos la morbilidad, insuficiencia hepática y mortalidad. Además comparamos entre los diferentes grupos de estudio la supervivencia actuarial anual, para valorar si el precondicionamiento había tenido algún efecto en el pronóstico de los pacientes.

1. Lesión hepatocelular y sinusoidal endotelial

En nuestro estudio, los grupos precondicionados tanto isquémica como anestésicamente no demostraron ningún efecto en la disminución de los niveles de transaminasas durante la primera semana del postoperatorio respecto al grupo control.

Aunque en los trabajos publicados de IPC en cirugía hepática realizada con clampaje intermitente, un estudio experimental en cerdos[217], demostró una mayor tolerancia a la lesión por IR en los animales precondicionados isquémicamente; en el caso de los estudios clínicos publicados, al igual que en el estudio de esta tesis, no se ha podido confirmar dicha protección. Scatton y cols.[218] en un estudio clínico randomizado en resecciones hepáticas mayores con clampaje intermitente, demostraron que el IPC no modificaba ni el incremento de las enzimas hepáticas ni la evolución postoperatoria. Asimismo, en un trabajo reciente donde se evaluaba el efecto del IPC por microdiálisis hepática, Winbladh y cols.[219] demostraron que el IPC previo al clampaje intermitente no influía en el incremento de los enzimas hepáticos ni

en las complicaciones postoperatorias, pero que en los pacientes sometidos a resecciones mayores, el IPC mejoraba el metabolismo de la glucosa reduciendo la acumulación de lactato comparado con los que únicamente eran resecados con oclusión vascular intermitente.

Nuestros resultados demuestran que una hora después del final de la resección, los valores de AST y ALT aumentaron de forma significativa en los tres grupos estudiados, indicando la presencia de lesión hepática debida a la isquemia sometida al hígado durante la transección. Los valores pico fueron a las 6-24 horas de la reperfusión, disminuyendo progresivamente entre el 3º y 7º dia, resultados que coinciden con otras publicaciones en la literatura[220]. Aunque el grupo de precondicionamiento isquémico mostró unos niveles de AST significativamente más elevados a las 6 horas del postoperatorio (P = 0.041), esta diferencia no se observó (P = 0.052) después de ajustar los resultados por posibles factores de confusión que podían modificarlos (edad, niveles basales de AST, ALT, bilirrubina, HA, esteatosis, quimioterapia, tiempo de isquemia total y tipo de resección). En consecuencia, todos los grupos del estudio tuvieron la misma evolución de los niveles de AST y ALT.

No se encontró correlación entre la cinética de los enzimas hepáticos y otros marcadores estructurales y/o funcionales de lesión por IR. Esto cuestiona la sensibilidad de las transaminasas como parámetro para la valoración de la función hepática posterior a cirugía de resección con o sin precondicionamiento.

Al igual que las transaminasas, los valores de bilirrubina e INR sufrieron un incremento significativo a las 24-48 horas de la reperfusión para normalizarse a la semana de la intervención, sin ninguna diferencia entre grupos precondicionados y grupo INT.

Tampoco encontramos diferencias en los niveles de HA entre los grupos. La determinación una hora postresección de los niveles de HA demostró un incremento similar respecto a los niveles basales en los tres grupos de estudio. La aplicación de IPC o APC no mostró ningún efecto en disminuir los niveles del mismo y por tanto en la preservación de la función de las células endoteliales.

Todos nuestros datos confirman la presencia de lesión por IR tanto a nivel hepatocelular como del sinusoide hepático pero sin ningún beneficio con la aplicación de IPC o APC.

Es importante destacar que se observó una correlación lineal entre el pico de bilirrubina durante la primera semana del postoperatorio y los niveles de HA valorados una hora después del final de la resección hepática. Este hallazgo podría ser debido al hecho que la activación de las células Kupffer durante la reperfusión con la consiguiente liberación de mediadores proinflamatorios, podría afectar a la función de

los colangiocitos que ya estaban afectados por la isquemia[221] y adicionalmente causar una alteración en la microcirculación hepática. Esta alteración provocaría una perturbación en el flujo sinusoidal, afectando a la función de las SECs que son las responsables de la eliminación del ácido hialurónico a la circulación. Al considerarse a la bilirrubina como uno de los marcadores principales de insuficiencia hepática posthepatectomía[51] y debido a la correlación encontrada en nuestro estudio con los niveles de HA postresección, consideramos que la evaluación de los niveles de HA inmediatamente posteriores a la resección podría ser un marcador precoz de la lesión por IR hepática y de valor pronóstico para las complicaciones postoperatorias.

2. Lesión histológica y apoptosis celular

La valoración histológica de los pacientes del estudio de esta tesis se realizó mediante microscopía óptica y tinción con hematoxilina-eosina en las muestras de tejido hepático obtenidas a los 60 minutos del final de la resección hepática, antes del cierre de la laparotomía. El objetivo fue valorar si la inducción de precondicionamiento tendría repercusión sobre la lesión histológica que se produciría probablemente, posterior a la lesión por IR secundaria al clampaje vascular. La mayoría de los pacientes presentaron una lesión histológica leve o moderada lo que demuestra la presencia de lesión histológica por IR. La presencia de esteatosis, infiltración leucocitaria y congestión sinusoidal se observó en un 60% de los pacientes sin diferencias entre los tres grupos del estudio. La necrosis, lesión histológica de mayor gravedad, se evidenció únicamente en el 4% de los mismos y de forma similar en los grupos estudiados**.** Este porcentaje bajo de necrosis era de esperar debido al tiempo de isquemia al que habían estado sometido nuestros pacientes, la mayoría inferiores a 60 minutos, y es bien conocido que el porcentaje de necrosis es mayor cuando se supera la hora de isquemia[222]; además la aplicación de la isquemia en nuestro trabajo fue de forma intermitente, en ciclos de 15 minutos de isquemia seguidos de 5 minutos de reperfusión y el clampaje intermitente del hilio hepático ha demostrado provocar una menor gravedad de la lesión por IR respecto al clampaje continuo[34,152].

Al contrario de lo referenciado en la literatura en estudios experimentales[212,223] y algún estudio clínico[186] en el sentido de que de el precondicionamiento tiene un efecto de protección disminuyendo la gravedad de las lesiones histológicas secundarias a lesión por IR; en nuestro estudio no se pudo demostrar un efecto protector del IPC o APC en la disminución de las lesiones histológicas ni en la gravedad de las mismas. Tampoco encontramos ninguna correlación entre la lesión histológica y los otros parámetros estudiados, así como con la incidencia y gravedad de las complicaciones.

Esta diferencia entre nuestros resultados y los de la literatura, especialmente respecto a los estudios experimentales, podría deberse a que al ser el nuestro un estudio clínico no fue factible realizar biopsias hepáticas posteriores a la hora de reperfusión. No podemos descartar unos resultados diferentes si hubiese sido posible obtener tejido posteriormente, ya que aunque la lesión histológica se manifiesta desde la primera hora de la reperfusión, se hace más evidente a medida que aumenta el período de reperfusión. A los 60 minutos ya puede observarse edema o vacuolización celular, congestión sinusoidal, infiltración leucocitaria y algunas áreas de necrosis pero en las 6 y 24 horas siguientes las lesiones se hacen más evidentes e incluso, se ha demostrado correlación con la elevación de las transaminasas[106,212].

Aunque el efecto protector del precondicionamiento en la lesión histológica por IR se evidencia con la disminución general de las lesiones, uno de los mecanismos específicos descritos por los cuáles el precondicionamiento ejerce protección frente a la lesión por IR, es su efecto sobre la infiltración leucocitaria. Diversos estudios[136,212], abogan que el efecto protector principal del precondicionamiento es la disminución de la misma. En nuestro estudio la incidencia de infiltración leucocitaria fue del 64%, sin diferencias entre los grupos precondicionados y el grupo de clampaje intermitente, por lo que no pudimos demostrar la implicación de este mecanismo en el IPC ni en el APC en los pacientes estudiados.

Como en el hígado isquémico, según la literatura[70,86,105], la efectora principal de la vía apoptoica es la caspasa 3, en el estudio de esta tesis utilizamos la determinación enzimática por inmunofluorescencia de la actividad de caspasa 3 en tejido hepático para determinar el grado de apoptosis de los pacientes; y poder valorar de manera más sensible uno de los mecanismos principales implicados en la muerte celular debida a lesión por IR.

Aunque recientes publicaciones sugieren que la muerte celular que sigue a la lesión hepática por IR se produce por un mecanismo conjunto de necrosis y apoptosis, denominado necroapoptosis[100], existen evidencias científicas de que la apoptosis o muerte celular programada es el mecanismo central en la fase precoz de esta lesión implicando predominantemente vías de señalización caspasa-dependientes[70,86,105,224]. Esto es especialmente relevante en hígados no esteatósicos[195] como sucede en nuestro estudio, en el que únicamente el 25% de los pacientes presentaban una esteatosis preoperatoria leve-moderada. Asimismo, dependiendo de la duración del tiempo de isquemia, se observa muerte celular por apoptosis o necrosis, de tal forma que hay estudios[100,222] que apuntan que si estos son inferiores a 60-90 minutos se produce apoptosis y si son superiores, la muerte celular predominante es por necrosis. En nuestro trabajo el tiempo medio de isquemia fue de 60 minutos, por lo que la

apoptosis tendría que ser el mecanismo predominante de muerte celular. De la misma manera, el tiempo postreperfusión también influye en la determinación de la actividad de las caspasas; de tal forma que después de 60-120 minutos de la reperfusión se observa un incremento en su actividad, en cambio si la determinación se realiza a las 24 horas, la necrosis celular vuelve a ser predominante[106]. Las biopsias hepáticas para la determinación de actividad de caspasa 3 se realizaron a los 60 minutos de la resección hepática en todos los pacientes de nuestro estudio. Por lo tanto, habiendo transcurrido una hora después de la reperfusión, se esperaría observar un incremento de la actividad de la caspasa 3 que indicaría muerte celular por apoptosis

En esta tesis, las biopsias del hígado remanente obtenidas una hora post-resección revelaron la presencia de células positivas con actividad de caspasa 3, lo que demuestra la presencia de apoptosis secundaria a lesión por IR en los pacientes del estudio. A pesar de un tiempo de isquemia medio de 60 minutos, la ausencia de un grado significativo de apoptosis se observó en un 60% de los pacientes en los *tres* grupos del estudio y el índice apoptoico fue del 38% en todos ellos. Además al relacionar el grado de apoptosis con otros parámetros de lesión hepática por IR en los pacientes de este trabajo, no encontramos correlación de la apoptosis con ninguna de las variables biológicas ni clínicas estudiadas. Diversos publicaciones sugieren que los nucleosomas apoptoicos aumentan progresivamente desde los 30 minutos postreperfusión, con un máximo a las dos horas[222,225,226], aunque otros estudios, como el de Cursio y cols[224] demostraron el incremento de la actividad de la caspasa 3 a las 3 y 6 horas postreperfusión y con un tiempo de isquemia de 120 minutos. Al ser un estudio clínico, en nuestro trabajo no pudimos realizar determinaciones de caspasas posteriores a la hora postreperfusión, por lo que no pudimos valorar la evolución de las mismas. Al igual que en la lesión histológica, no podemos descartar que con el tiempo se produjera una mayor incidencia de apoptosis en los pacientes si se hubiesen realizado biopsias posteriores.

Aunque se ha sugerido la disminución de la apoptosis como mecanismo protector tanto del IPC como del APC en estudios experimentales[227,228] y algunos clínicos (Clavien, Arkadopuolos)[129,140], nuestro estudio al igual que otros (Domart)[186] no ha podido demostrar ningún efecto beneficioso. Tanto en los trabajos de Clavien[129] y cols como en el de Arkadopuolos y cols[140], la valoración de la apoptosis se realizó por el método TUNEL(TdT-mediated d UTP-biotin Nick end-labeling), método directo para la detección de las células apoptoicas. Sin embargo, en el estudio de Clavien[129], a pesar de que demostraron una disminución del número de cuerpos apoptoicos de células sinusoidales en los pacientes a los que se había realizado IPC, no observaron diferencias significativas de los niveles de actividad caspasas 3 y 8 entre los pacientes

precondicionados y el grupo control. El trabajo de Domart y cols[186] se realizó en pacientes que habían recibido tratamiento con quimioterapia previo a la cirugía, y a pesar de valorar la apoptosis tanto por el método TUNEL como por determinación de caspasas no demostraron ninguna protección en los pacientes precondicionados isquémicamente. A destacar que un 70% de los pacientes de nuestro estudio habían recibido quimioterapia adyuvante. En nuestro trabajo no se determinó la apoptosis por el método TUNEL por no poder disponer de esta técnica, evaluando únicamente la apoptosis de forma indirecta mediante la determinación de la actividad de caspasa 3.

3. Expresión tisular de NO

Aunque los mecanismos de protección del precondicionamiento en los hepatocitos frente a la lesión por IR no son del todo conocidos y diversas vías de señalización celular están implicadas, el NO es un modulador bien establecido en la función mitocondrial y ha sido involucrado en las diferentes vías de señalización intracelular tanto en el IPC hepático y cardíaco como en el APC cardíaco[69,141,213-216]. El NO es una molécula particularmente difícil de determinar debido a que es un radical libre, de características gaseosas que tiene una vida media muy corta, por lo que existen muy pocas técnicas realmente sensibles y especificas capaces de su determinación[229]. Los diferentes estudios referenciados en la literatura en lesión por IR valoran el NO mediante técnicas indirectas determinando la actividad del enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) o productos de su metabolismo como niveles de nitratos o nitritos[95,230,231]. En este trabajo determinamos la expresión tisular de la forma inducible de la enzima NOS (iNOS), fuente importante de NO en los procesos patológicos, para evaluar su implicación en los diferentes tipos de precondicionamiento.

En nuestro estudio no encontramos modificación en la expresión tisular de iNOS respecto al basal en ninguno de los pacientes al finalizar la resección hepática. Por lo tanto no pudimos demostrar la implicación de la iNOS en el IPC ni el APC.

A pesar de que está ampliamente referenciado que el NO juega un papel crucial en la lesión hepática por IR, su actividad dual está bien documentada, de tal manera que dependiendo de la temporalidad, cantidad y procedencia su efecto puede ser protector o lesivo[69,94,232]. En el hígado el radical NO es generado por la forma endotelial de la NOS (eNOS) o por la iNOS. El NO generado de la eNOS, aunque se produce en cantidades poco importantes, mantiene la microcirculación hepática y la integridad endotelial como protección ante la lesión por IR[90,230]. Sin embargo, existe cierta controversia sobre si la producción de NO vía iNOS, que bajo condiciones patológicas como la lesión por IR produce NO en grandes cantidades y que se inicia a la primera hora postreperfusión incrementándose hasta la 5 hora[93], tiene un efecto

beneficioso o perjudicial. El exceso de producción de NO contribuiría a la disfunción celular hepática o a la citoprotección dependiendo del tipo de insulto, la causa y la cantidad producida y del estado de oxidación celular hepático. De esta manera, el NO que proviene de la vía de la iNOS puede causar un daño oxidativo debido a la producción de radicales como el peroxinitrito, pero puede promover la citoprotección disminuyendo la adhesión e infiltración leucocitaria[92].

No se conoce con exactitud en que momento estas dos formas de la enzima NOS ejercen su acción, así como el mecanismo molecular específicamente involucrado. En estudios experimentales de trasplante hepático, tanto el NO derivado de la iNOS como de la eNOS, han demostrado disminuir la moléculas de adhesión, disminuyendo la activación y acumulación de neutrófilos, dependiendo del tiempo de isquemia, tiempo de reperfusión y modelo experimental[95,233].

Diversos estudios en IPC cardíaco demuestran la implicación de la iNOS en la protección frente a IR, especialmente en la fase tardía del mismo[234,235]. Así Wang y cols[235] en su estudio experimental en cardiomiocitos, demuestran un incremento desde la primera hora de la reperfusión de los niveles de iNOS en los animales precondicionados con un pico a las 3 horas y persistiendo hasta las 24 horas sin implicación de la eNOS. Estos autores apuntan que el incremento de la iNOS es leve comparado con el que sucede postisquemia prolongada y que se expresa en diferentes líneas celulares, explicando así el efecto perjudicial de la iNOS que se observa en algunos estados inflamatorios, como la lesión por IR y que no se produce después del precondicionamiento. Otros estudios referenciados en la literatura[119] sugieren la hipótesis que el NO tiene un papel doble en la protección del precondicionamiento, se incrementa su síntesis al inicio vía eNOS y también modula la protección tardía a través de la vía de la iNOS.

En el contexto del IPC a nivel hepático, la evidencia es limitada y contradictoria en cuanto a la acción del NO derivado tanto de la eNOS como de la iNOS. Algunos estudios experimentales demostraron un incremento de la expresión de la eNOS en los animales precondicionados[213,236] mientras que dos estudios, uno clínico en donantes vivos en trasplante hepático y otro experimental demostraron un incremento de la expresión del iNOS con el IPC[237,238].

Referente al APC cardíaco, los resultados en la evaluación de la implicación de la eNOS y iNOS también son contradictorios[213-216]. Estudios recientes[214,215] sugieren que tiene lugar una protección precoz debida al NO derivado de la eNOS y una tardía por el derivado de la iNOS.

El único estudio de APC en cirugía hepática de resección[176] realizado con clampaje continuo mostró un aumento significativo de los niveles de iNOS al final de la

cirugía en los pacientes precondicionados con sevoflorane. Sin embargo, los resultados de esta tesis no confirman este hecho ya que la expresión tisular de la iNOS no se modificó en ninguno de los tres grupos de nuestro estudio.

Recientemente se han correlacionado los niveles de metabolitos de oxidación del NO, nitritos, con su efecto protector[94,231] y parece evidente la implicación del NO derivado de la eNOS en la fase precoz del precondicionamiento. Por tanto podríamos sugerir que la determinación de eNOS o nitritos quizás habrían dado más información para evaluar la implicación del NO en el IPC y APC en la cirugía hepática de resección, además de la determinación de la iNOS, cuyo aumento se produciría probablemente en un período posterior.

4. Hemodinamia y complicaciones intraoperatorias

Aunque el comportamiento hemodinámico de los pacientes durante la cirugía no era el objetivo del estudio de esta tesis, consideramos importante su análisis debido a la implicación que podían tener los diferentes cambios en el mismo sobre el flujo hepático y por tanto su influencia en la lesión hepática por IR. Del mismo modo, evaluamos las complicaciones intraoperatorias, especialmente las relacionadas con la hemorragia durante la resección, factor clave en la evolución posterior de los pacientes sometidos a este tipo de cirugía[31,45].

Debido a los cambios hemodinámicos sistémicos que se producen en las diferentes maniobras durante la cirugía (la compresión directa y la movilización del hígado pueden comprimir la vena cava retrohepática, clampajes y desclampajes de la tríada portal, hemorragia) se requiere una monitorización hemodinámica específica. Ésta ha de permitir un diagnóstico preciso y una actuación inmediata que en muchos casos comportará la administración de drogas vasoactivas. Por ello en todos los pacientes, además de la monitorización básica, se monitorizó la presión arterial invasiva, la presión venosa central (PVC) y el índice cardíaco (IC). En los últimos años, para las mediciones de gasto cardíaco continuo se están empezando a utilizar técnicas no invasivas que eviten la iatrogenia secundaria a la colocación de catéteres de Swan-Ganz[239]. En el presente trabajo, el IC fue obtenido de forma no invasiva mediante el análisis morfológico de la curva velocidad/tiempo del flujo sanguíneo en la aorta descendente obtenida mediante la colocación de una sonda doppler a nivel esofágico. (CardioQ, Deltex Medical). Con los datos obtenidos de esta monitorización específica pudimos valorar con exactitud el estado hemodinámico de nuestros pacientes y descartamos que las alteraciones de la función hepática pudieran estar influidas por los cambios hemodinámicos. Los parámetros hemodinámicos basales fueron similares en los tres grupos del estudio, así como su evolución durante las

diferentes fases de la cirugía, sin diferencias significativas entre grupos. Por ello consideramos que los cambios hemodinámicos producidos durante la cirugía no influyeron en la valoración de los resultados del efecto del IPC o APC.

El principal efecto hemodinámico del clampaje del hilio hepático es una disminución del 10 al 20% del retorno venoso y consecuentemente del gasto cardiaco. Ello provoca una rápida respuesta vasopresora, con un aumento de las resistencias vasculares periféricas del 40% y de la presión arterial media del 20%. La respuesta adrenérgica es muy rápida y una vez retirado el pinzamiento vascular se restablecen las alteraciones hemodinámicas. Sin embargo, la respuesta de adaptación hemodinámica puede empeorar con sucesivos pinzamientos, de modo que la presión arterial media no se recupera[240]. Debido a ello, un porcentaje elevado de pacientes precisan de soporte vasoactivo. A pesar de la exclusión vascular, el riesgo de sangrado de la superficie de resección persiste ya que las venas hepáticas no están ocluidas y como son extremadamente cortas (1cm), la presión existente en la vena cava suprahepática provoca un flujo sanguíneo retrógrado. Como la presión en la vena cava está directamente relacionada con la presión en el sinusoide hepático[42], es necesario mantener la PVC por debajo de 5 mmHg durante la cirugía. La influencia de este parámetro en la disminución del sangrado durante la transección hepática ha sido demostrada en diversos estudios[40-44].

Analizando nuestros datos pudimos constatar que el comportamiento hemodinámico de los pacientes fue el habitual en este tipo de cirugía: la presión arterial media experimentó un aumento en todos los pacientes durante las diferentes maniobras de Pringle y un descenso durante los desclampajes de la tríada portal. La frecuencia cardíaca aumentó ligeramente durante la transección recuperando su valor previo con cada desclampaje del hilio hepático. Durante el pinzamiento vascular, el IC disminuyó y se produjo un aumento del IRVS, recuperando ambos los valores basales tras los desclampajes. A medida que aumentaron el número de pinzamientos del pedículo hepático, las variaciones hemodinámicas fueron más pronunciadas y su recuperación más lenta, por lo que fue necesario la administración de drogas vasoactivas. Este comportamiento es similar a las publicaciones previas[240].

La incidencia de hipertensión arterial (29.2%), taquicardia (23.6%), disminución del índice cardíaco (19.8%) e hipotensión (17,9%) fueron las complicaciones más frecuentes, aunque sin diferencias entre grupos. La necesidad de administración de noradrenalina fue de un 6.6%, similar en los tres grupos del estudio. Todas estas alteraciones hemodinámicas son inherentes a la realización de la maniobras de oclusión vascular y a la liberación de substancias vasodilatadoras como la adenosina o prostaglandinas que pasan a la circulación sistémica durante la reperfusión, cuando

se libera el pinzamiento del hilio hepático[240,241]. Otras complicaciones intraoperatorias que se resolvieron sin consecuencias fueron bradicardia (5.6%), Broncoespasmo (1.8%) y neumotórax (1.8%). La incidencia de hemorragia intraoperatoria fue del 4.7%, precisando de transfusión de hematíes en el 5% de los pacientes en los tres grupos de estudio y no difiere de otros trabajos en cirugía de resección hepática[45,187]. Debido a que las complicaciones intraoperatorias y su gravedad no mostraron diferencias entre los grupos precondicionados y el grupo control, descartamos que la presencia de las mismas afectara a la valoración de la influencia del efecto de ambos tipos de precondicionamiento en la lesión hepática por IR.

Aunque se han publicado estudios clínicos que demuestran una mayor estabilidad hemodinámica del IPC frente al clampaje intermitente del hilio hepático como el de Chouker y cols[240], en el presente estudio, no pudimos demostrar ningún efecto de los diferentes tipos de precondicionamiento ni sobre el comportamiento hemodinámico ni sobre las complicaciones intraoperatorias.

5. Evolución postoperatoria

La evolución postoperatoria de los pacientes a los que se les realiza una resección hepática con oclusión vascular está marcada específicamente por la disfunción postoperatoria del hígado remanente que ha estado sometido a la lesión por IR. El efecto protector del precondicionamiento ante esta lesión podría disminuir la gravedad de la misma, condicionando una menor incidencia de insuficiencia hepática postoperatoria, disminuyendo las complicaciones y mejorando el pronóstico de los pacientes.

Para constatar el efecto protector a nivel clínico de los dos tipos de precondicionamiento, IPC y APC, evaluamos la morbilidad determinando la incidencia y gravedad de las complicaciones postoperatorias, la mortalidad en los 30 días posteriores a la intervención quirúrgica, los días de ingresos en las unidades de semicríticos y UCI y el tiempo de estancia hospitalaria. Los diferentes estudios clínicos referenciados en la literatura sobre IPC y APC en cirugía hepática de resección analizan las mismas variables para demostrar la relevancia clínica del precondicionamiento[154,176,187].

Debido a las particularidades de la cirugía de resección hepática, en el análisis de las complicaciones de los pacientes de esta tesis, se han utilizado dos escalas de valoración aceptadas. Las complicaciones quirúrgicas se evaluaron según la clasificación Clavien-Dindo[181] y el grado de insuficiencia hepática postoperatoria según la reciente clasificación del Grupo de Estudio Internacional de Cirugía Hepática (ISGLS)[51]. En la valoración de las complicaciones generales en cirugía hepática, como

toda cirugía abdominal mayor, la clasificación del grupo de Clavien ha sido la más utilizada y aceptada por todos los grupos quirúrgicos.

En el contexto de la evaluación de la insuficiencia hepática posthepatectomía (PHLF), que ha demostrado ser la principal causa de mortalidad en esta cirugía[45-47], no existe una definición estandarizada que permita la comparación de los resultados de los estudios publicados. Algunos trabajos definen la PHLF de una forma cualitativa, incluyendo síntomas de disfunción hepática: coagulopatía, ascitis, hiperbilirrubinemia o encefalopatía. La mayoría de los estudios[45,53,55] combinan parámetros clínicos de disfunción hepática con alteración de los valores de bilirrubina e INR en el postoperatorio. En cuanto a los factores predictores de mortalidad, también se encuentra disparidad en los diferentes estudios. Hay trabajos[49] que consideran un valor pico de bilirrubina por encima de 7 mg/dL en el postoperatorio, como predictor de mortalidad en pacientes intervenidos de hepatectomía mayor. Balzac y cols[50], en un estudio de 704 pacientes intervenidos de resección hepática, consideran que un INR <50% y un valor de bilirrubina >50μmol/L (2.9mgr/dL) en el 5º día postoperatorio, es indicador de mal pronóstico y mayor mortalidad. Así, la incidencia descrita en la literatura de la PHLF varía de 0 a 32%[51,54] según la población implicada, el tipo de resección realizada y los parámetros de valoración utilizados. Si se dejan los extremos fuera de consideración la incidencia varía entre 0.7 a 9.1%[53].

El Grupo ISGLS, en el 2011, publicó un consenso donde definía la PHLF, como el deterioro postoperatorio adquirido de la habilidad del hígado remanente para mantener las funciones de síntesis, excreción y eliminación de tóxicos, las cuáles se caracterizaban por un incremento del INR y bilirrubina a partir del quinto día del postoperatorio. Además, este mismo grupo estableció unos grados de PHLF para valorar la severidad de dicha insuficiencia hepática(Tabla 1). Así, los pacientes con grado A, únicamente presentan alteraciones en los parámetros de laboratorio sin síntomas clínicos; los diagnosticados de grado B, presentan además, manifestaciones clínicas de insuficiencia hepática necesitando tratamiento no invasivo (PFC, albúmina, diuréticos, ventilación no invasiva) y generalmente cuidados intermedios o UCI; en el grado C, es necesario el ingreso en UCI y medidas invasivas para el tratamiento de los pacientes, entre ellas, intubación y ventilación mecánica, hemodiálisis, soporte vasoactivo, soporte hepático extracorpóreo o incluso trasplante hepático. La mortalidad en estos casos es de aproximadamente un 50%, generalmente por sepsis y fallo multiorgánico. En el estudio de esta tesis, utilizamos esta clasificación para definir los grados de PHLF de nuestros pacientes por considerarla la más completa.

Los pacientes presentaron un 40% de complicaciones leves, las más frecuentes las relacionadas con la alteración transitoria de la función hepática (bilirrubina e INR),

ascitis y encefalopatía leve, todo ello relacionado con una insuficiencia hepática leve posthepatectomía (PHLF A) que no necesitó ningún tratamiento específico y que no aumentó los días de ingreso hospitalario. Un 3,7% de los pacientes presentaron una insuficiencia hepática moderada (PHLF B) que se resolvió con tratamiento conservador aunque precisando más días de ingreso en la unidad de semicríticos. Estos resultados concuerdan con los publicados en pacientes no cirróticos[30,49,50,152,176,199]. A pesar de que diversos estudios consideran al derrame pleural una complicación frecuente[242], sobretodo en la hepatectomía derecha, nosotros sólo diagnosticamos tres casos; esto podría ser debido a que en la mayoría de las ocasiones, esta entidad es asintomática y no se realiza, a excepción de sintomatología respiratoria, una radiografía de tórax posterior al primer día del postoperatorio. La incidencia de fístula biliar en las diferentes series varía de un 4 a un 10%[243]. En nuestro estudio, un 6.6% de los pacientes presentó fuga biliar, pero únicamente uno de ellos precisó drenaje percutáneo. Aunque se realizó transfusión de concentrados de hematíes a tres pacientes en el postoperatorio inmediato por hemoglobinas inferiores a 8 mg/dl, no fue necesaria ninguna reintervención por hemorragia aguda. La incidencia de complicaciones graves (III,IV,V) fue de un 7.5% en el estudio de esta tesis, cifras similares a las publicadas en la literatura[30,49,50,152,176,199]. Se realizó una única reintervención quirúrgica y ésta se debió a isquemia cutánea de una parte de la incisión quirúrgica e infección de la misma, siendo la evolución posterior satisfactoria.

La tasa de mortalidad en esta cirugía oscila entre el 0-5%[45,47,55,244]. En nuestro estudio, un paciente del grupo sin precondicionamiento sometido a una resección hepática mayor, hepatectomía derecha extendida, falleció a los 20 días del postoperatorio, por insuficiencia hepática grave (PHLF C), sepsis y fallo multiorgánico. En este paciente, la primera intención quirúrgica era una hepatectomía derecha, por lo que no se había realizado volumetría previa a la cirugía. Durante la misma, al realizar la ecografía intraoperatoria se observaron más lesiones que las diagnosticadas preoperatoriamente, por lo que se efectuó una hepatectomía derecha extendida. En el curso postoperatorio, presentó hiperbilirrubinemia progresiva, incremento del INR, ascitis y encefalopatía refractarios al tratamiento. Posteriormente, estando ingresado en UCI, fue diagnosticado de neumonía bilateral que evolucionó a shock séptico con fallo multiorgánico y muerte. El diagnóstico diferencial orientó a insuficiencia hepática postoperatoria por “small for size síndrome”(SFSS) debido a un hígado remanente insuficiente por la gran resección hepática realizada. El SFSS fue descrito primeramente en el contexto del trasplante hepático de donante vivo[245] y es debido a un hiperaflujo sanguíneo del hígado remanente que causa dilatación sinusoidal,

infiltración hemorrágica, necrosis centrolobular, colostasis prolongada, déficit de la función de síntesis e inhibición de la proliferación celular. Actualmente se considera que el mecanismo fisiopatológico del SFSS y la PHLF es similar[246]. El mínimo volumen de hígado remanente que se considera seguro para una resección en hígado sano es de 20%-30% y en hígado esteatósico, cirrótico o colostásico es necesario un 30-40%[54]. Aunque no contábamos con volumetría previa de nuestro paciente, por la clínica, datos de laboratorio y evolución en el contexto de una gran resección en paciente con quimioterapia previa, el diagnóstico de SFSS o PHLF es el más probable.

En el estudio de esta tesis no se observó ninguna diferencia en la evolución postoperatoria en los grupos precondicionados, ni en la incidencia y severidad de complicaciones, días de ingreso en semicríticos o UCI y estancia hospitalaria, por lo que no pudimos comprobar ningún beneficio clínico en los dos tipos de precondicionamiento evaluados. Aunque algunos estudios clínicos en IPC y APC en cirugía hepática realizada con clampaje continuo del hilio hepático[153,176] demuestran un beneficio de los grupos precondicionados en la incidencia y severidad de las complicaciones postoperatorias, la mayoría de los trabajos de precondicionamiento tanto en clampaje continuo como intermitente, no obtienen ningún resultado clínicamente relevante[154,187,218,219].

Para valorar la influencia del precondicionamiento en el pronóstico a largo plazo de los pacientes de nuestro estudio, analizamos la supervivencia actuarial al año de la intervención en los tres grupos. La supervivencia actuarial anual calculada fue del 95,2% sin diferencias entre grupos, cifras similares a otros estudios de supervivencia en metástasis hepáticas de cáncer colorrectal[247]. La aplicación de IPC o APC en nuestras condiciones de estudio no influyó en el pronóstico a largo plazo de los pacientes.

6. Influencia del precondicionamiento según el tamaño de resección

El tamaño de la resección y por tanto el volumen del hígado remanente está relacionado con una mayor gravedad de la lesión hepática por IR[45,54]. Debido al diferente comportamiento tanto biológico como clínico de las hepatectomías menores y mayores, con mayor alteración de la función hepática y severidad de las complicaciones en estas últimas[49], se estratificaron los pacientes según el tamaño de resección hepática realizada para evaluar la influencia de los diferentes tipos de precondicionamiento. No pudimos demostrar ningún efecto protector del IPC o APC ni en las hepatectomías mayores ni en las menores. Tanto en los pacientes sometidos a resecciones mayores como a resecciones menores, los grupos precondicionados no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los del grupo sin

precondicionamiento en los parámetros bioquímicos, histológicos o clínicos evaluados. Las referencias en la literatura son contradictorias en la influencia del precondicionamiento según el tamaño de resección, mientras hay estudios que demuestran únicamente el efecto protector del IPC en las resecciones hepáticas inferiores al 50%[152], otros trabajos demuestran protección en las resecciones mayores[129,199].

El estudio realizado para la elaboración de esta tesis doctoral tiene una serie de limitaciones inherentes a un estudio clínico de este tipo. Estas limitaciones se han ido comentando a lo largo de la discusión. No fue posible valorar la lesión histológica, apoptosis o la iNOS posteriormente a la hora posthepatectomía, a diferencia de las otras variables analizadas y por lo tanto poder obtener más información sobre estos parámetros. Otra limitación es la imposibilidad de inhibir o activar los mecanismos involucrados en la modulación de la protección anestésica para valorar si el mecanismo está o no implicado. Además, todos los agentes anestésicos (halogenados, endovenosos y locales) tienen unos efectos similares en cuanto a la modulación de la respuesta inflamatoria inhibiendo o regulando la producción de óxido nítrico y no podemos descartar que la anestesia en sí misma sea un "precondicionamiento".

A pesar de estas limitaciones que hemos tenido en cuenta al valorar los resultados, la aportación de esta tesis es importante para establecer que el clampaje vascular intermitente es una técnica de precondicionamiento de igual impacto sobre la lesión de IR que las hasta ahora aplicadas en clínica humana. También ha aportado la identificación de la importancia y utilidad de un parámetro, el ácido hialurónico, que permite determinar de forma precoz el sufrimiento del sinusoide, punto clave en la lesión hepática por IR. Este marcador podría predecir qué pacientes tendrán un mayor riesgo de desarrollar una disfunción hepática grave posthepatectomía y facilitar el tratamiento precoz sin esperar al incremento de la bilirrubina.

Los resultados de esta tesis plantean la necesidad de realizar estudios randomizados para valorar el factor predictivo del ácido hialurónico. La identificación de valores de incremento del mismo capaces de predecir el riesgo de insuficiencia hepática con alta sensibilidad y especificidad, permitiría identificar qué pacientes precisarían tratamiento de modulación del flujo postresección o medidas alternativas encaminadas a prevenir la insuficiencia hepática postoperatoria.

Finalmente, ante los resultados obtenidos y utilizando una aproximación celular, pues en esta tesis se ha abordado la influencia del precondicionamiento en la

lesión hepática por IR desde todos los puntos clave de su fisiopatología, podemos plantear la hipótesis de que la anestesia en sí misma se comporta como un precondicionamiento farmacológico y la maniobra de Pringle intermitente como un precondicionamiento isquémico. De tal forma que ante la realización de una resección hepática con clampaje intermitente del hilio hepático no se precisa añadir ninguna otra técnica de precondicionamiento. Sería interesante realizar nuevos estudios para evaluar el posible efecto protector del IPC en cirugías en las que el clampaje intermitente no está indicado de primera elección y que pueden precisar clampajes continuos de larga duración, como es el caso de las resecciones hepáticas mayores o de gran dificultad quirúrgica realizadas por laparoscopia. Así como en las hepatectomías efectuadas en pacientes de alto riesgo como son los pacientes cirróticos o con alto grado de esteatosis, en los cuáles la dificultad quirúrgica es mayor y comporta una importante morbimortalidad.

8. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos marcados, las principales conclusiones de esta Tesis son:

1. La lesión por IR se manifestó en todos los pacientes de este estudio en mayor o menor grado. Esto se demostró por la alteración en los parámetros que valoran las funciones hepatocelular, sinusoidal y por la presencia de lesión histológica y apoptosis.

2. La función sinusoidal se correlacionó con el grado de disfunción hepatocelular.

3. Los cambios histológicos fueron de grado leve o moderado y la presencia de apoptosis celular se observó en el 40% de la población del estudio.

4. No se evidenció correlación entre la lesión histológica y/o apoptosis con el grado de disfunción hepatocelular.

5. El precondicionamiento isquémico o anestésico no demostró influencia en la intensidad de la alteración de los parámetros que evalúan la función hepatocelular y/o sinusoidal, en el grado de lesión histológica, ni en el índice de apoptosis celular.

6. El precondicionamiento isquémico o anestésico no modificó los niveles tisulares de la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa.

7. El precondicionamiento isquémico o anestésico no mostró ningún efecto en la evolución postoperatoria ni en la supervivencia al año de la cirugía.

8. El tamaño de la resección no influyó en el efecto del precondicionamiento.

9. Por todo ello, durante la resección hepática realizada con clampaje intermitente del hilio hepático, el precondicionamiento isquémico o anestésico con sevoflorane no produce ningún tipo de protección frente a la lesión hepática por isquemia-reperfusión .

9.BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Ibrahim S, Chen CL, Wang SH, Lin CC, Yang CH, Yong CC, et al. Liver resection for benign liver tumors: indications and outcome. Am J Surg. 2007 Jan;193(1):5–9.

2. Tsim NC, Frampton AE, Habib NA, Jiao LR. Surgical treatment for liver cancer. World J Gastroenterol. 2010 Feb;16(8):927–33.

3. Olnes MJ, Erlich R. A review and update on cholangiocarcinoma. Oncology.2004 Jun;66:167–179.

4. DiSibio G, French SW. Metastatic patterns of cancers : Results from a large autopsy study. Arch Pathol Lab Med. 2008 Jun;132(6):931–9.

5. Rees M, Tekkis PP, Welsh FKS, O'Rourke T, John TG. Evaluation of long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: a multifactorial model of 929 patients. Ann Surg. 2008 Jan;247(1):125–35.

6. Lee YT. Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. J Surg Oncol. 1983 Jul;23(3):175–80.

7. Kagohashi K, Satoh H, Ishikawa H, Ohtsuka M, Sekizawa K. Liver metastasis at the time of initial diagnosis of lung cancer. Med Oncol. 2003 Mar;20(1):25–8.

8. Basuroy R, Srirajaskanthan R, Ramage JK. A multimodal approach to the management of neuroendocrine tumour liver metastases. Int J Hepatol 2012 Feb;2012:819193.

9. Parkin DM, Bray F, FerlayJ,Pisani P. Global cancer statistics,2002. CA Cancer J Clin. 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.

10. Alkofer B, Lepennec V, Chiche L. Hepatocellular cancer in the non-cirrhotic liver. J Visc Surg. 2011 Feb;148(1):3–11.

11. Andreou A, Vauthey JN, Cherqui D, Zimmitti G, Ribero D, Truty MJ, et al. Improved Long-Term Survival after Major Resection for Hepatocellular Carcinoma: A Multicenter Analysis Based on a New Definition of Major Hepatectomy. J Gastrointest Surg. 2013 Jan;17(1):66–77.

12. Paquet KJ, Gad HA, Lazar A, Koussouris P, Mercado MA, Heine WD, et al. Analysis of factors affecting outcome after hepatectomy of patients with liver cirrhosis and small hepatocellular carcinoma. Eur J Surg. 1998 Jul;164(7):513–9.

13. Ng KK, Vauthey J-N, Pawlik TM, Lauwers GY, Regimbeau J-M, Belghiti J, et al. Is hepatic resection for large or multinodular hepatocellular carcinoma justified? Results from a multi-institutional database. Ann Surg Oncol. 2005 May;12(5):364–73.

14. Ellis MC, Cassera MA, Vetto JT, Orloff SL, Hansen PD, Billingsley KG. Surgical treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma: Outcomes and predictive factors. HPB. 2011 Jan;13(1):59–63.

15. Pachera S, Nishio H, Takahashi Y, Yokoyama Y, Oda K, Ebata T, et al. Undifferentiated embryonal sarcoma of the liver: Case report and literature survey. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2008 Oct;15(5):536–44.

16. Grotz TE, Nagorney D, Donohue J, Que F, Kendrick M, Farnell M, et al. Hepatic epithelioid haemangioendothelioma: is transplantation the only treatment option? HPB 2010 Oct;12(8):546–53.

17. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. Ann Surg 1999 Sep ;230(3):309–21.

18. Khatri VP, Petrelli NJ, Belghiti J. Extending the frontiers of surgical therapy for hepatic colorectal metastases: is there a limit? J Clin Oncol. 2005 Nov 20 23(33):8490–9.

19. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.

20. Byam J, Reuter NP, Woodall CE, Scoggins CR, McMasters KM, Martin RCG. Should hepatic metastatic colorectal cancer patients with extrahepatic disease undergo liver resection/ablation? Ann Surg Oncol. 2009 Nov;16(11):3064–9.

21. Simmonds PC, Primrose JN, Colquitt JL, Garden OJ, Poston GJ, Rees M. Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: a systematic review of published studies. Br J Cancer. 2006 Apr;94(7):982–99.

22. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, et al. One hundred years after “carcinoid”: Epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. J Clin Oncol. 2008 Jun;26(18):3063–72.

23. Gomez D, Malik HZ, Al-Mukthar A, Menon K V, Toogood GJ, Lodge JPA, et al. Hepatic resection for metastatic gastrointestinal and pancreatic neuroendocrine tumours: outcome and prognostic predictors. HPB. 2007 Jun;9(5):345–51.

24. Ercolani G, Grazi GL, Ravaioli M, Ramacciato G, Cescon M, Varotti G, et al. The role of liver resections for noncolorectal, nonneuroendocrine metastases: experience with 142 observed cases. Ann Surg Oncol. 2005 Jun;12(6):459–66.

25. Couniaud. Le foie. Études anatomiques et chirurgicales. Paris: Masson; 1957.

26. Brunicardi FC, Andersen DK BT. Schwartz’s principles of surgery. 9th edition. New York: McGraw-Hill ; 2010. p. 31–3.

27. Pang YY. The Brisbane 2000 terminology of liver anatomy and resections. HPB 2000; 2:333-39. HPB. 2002 Jan;4(2):99–100.

28. Strasberg SM. Nomenclature of hepatic anatomy and resections: a review of the Brisbane 2000 system. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2005 Oct;12(5):351–5.

29. Rosen CB, Nagorney DM, Taswell HF, Helgeson SL, Ilstrup DM, van Heerden JA, et al. Perioperative blood transfusion and determinants of survival after liver resection for metastatic colorectal carcinoma. Ann Surg. 1992 Oct ;216(4):493–505.

30. Rahbari NN, Reissfelder C, Koch M, Elbers H, Striebel F, Buchler MW, et al. The predictive value of postoperative clinical risk scores for outcome after hepatic resection: a validation analysis in 807 patients. Ann Surg Oncol. 2011 Dec;18(13):3640–9.

31. Alkozai EM, Lisman T, Porte RJ. Bleeding in Liver Surgery: Prevention and Treatment. Clinics in Liver Disease. 2009 Feb;13(1):145-54.

32. Pringle JH. V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. Ann Surg . 1908 Oct ;48(4):541–9.

33. Buell JF, Koffron A, Yoshida A, Hanaway M, Lo A, Layman R, et al. Is any method of vascular control superior in hepatic resection of metastatic cancers? Longmire clamping, pringle maneuver, and total vascular isolation. Arch Surg. 2001 May ;136(5):569–75.

34. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, et al. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. Ann Surg 1999 Mar;229(3):369–75.

35. Delva E, Camus Y, Nordlinger B, Hannoun L, Parc R, Deriaz H, et al. Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic ischemia: 142 cases. Ann Surg. 1989 Feb;209(2):211–8.

36. Makuuchi M, Mori T, Gunvén P, Yamazaki S, Hasegawa H. Safety of hemihepatic vascular occlusion during resection of the liver. Surg Gynecol Obstet. 1987 Feb;164(2):155–8.

37. Page AJ, Kooby DA. Perioperative management of hepatic resection. J Gastrointest Oncol. Department of Surgery, Emory University, Atlanta, Georgia, USA.; 2012 Mar;3(1):19–27.

38. Heaney JP, Stanton WK, Halbert DS, Seidel J, Vice T. An improved technic for vascular isolation of the liver: experimental study and case reports. Ann Surg. 1966 Feb;163(2):237–41.

39. Azoulay D, Andreani P, Maggi U, Salloum C, Perdigao F, Sebagh M, et al. Combined liver resection and reconstruction of the supra-renal vena cava: the Paul Brousse experience. Ann Surg. 2006 Jul;244(1):80–8.

40. Melendez JA, Arslan V, Fischer ME, Wuest D, Jarnagin WR, Fong Y, et al. Perioperative outcomes of major hepatic resections under low central venous pressure anesthesia: blood loss, blood transfusion, and the risk of postoperative renal dysfunction. J Am Coll Surg. 1998 Dec;187(6):620–5.

41. Topaloglu S, Yesilcicek Calik K, Calik A, Aydın C, Kocyigit S, Yaman H, et al. Efficacy and safety of hepatectomy performed with intermittent portal triad clamping with low central venous pressure. Biomed Res Int . 2013 Jan;2013:297971.

42. Lautt WW, Greenway C V, Legare DJ. Effect of hepatic nerves, norepinephrine, angiotensin, and elevated central venous pressure on postsinusoidal resistance sites and intrahepatic pressures in cats. Microvasc Res. 1987 Jan;33(1):50–61.

43. Lin C-X, Guo Y, Lau WY, Zhang G-Y, Huang Y-T, He W-Z, et al. Optimal central venous pressure during partial hepatectomy for hepatocellular carcinoma. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2013 Oct;12(5):520–4.

44. Sand L, Lundin S, Rizell M, Wiklund J, Stenqvist O, Houltz E. Nitroglycerine and patient position effect on central, hepatic and portal venous pressures during liver surgery. Acta Anaesthesiol Scand . 2014 Sep;58(8):961–7.

45. Jarnagin WR, Gonen M, Fong Y, DeMatteo RP, Ben-Porat L, Little S, et al. Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1,803 consecutive cases over the past decade. Ann Surg. 2002 Oct;236(4):397–407.

46. Kamiyama T, Nakanishi K, Yokoo H, Kamachi H, Tahara M, Yamashita K, et al. Perioperative management of hepatic resection toward zero mortality and morbidity: Analysis of 793 consecutive cases in a single institution. J Am Coll Surg. 2010 Oct;211(4):443–9.

47. Poon RT, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Lam CM, Yuen WK, et al. Improving perioperative outcome expands the role of hepatectomy in management of benign and malignant hepatobiliary diseases: analysis of 1222 consecutive patients from a prospective database. Ann Surg. 2004 Oct;240(4):698–710.

48. Kishi Y, Abdalla EK, Chun YS, Zorzi D, Madoff DC, Wallace MJ, et al. Three hundred and one consecutive extended right hepatectomies: evaluation of outcome based on systematic liver volumetry. Ann Surg. 2009 Oct;250(4):540–8.

49. Mullen JT, Ribero D, Reddy SK, Donadon M, Zorzi D, Gautam S, et al. Hepatic insufficiency and mortality in 1,059 noncirrhotic patients undergoing major hepatectomy. J Am Coll Surg; 2007 May;204(5):854.

50. Balzan S, Belghiti J, Farges O, Ogata S, Sauvanet A, Delefosse D, et al. The “50-50 criteria” on postoperative day 5: an accurate predictor of liver failure and death after hepatectomy. Ann Surg. 2005 Dec;242(6):824–9.

51. Rahbari NN, Garden OJ, Padbury R, Brooke-Smith M, Crawford M, Adam R, et al. Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). Surgery. 2011 May;149(5):713–24.

52. Benzoni E, Lorenzin D, Baccarani U, Adani GL, Favero A, Cojutti A, et al. Resective surgery for liver tumor: a multivariate analysis of causes and risk factors linked to postoperative complications. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2006 Nov;5(4):526–33.

53. Van den Broek MAJ, Olde Damink SWM, Dejong CHC, Lang H, Malagó M, Jalan R, et al. Liver failure after partial hepatic resection: definition, pathophysiology, risk factors and treatment. Liver Int. 2008 Jul ;28(6):767–80.

54. Guglielmi A, Ruzzenente A, Conci S, Valdegamberi A, Iacono C. How much remnant is enough in liver resection? Dig Surg. 2012 Mar;29(1):6–17.

55. Imamura H, Seyama Y, Kokudo N, Maema A, Sugawara Y, Sano K, et al. One thousand fifty-six hepatectomies without mortality in 8 years. Arch Surg . 2003 Nov ;138(11):1198–206.

56. Schreckenbach T, Liese J, Bechstein WO, Moench C. Posthepatectomy liver failure. Dig Surg. 2012 Mar;29(1):79–85.

57. Weigand K, Brost S, Steinebrunner N, Büchler M, Schemmer P, Müller M. Ischemia/Reperfusion injury in liver surgery and transplantation: pathophysiology. HPB Surg . 2012 Jan;2012:176723.

58. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. Exp Mol Pathol. 2003 Apr;74(2):86–93.

59. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. Am J Surg . 2001 Feb;181(2):160–6.

60. Zhai Y, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. Am J Transplant. 2011 Aug;11(8):1563–9.

61. Kim Y-I. Ischemia-reperfusion injury of the human liver during hepatic resection. J Hepatobiliary Pancreat Surg . 2003 Jan ;10(3):195–9.

62. Okano N, Miyoshi S, Owada R, Fujita N, Kadoi Y, Saito S, et al. Impairment of hepatosplanchnic oxygenation and increase of serum hyaluronate during normothermic and mild hypothermic cardiopulmonary bypass. Anesth Analg . 2002 Aug ;95(2):278–86.

63. Birrer R, Takuda Y, Takara T. Hypoxic hepatopathy: pathophysiology and prognosis. Intern Med . 2007 Jan ;46(14):1063–70.

64. Rushing GD, Britt LD. Reperfusion injury after hemorrhage: a collective review. Ann Surg . 2008 Jun ;247(6):929–37.

65. Liang R, Bruns H, Kincius M, Lin T, Ludwig J, Dei-Anane G, et al. Danshen protects liver grafts from ischemia/reperfusion injury in experimental liver transplantation in rats. Transpl Int . 2009 Nov;22(11):1100–9.

66. Pine JK, Aldouri A, Young AL, Davies MH, Attia M, Toogood GJ, et al. Liver transplantation following donation after cardiac death: an analysis using matched pairs. Liver Transpl. 2009 Sep;15(9):1072–82.

67. Ildefonso JA, Arias-Diaz J. Pathophysiology of liver ischemia-reperfusion injury. Cir Esp. 2010 Apr;87(4):202–9.

68. Casillas-Ramírez A, Mosbah I Ben, Franco-Gou R, Rimola A, Roselló-Catafau J, Peralta C. Ischemia-reperfusion syndrome associated with liver transplantation: an update. Gastroenterol Hepatol. 2006 May;29(5):306–13.

69. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. J Surg Res . 2008 Jun 1 ;147(1):153–9.

70. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. Gastroenterology. 2003 Oct;125(4):1246–57.

71. Behrends M, Hirose R, Park YH, Tan V, Dang K, Xu F, et al. Remote renal injury following partial hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. J Gastrointest Surg. 2008 Mar;12(3):490–5.

72. Peralta C, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. J Hepatol . 2013 Nov;59(5):1094–106.

73. Selzner M, Selzner N, Jochum W, Graf R, Clavien P-A. Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATP-dependent mechanism. Liver Transpl . 2007 Mar;13(3):382–90.

74. Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. J Mol Med (Berl). 1999 Aug;77(8):577–92.

75. Hines IN, Hoffman JM, Scheerens H, Day BJ, Harada H, Pavlick KP, et al. Regulation of postischemic liver injury following different durations of ischemia. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol . 2003 Mar;284(3):G536–45.

76. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol . 2003 Jan ;284(1):G15–26.

77. Grande L, Roselló-Catafau J, Peralta C. Ischemic preconditioning of the liver: from molecular bases to clinical application. Cirugía española. 2006 Nov ;80(5):275–82.

78. Abu-Amara M, Yang SY, Seifalian A, Davidson B, Fuller B. The nitric oxide pathway--evidence and mechanisms for protection against liver ischaemia reperfusion injury. Liver Int . 2012 Apr;32(4):531–43.

79. Massip-Salcedo M, Roselló-Catafau J, Prieto J, Avíla MA, Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. Liver Int. 2007 Feb ;27(1):6–16.

80. Tsukamoto H. Redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells. Antioxid Redox Signal. 2002 Oct ;4(5):741–8.

81. Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol . 2006 Jun;290(6):G1083–8.

82. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. J Surg Res. 1994 Aug;57(2):253–8.

83. Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. Hepatology. 1992 Nov;16(5):1236–40.

84. Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL. Complement activation following oxidative stress. Mol Immunol. Jan;36(13-14):941–8.

85. Mendes-Braz M, Elias-Miró M, Jiménez-Castro MB, Casillas-Ramírez A, Ramalho FS, Peralta C. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models. J Biomed Biotechnol. 2012 Jan ;2012:298657.

86. Rüdiger HA1, Graf R, Clavien PA.Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. J Invest Surg. 2003 May-jun ;16(3):149–59.

87. Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. Liver Transpl. 2010 Sep;16(9):1016–32.

88. Stuehr DJ. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. J Nutr . 2004 Oct;134(10 Suppl):2748S – 2751S

.

89. Yanagida H, Kaibori M, Yoshida H, Habara K, Yamada M, Kamiyama Y, et al. Hepatic ischemia/reperfusion upregulates the susceptibility of hepatocytes to confer the induction of inducible nitric oxide synthase gene expression. Shock. 2006 Aug ;26(2):162–8.

90. Domenico R. Pharmacology of nitric oxide: molecular mechanisms and therapeutic strategies. Curr Pharm Des. 2004 Jan ;10(14):1667–76.

91. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. J Invest Surg.; 2009 Jan-Feb;22(1):46–55.

92. Liu P, Yin K, Nagele R, Wong PY. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxynitrite generation, but augments neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion in rats. J Pharmacol Exp Ther. 1998 Mar ;284(3):1139–46.

93. Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, et al. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. Biochem Biophys Res Commun . 1999 Aug 11 ;261(3):917–22.

94. Abe Y, Hines I, Zibari G, Grisham MB. Hepatocellular protection by nitric oxide or nitrite in ischemia and reperfusion injury. Arch Biochem Biophys. 2009 Apr 15 ;484(2):232–7.

95. Kaizu T, Ikeda A, Nakao A, Takahashi Y, Tsung A, Kohmoto J, et al. Donor graft adenoviral iNOS gene transfer ameliorates rat liver transplant preservation injury and improves survival. Hepatology. 2006 Mar ;43(3):464–73.

96. Meguro M, Katsuramaki T, Nagayama M, Kimura H, Isobe M, Kimura Y, et al. A novel inhibitor of inducible nitric oxide synthase (ONO-1714) prevents critical warm ischemia-reperfusion injury in the pig liver. Transplantation . 2002 May 15 ;73(9):1439–46.

97. Serracino-Inglott F, Virlos IT, Habib NA, Williamson RCN, Mathie RT. Differential nitric oxide synthase expression during hepatic ischemia-reperfusion. Am J Surg. 2003 Jun;185(6):589–95.

98. Varadarajan R, Golden-Mason L, Young L, McLoughlin P, Nolan N, McEntee G, et al. Nitric oxide in early ischaemia reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation. Transplantation. 2004 Jul;78:250–6.

99. Gerald Karp. Biología celular y molecular. 4º Edición. Mexico: Mcgraw-Hill; 2005.

100. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? Hepatology. 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S31–44.

101. Lemasters JJ. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. Am J Physiol. 1999 Jan;276(1 Pt 1):G1–6.

102. Berenbom M, Chang Pi, Betz He, Stowell Re. Chemical and enzymatic changes associated with mouse liver necrosis in vitro. Cancer Res. 1955 Jan ;15(1):1–5.

103. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972 Aug ;26(4):239–57.

104. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. Int J Cell Biol. 2010 Jan ;2010:214074.

105. Ben-Ari Z, Pappo O, Cheporko Y, Yasovich N, Offen D, Shainberg A, et al. Bax ablation protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. Liver Transpl. 2007 Aug ;13(8):1181–8.

106. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? Hepatology . 2001 Feb;33(2):397–405.

107. Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol . 2004 Feb ;286(2):G189–96.

108. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation. 1986 Nov;74(5):1124–36.

109. Sommerschild HT, Kirkeboen KA. Preconditioning - endogenous defence mechanisms of the heart. Acta Anaesthesiol Scand . 2002 Feb;46(2):123–37.

110. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. Circulation. 1993 Sep ;88(3):1264–72.

111. Glazier SS, O'Rourke DM, Graham DI, Welsh FA. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. J Cereb Blood Flow Metab. 1994 Jul;14(4):545–53.

112. Pang CY, Forrest CR. Acute pharmacologic preconditioning as a new concept and alternative approach for prevention of skeletal muscle ischemic necrosis. Biochem Pharmacol . 1995 Apr 18 ;49(8):1023–34.

113. Lloris-Carsí JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. Transplant Proc . 1993 Dec;25(6):3303–4.

114. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpí E, et al. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 1996 May 6 ;222(1):27–32.

115. Du ZY, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, Macdonald P. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. J Heart Lung Transplant . 1996 Dec ;15(12):1258–67.

116. Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. Br J Urol . 1997 Jun;79(6):842–7.

117. Przyklenk K. Ischemic preconditioning. J Thromb Thrombolysis. 2000 Jan;9(1):99–103.

118. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. Circ Res.1993 Jun;72(6):1293–9.

119. Bolli R, Dawn B, Tang XL, Qiu Y, Ping P, Xuan YT, et al. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. Basic Res Cardiol.1998 Oct ;93(5):325–38.

120. Grund F, Sommerschild HT, Kirkebøen KA, Ilebekk A. Preconditioning with ischaemia reduces both myocardial oxygen consumption and infarct size in a graded pattern. J Mol Cell Cardiol. 1997 Nov;29(11):3067–79.

121. Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. Circ Res . 1990 Apr;66(4):913–31.

122. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. Circulation . 1991 Jul ;84(1):350–6.

123. Zaugg M, Schaub MC. Signaling and cellular mechanisms in cardiac protection by ischemic and pharmacological preconditioning. J Muscle Res Cell Motil . 2003 Jan ;24(2-3):219–49.

124. Meldrum DR. Mechanisms of cardiac preconditioning: ten years after the discovery of ischemic preconditioning. J Surg Res. 1997 Nov;73(1):1–13.

125. Fryer RM, Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Importance of PKC and tyrosine kinase in single or multiple cycles of preconditioning in rat hearts. Am J Physiol. 1999 Apr;276 (4 Pt 2):H1229-35.

126. Garlid KD, Dos Santos P, Xie Z-J, Costa ADT, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. Biochim Biophys Acta. 2003 Sep;1606(1-3):1–21.

127. Wang L, Cherednichenko G, Hernandez L, Halow J, Camacho SA, Figueredo V, et al. Preconditioning limits mitochondrial Ca(2+) during ischemia in rat hearts: role of K(ATP) channels. Am J Physiol Heart Circ Physiol . 2001 May ;280(5):H2321–8.

128. Selzner N, Boehnert M, Selzner M. Preconditioning, postconditioning, and remote conditioning in solid organ transplantation: basic mechanisms and translational applications. Transplant Rev. 2012 Apr;26(2):115–24.

129. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. Ann Surg. 2000 Aug;232(2):155–62.

130. Alchera E, Dal Ponte C, Imarisio C, Albano E, Carini R. Molecular mechanisms of liver preconditioning. World J Gastroenterol. 2010 Dec;16(48):6058–67.

131. Peralta C, Bartrons R, Riera L, Manzano A, Xaus C, Gelpi E, et al. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol . 2000 Jul;279(1):G163–71.

132. Ofluoglu E, Kerem M, Pasaoglu H, Turkozkan N, Seven I, Bedirli A, et al. Delayed energy protection of ischemic preconditioning on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. Eur Surg Res. 2006 Jan ;38(2):114–21.

133. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Albano E. Ischemic preconditioning reduces Na(+) accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia. Hepatology. 2000 Jan;31(1):166–72.

134. Peralta C, Bulbena O, Xaus C, Prats N, Cutrin JC, Poli G, et al. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. Transplantation . 2002 Apr;73(8):1203–11.

135. Yuan G-J, Ma J-C, Gong Z-J, Sun X-M, Zheng S-H, Li X. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. World J Gastroenterol. 2005 Mar;11(12):1825–8.

136. Choukèr A, Martignoni A, Schauer R, Dugas M, Rau H-G, Jauch K-W, et al. Beneficial effects of ischemic preconditioning in patients undergoing hepatectomy: the role of neutrophils. Archives of surgery. 2005. Feb;140(2):129-36.

137. Beauchamp P, Richard V, Tamion F, Lallemand F, Lebreton JP, Vaudry H, et al. Protective effects of preconditioning in cultured rat endothelial cells: effects on neutrophil adhesion and expression of ICAM-1 after anoxia and reoxygenation. Circulation . 1999 Aug ;100(5):541–6.

138. Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpí E, Prats N, Roselló-Catafau J. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. Biochem Biophys Res Commun. 1996 Dec ;229(1):264–70.

139. Li S-Q, Liang L-J, Huang J-F, Li Z. Ischemic preconditioning protects liver from hepatectomy under hepatic inflow occlusion for hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis. World J Gastroenterol. 2004 Sep ;10(17):2580–4.

140. Arkadopoulos N, Kostopanagiotou G, Theodoraki K, Farantos C, Theodosopoulos T, Stafyla V, et al. Ischemic preconditioning confers antiapoptotic protection during major hepatectomies performed under combined inflow and outflow exclusion of the liver. A randomized clinical trial. World J Surg. 2009 Sep ;33(9):1909–15.

141. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpí E, et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. Hepatology. 1999 Jan;29(1):126–32.

142. Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S, et al. Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. Surgery . 1999 Nov;126(5):945–54.

143. Bouma MG, van den Wildenberg FA, Buurman WA. The anti-inflammatory potential of adenosine in ischemia-reperfusion injury: established and putative beneficial actions of a retaliatory metabolite. Shock. 1997 Nov ;8(5):313–20.

144. Rakhit RD, Edwards RJ, Marber MS. Nitric oxide, nitrates and ischaemic preconditioning. Cardiovasc Res. 1999 Aug ;43(3):621–7.

145. Shah V, Kamath PS. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. Liver Transpl . 2003 Jan ;9(1):1–11.

146. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti MP, et al. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. Hepatology . 2001 Jan;33(1):131–9.

147. Funaki H, Shimizu K, Harada S-I, Tsuyama H, Fushida S, Tani T, et al. Essential role for nuclear factor kappaB in ischemic preconditioning for ischemia-reperfusion injury of the mouse liver. Transplantation. 2002 Aug ;74(4):551–6.

148. Kim YM, Kim TH, Chung HT, Talanian R V, Yin XM, Billiar TR. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. Hepatology. 2000 Oct ;32(4 Pt 1):770–8.

149. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? Nat Rev Mol Cell Biol . 2002 Mar ;3(3):214–20.

150. Peralta C, Fernández L, Panés J, Prats N, Sans M, Piqué JM, et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. Hepatology . 2001 Jan;33(1):100–13.

151. Selzner N, Selzner M, Jochum W, Clavien P-A. Ischemic preconditioning protects the steatotic mouse liver against reperfusion injury: an ATP dependent mechanism. J Hepatol . 2003 Jul ;39(1):55–61.

152. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. Ann Surg. 2003 Dec ;238(6):842–3.

153. Heizmann O, Loehe F, Volk A, Schauer RJ. Ischemic preconditioning improves postoperative outcome after liver resections: a randomized controlled study. Eur J Med Res. 2008 Feb;13(2):79–86.

154. Gurusamy KS, Kumar Y, Pamecha V, Sharma D, Davidson BR. Ischaemic pre-conditioning for elective liver resections performed under vascular occlusion. Cochrane database Syst Rev. 2009 Jan 21;(1):CD0076(1):CD007629.

155. Azoulay D, Del Gaudio M, Andreani P, Ichai P, Sebag M, Adam R, et al. Effects of 10 minutes of ischemic preconditioning of the cadaveric liver on the graft's preservation and function: the ying and the yang. Ann Surg . 2005 Jul ;242(1):133–9.

156. Amador A, Grande L, Martí J, Deulofeu R, Miquel R, Solá A, et al. Ischemic pre-conditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial. Am J Transplant. 2007 Sep;7(9):2180–9.

157. Gurusamy KS, Kumar Y, Sharma D, Davidson BR. Ischaemic preconditioning for liver transplantation. Cochrane Database Syst Rev. 2008 Jan;(1):CD006315.

158. Gross GJ. Role of opioids in acute and delayed preconditioning. J Mol Cell Cardiol . 2003 Jul ;35(7):709–18.

159. Abu-Amara M, Gurusamy K, Hori S, Glantzounis G, Fuller B, Davidson BR. Systematic review of randomized controlled trials of pharmacological interventions to reduce ischaemia-reperfusion injury in elective liver resection with vascular occlusion. HPB. 2010 Feb;12(1):4–14.

160. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. Anesthesiology . 1997 Aug ;87(2):361–70.

161. Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. Anesthesiology. 1997 Nov;87(5):1182–90.

162. Novalija E, Fujita S, Kampine JP, Stowe DF. Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts. Anesthesiology . 1999 Sep;91(3):701–12.

163. Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC. Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via multiple signaling pathways. Anesthesiology. 2002 Jul;97(1):4–14.

164. Masui K, Kashimoto S, Furuya A, Oguchi T. Isoflurane and sevoflurane during reperfusion prevent recovery from ischaemia in mitochondrial KATP channel blocker pretreated hearts. Eur J Anaesthesiol. 2006 Feb ;23(2):123–9.

165. Van Allen NR, Krafft PR, Leitzke AS, Applegate RL, Tang J, Zhang JH. The role of Volatile Anesthetics in Cardioprotection: a systematic review. Med Gas Res . 2012 Jan;2(1):22.

166. Landoni G, Biondi-Zoccai GGL, Zangrillo A, Bignami E, D'Avolio S, Marchetti C, et al. Desflurane and sevoflurane in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized clinical trials. J Cardiothorac Vasc Anesth . 2007 Aug ;21(4):502–11.

167. Landoni G, Fochi O, Tritapepe L, Guarracino F, Belloni I, Bignami E, et al. Cardiac protection by volatile anesthetics. A review. Minerva Anestesiol. 2009 May;75(5):269–73.

168. Yu CH, Beattie WS. The effects of volatile anesthetics on cardiac ischemic complications and mortality in CABG: a meta-analysis. Can J Anaesth. 2006 Sep ;53(9):906–18.

169. Schmidt R, Tritschler E, Hoetzel A, Loop T, Humar M, Halverscheid L, et al. Heme oxygenase-1 induction by the clinically used anesthetic isoflurane protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. Ann Surg . 2007 Jun ;245(6):931–42.

170. Bedirli N, Ofluoglu E, Kerem M, Utebey G, Alper M, Yilmazer D, et al. Hepatic energy metabolism and the differential protective effects of sevoflurane and isoflurane anesthesia in a rat hepatic ischemia-reperfusion injury model. Anesth Analg. 2008 Mar;106(3):830–7.

171. Lv X, Yang L, Tao K, Liu Y, Yang T, Chen G, et al. Isoflurane preconditioning at clinically relevant doses induce protective effects of heme oxygenase-1 on hepatic ischemia reperfusion in rats. BMC Gastroenterol. 2011 Mar 31;11:31.

172. Wang Z, Lv H, Song S, Shen X, Yang L, Yu W. Emulsified isoflurane preconditioning protects isolated rat Kupffer cells against hypoxia/reoxygenation-induced injury. Int J Med Sci . 2013 Jan ;10(3):286–91.

173. Balzan SMP, Gava VG, Rieger A, Pra D, Trombini L, Zenkner FF, et al. Ischemic versus pharmacologic hepatic preconditioning. J Surg Res . 2014 Sep ;191(1):134–9.

174. Minou AF, Dzyadzko AM, Shcherba AE, Rummo OO. The influence of pharmacological preconditioning with sevoflurane on incidence of early allograft dysfunction in liver transplant recipients. Anesthesiol Res Pract. 2012 Aug;2012:930487.

175. Song JC, Sun YM, Yang LQ, Zhang MZ, Lu ZJ, Yu WF. A comparison of liver function after hepatectomy with inflow occlusion between sevoflurane and propofol anesthesia. Anesth Analg . 2010 Oct ;111(4):1036–41.

176. Beck-Schimmer B, Breitenstein S, Urech S, De Conno E, Wittlinger M, Puhan M, et al. A randomized controlled trial on pharmacological preconditioning in liver surgery using a volatile anesthetic. Ann Surg. 2008 Dec;248(6):909–18.

177. De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, Meeus R, Nelis A, Van Reeth V, et al. Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. Anesthesiology. 2004. Aug;101(2):299-310.

178. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. J Chronic Dis. 1987 Jan ;40(5):373–83.

179. Bressenot A, Marchal S, Bezdetnaya L, Garrier J, Guillemin F, Plénat F. Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma. J Histochem Cytochem . 2009 Apr ;57(4):289–300.

180. Holubec H, Payne CM, Bernstein H, Dvorakova K, Bernstein C, Waltmire CN, et al. Assessment of apoptosis by immunohistochemical markers compared to cellular morphology in ex vivo-stressed colonic mucosa. J Histochem Cytochem. 2005 Feb;53(2):229–35.

181. Clavien PA, Barkun J, de Oliveira ML, Vauthey JN, Dindo D, Schulick RD, et al. The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. Ann Surg. 2009 Aug;250(2):187–96.

182. Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. Ann Surg. 2002 Mar;235(3):400–7.

183. Carretero MJ, Fontanals J, Agustí M, Arguis MJ, Martínez-Ocón J, Ruiz A, et al. Monitoring in resuscitation: comparison of cardiac output measurement between pulmonary artery catheter and NICO. Resuscitation. 2010 Apr ;81(4):404–9.

184. Monnet X, Robert J-M, Jozwiak M, Richard C, Teboul J-L. Assessment of changes in left ventricular systolic function with oesophageal Doppler. Br J Anaesth . 2013 Nov;111(5):743–9.

185. Smyrniotis V, Theodoraki K, Arkadopoulos N, Fragulidis G, Condi-Pafiti A, Plemenou-Fragou M, et al. Ischemic preconditioning versus intermittent vascular occlusion in liver resections performed under selective vascular exclusion: a prospective randomized study. Am J Surg. 2006 Nov;192(5):669–74.

186. Domart M-C, Esposti DD, Sebagh M, Olaya N, Harper F, Pierron G, et al. Concurrent induction of necrosis, apoptosis, and autophagy in ischemic preconditioned human livers formerly treated by chemotherapy. J Hepatol . 2009 Nov ;51(5):881–9.

187. O'Neill S, Leuschner S, McNally SJ, Garden OJ, Wigmore SJ, Harrison EM. Meta-analysis of ischaemic preconditioning for liver resections. Br J Surg. 2013 Dec;100(13):1689–700.

188. Mizuguchi T, Katsuramaki T, Nobuoka T, Kawamoto M, Oshima H, Kawasaki H, et al. Serum hyaluronate level for predicting subclinical liver dysfunction after hepatectomy. World J Surg . 2004 Oct ;28(10):971–6.

189. Nanashima A, Yamaguchi H, Tanaka K, Shibasaki S, Tsuji T, Ide N, et al. Preoperative serum hyaluronic acid level as a good predictor of posthepatectomy complications. Surg Today. 2004;34(11):913–9.

190. Sudo Y, Takaya S, Kobayashi M, Fukuda A, Harada O, Suto T, et al. Assessment of graft viability using hyaluronic acid and adenosine triphosphate in orthotopic liver transplantation from non-heart-beating donors. Transplant Proc. 2000 Nov;32(7):2114-5.

191. Delis SG, Bakoyiannis A, Biliatis I, Athanassiou K, Tassopoulos N, Dervenis C. Model for end-stage liver disease (MELD) score, as a prognostic factor for post-operative morbidity and mortality in cirrhotic patients, undergoing hepatectomy for hepatocellular carcinoma. HPB. 2009 Jun ;11(4):351–7.

192. Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, Tasoulis M-K, Lykoudis PM, Theodoraki K, et al. Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury. Oxid Med Cell Longev . 2014 Apr;2014:906965.

193. Kishi Y, Zorzi D, Contreras CM, Maru DM, Kopetz S, Ribero D, et al. Extended preoperative chemotherapy does not improve pathologic response and increases postoperative liver insufficiency after hepatic resection for colorectal liver metastases. Ann Surg Oncol . 2010 Nov ;17(11):2870–6.

194. Klinger M, Eipeldauer S, Hacker S, Herberger B, Tamandl D, Dorfmeister M, et al. Bevacizumab protects against sinusoidal obstruction syndrome and does not increase response rate in neoadjuvant XELOX/FOLFOX therapy of colorectal cancer liver metastases. Eur J Surg Oncol. 2009 May;35(5):515–20.

195. Selzner M, Rüdiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. Hepatology. 2000 Dec;32(6):1280–8.

196. Kireev RA, Cuesta S, Ibarrola C, Bela T, Moreno Gonzalez E, Vara E, et al. Age-related differences in hepatic ischemia/reperfusion: gene activation, liver injury, and protective effect of melatonin. J Surg Res. 2012 Dec;178(2):922–34.

197. Reddy SK, Barbas AS, Turley RS, Steel JL, Tsung A, Marsh JW, et al. A standard definition of major hepatectomy: resection of four or more liver segments. HPB . 2011 Jul;13(7):494–502.

198. Nuzzo G, Giuliante F, Vellone M, De Cosmo G, Ardito F, Murazio M, et al. Pedicle clamping with ischemic preconditioning in liver resection. Liver Transpl . 2004 Feb ;10(2 Suppl 1):S53–7.

199. Petrowsky H, McCormack L, Trujillo M, Selzner M, Jochum W, Clavien P-A. A prospective, randomized, controlled trial comparing intermittent portal triad clamping versus ischemic preconditioning with continuous clamping for major liver resection. Ann Surg. 2006 Dec;244(6):921–30.

200. Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, Maggi U, Sebagh M, Ichai P, et al. Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study. J Am Coll Surg . 2006 Feb ;202(2):203–11.

201. Rahbari NN, Wente MN, Schemmer P, Diener MK, Hoffmann K, Motschall E, et al. Systematic review and meta-analysis of the effect of portal triad clamping on outcome after hepatic resection. Br J Surg. 2008 Apr;95(4):424–32.

202. Lv X, Wang ZM, Huang SD, Song SH, Wu FX, Yu WF. Emulsified isoflurane preconditioning reduces lung injury induced by hepatic ischemia/reperfusion in rats. Int J Med Sci. 2011 Jun;8(5):353–61.

203. Ko JS, Gwak MS, Kim GS, Shin YH, Ryu S, Kim J-S, et al. The protective effect of ischemic preconditioning against hepatic ischemic-reperfusion injury under isoflurane anesthesia in rats. Transplant Proc. 2013 Jun;45(5):1704–7.

204. Toda N, Toda H, Hatano Y. Anesthetic modulation of immune reactions mediated by nitric oxide. J Anesth. 2008 May;22(2):155–62.

205. Slankamenac K, Breitenstein S, Beck-Schimmer B, Graf R, Puhan MA, Clavien P-A. Does pharmacological conditioning with the volatile anaesthetic sevoflurane offer protection in liver surgery? HPB . 2012 Dec;14(12):854–62.

206. Chang H, Tsai S-Y, Chang Y, Chen T-L, Chen R-M. Therapeutic concentrations of propofol protects mouse macrophages from nitric oxide-induced cell death and apoptosis. Can J Anaesth. 2002 May;49(5):477–80.

207. Yang LQ, Tao KM, Liu YT, Cheung CW, Irwin MG, Wong GT, et al. Remifentanil preconditioning reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats via inducible nitric oxide synthase expression. Anesthesiology. 2011 May;114(5):1036–47.

208. Nakagami M, Morimoto T, Mitsuyoshi A, Mashima S, Shimabukuro T, Yamaoka Y. Difference in onset of warm ischemia and reperfusion injury between parenchymal and endothelial cells of the liver. Evaluation by purine nucleoside phosphorylase and hyaluronic acid. J Surg Res.1996 Apr;62(1):118–24.

209. Kuriyama N, Isaji S, Hamada T, Kishiwada M, Ohsawa I, Usui M, et al. The cytoprotective effects of addition of activated protein C into preservation solution on small-for-size grafts in rats. Liver Transpl. 2010 Jan;16(1):1–11.

210. Rostami S, Parsian H. Hyaluronic Acid: from biochemical characteristics to its clinical translation in assessment of liver fibrosis. Hepat Mon. 2013 Jan;13(12):e13787.

211. Garcea G, Ong SL, Maddern GJ. Predicting liver failure following major hepatectomy. Dig Liver Dis. 2009 Nov ;41(11):798–806.

212. Serafín A, Roselló-Catafau J, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Peralta C. Ischemic preconditioning increases the tolerance of Fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. Am J Pathol . 2002 Aug ;161(2):587–601.

213. Koti RS, Tsui J, Lobos E, Yang W, Seifalian AM, Davidson BR. Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver. FASEB J . 2005 Jul ;19(9):1155–7.

214. Amour J, Brzezinska AK, Weihrauch D, Billstrom AR, Zielonka J, Krolikowski JG, et al. Role of Heat Shock Protein 90 and Endothelial Nitric Oxide Synthase during Early Anesthetic and Ischemic Preconditioning. Anesthesiology. 2009 Feb;110(2):317–25.

215. Ma L, Kong F, Ge H, Liu J, Gong F, Xu L, et al. Ventricular hypertrophy blocked delayed anesthetic cardioprotection in rats by alteration of iNOS/COX-2 signaling. Sci Rep. 2014 Nov;4:7071.

216. Wakeno-Takahashi M, Otani H, Nakao S, Uchiyama Y, Imamura H, Shingu K. Adenosine and a nitric oxide donor enhances cardioprotection by preconditioning with isoflurane through mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive K+ channel-dependent and -independent mechanisms. Anesthesiology. 2004 Mar;100(3):515–24.

217. Shimoda M, Iwasaki Y, Sawada T, Kubota K. Protective effect of ischemic preconditioning against liver injury after major hepatectomy using the intermittent pringle maneuver in swine. Pathobiology. 2007 May;74(1):42–9.

218. Scatton O, Zalinski S, Jegou D, Compagnon P, Lesurtel M, Belghiti J, et al. Randomized clinical trial of ischaemic preconditioning in major liver resection with intermittent Pringle manoeuvre. Br J Surg . 2011 Sep ;98(9):1236–43.

219. Winbladh A, Bjornsson B, Trulsson L, Offenbartl K, Gullstrand P, Sandstrom P. Ischemic preconditioning prior to intermittent Pringle maneuver in liver resections. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2012 Mar;19(2):159–70.

220. Pelton JJ, Hoffman JP, Eisenberg BL. Comparison of liver function tests after hepatic lobectomy and hepatic wedge resection. Am Surg .1998 May ;64(5):408–14.

221. Nieuwenhuijs VB, De Bruijn MT, Padbury RTA, Barritt GJ. Hepatic ischemia-reperfusion injury: roles of Ca2+ and other intracellular mediators of impaired bile flow and hepatocyte damage. Dig Dis Sci. 2006 Jun;51(6):1087–102.

222. Ozaki M, Haga S, Ozawa T. In vivo monitoring of liver damage using caspase-3 probe. Theranostics. 2012 Jan;2(2):207–14.

223. Ishii S, Abe T, Saito T, Tsuchiya T, Kanno H, Miyazawa M, et al. Effects of preconditioning on ischemia/reperfusion injury of hepatocytes determined by immediate early gene transcription. J Hepatobiliary Pancreat Surg . 2001 Jan;8(5):461–8.

224. Cursio R, Colosetti P, Auberger P, Gugenheim J. Liver apoptosis following normothermic ischemia-reperfusion: in vivo evaluation of caspase activity by FLIVO assay in rats. Transplant Proc. 2008 Jul-Aug;40(6):2038–41.

225. Huet P-M, Nagaoka MR, Desbiens G, Tarrab E, Brault A, Bralet M-P, et al. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. Hepatology. 2004 Apr;39(4):1110–9.

226. Wang B, Zhang Q, Zhu B, Cui Z, Zhou J. Protective effect of gadolinium chloride on early warm ischemia/reperfusion injury in rat bile duct during liver transplantation. PLoS One. 2013 Jan;8(1):e52743.

227. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. Hepatology. 1999 Nov;30(5):1223–31.

228. Jamnicki-Abegg M, Weihrauch D, Pagel PS, Kersten JR, Bosnjak ZJ, Warltier DC, et al. Isoflurane inhibits cardiac myocyte apoptosis during oxidative and inflammatory stress by activating Akt and enhancing Bcl-2 expression. Anesthesiology. 2005 Nov;103(5):1006–14.

229. Strijdom H, Muller C, Lochner A. Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. J Mol Cell Cardiol . 2004 Oct ;37(4):897–902.

230. Hines IN, Harada H, Flores S, Gao B, McCord JM, Grisham MB. Endothelial nitric oxide synthase protects the post-ischemic liver: potential interactions with superoxide. Biomed Pharmacother. 2005 May ;59(4):183–9.

231. Murillo D, Kamga C, Mo L, Shiva S. Nitrite as a mediator of ischemic preconditioning and cytoprotection. Nitric Oxide. 2011 Aug ;25(2):70–80.

232. Chen T, Zamora R, Zuckerbraun B, Billiar TR. Role of nitric oxide in liver injury. Curr Mol Med . 2003;3(6):519–26.

233. Theruvath TP, Zhong Z, Currin RT, Ramshesh VK, Lemasters JJ. Endothelial nitric oxide synthase protects transplanted mouse livers against storage/reperfusion injury: Role of vasodilatory and innate immunity pathways. Transplant Proc. 2006 Dec;38(10):3351–7.

234. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. J Mol Cell Cardiol. 2001 Nov;33(11):1897–918.

235. Wang Y, Guo Y, Zhang SX, Wu W-J, Wang J, Bao W, et al. Ischemic preconditioning upregulates inducible nitric oxide synthase in cardiac myocyte. J Mol Cell Cardiol. 2002 Jan ;34(1):5–15.

236. Datta G, Luong T V, Fuller BJ, Davidson BR. Endothelial nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 act independently in liver ischemic preconditioning. J Surg Res. 2014 Jan;186(1):417–28.

237. Barrier A, Olaya N, Chiappini F, Roser F, Scatton O, Artus C, et al. Ischemic preconditioning modulates the expression of several genes, leading to the overproduction of IL-1Ra, iNOS, and Bcl-2 in a human model of liver ischemia-reperfusion. FASEB J. 2005 Oct;19(12):1617–26.

238. Lü X, Zhan Y, Yang X. [Expression and transcription of inducible nitric oxide synthase in the liver ischemic preconditioning in rats]. Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao [Internet]. 2003 Dec ;28(6):563–6.

239. Wheeler AP, Bernard GR, Thompson BT, Schoenfeld D, Wiedemann HP, deBoisblanc B, et al. Pulmonary-artery versus central venous catheter to guide treatment of acute lung injury. N Engl J Med . 2006 May;354(21):2213–24.

240. Chouker A. Effects of Pringle manoeuvre and ischaemic preconditioning on haemodynamic stability in patients undergoing elective hepatectomy: a randomized trial. Br J Anaesth . 2004 May ;93(2):204–11.

241. Aggarwal S, Kang Y, Freeman J, DeWolf AM, Begliomini B. Is there a post-reperfusion syndrome? Transplant Proc. 1989;21(3):3497–9.

242. Shimizu Y, Sano T, Yasui K. Predicting pleural effusion and ascites following extended hepatectomy in the non-cirrhotic liver. J Gastroenterol Hepatol . 2007 Jun ;22(6):837–40.

243. Wang H-Q. Bile leakage test in liver resection: A systematic review and meta-analysis. World J Gastroenterol . 2013 Dec;19(45):8420-6.

244. Belghiti J, Hiramatsu K, Benoist S, Massault PP, Sauvanet A, Farges O. Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: An update to evaluate the actual risk of liver resection. J Am Coll Surg. 2000 Jul;191(1):38–46.

245. Dahm F, Georgiev P, Clavien P-A. Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical implications. Am J Transplant . 2005 Nov;5(11):2605–10.

246. Asencio JM, Vaquero J, Olmedilla L, García Sabrido JL. “Small-for-flow” syndrome: shifting the “size” paradigm. Med Hypotheses. 2013 May;80(5):573–7.

247. Martí-Ragué J, Parés D, Biondo S, Navarro M, Figueras J, de Oca J, et al. Survival and recurrence in the multidisciplinary approach of colorectal cancer. Med Clin. 2004 Sep;123(8):291–6.

10. ANEXO

10.1 PUBLICACIÓN

"Hepatic cytoproptective effect of ischemic and anesthetic preconditioning before liver resection when using intermittent vascular inflow occlusion: A randomized clinical trial"

Aurora Rodríguez, Pilar Taurà, Maria I. García-Domigo, Eric Herrero, Judith Camps, Pilar Forcada, Sergi Sabatés and Esteve Cugat. ***Surgery 2015;157:249.59***

Hepatic cytoprotective effect of ischemic and anesthetic preconditioning before liver resection when using intermittent vascular inflow occlusion: A randomized clinical trial

Aurora Rodríguez, MD,[a] Pilar Taurà, MD,[b] Maria I. García Domingo, PhD,[c] Eric Herrero, MD,[c] Judith Camps, MD,[c] Pilar Forcada, MD,[d] Sergi Sabaté, PhD,[e] *and* **Esteve Cugat, PhD,[c]** *Terrassa and Barcelona, Spain*

Background. *Ischemic preconditioning (IPC) and anesthetic preconditioning (APC) have been reported to attenuate ischemia-reperfusion (IR) injury after liver resection under continuous inflow occlusion. This study evaluates whether these strategies enhance hepatic protection of remnant liver against IR after liver resection with intermittent clamping (INT).*
Methods. *A total of 106 patients without underlying liver disease and submitted to liver resection using INT were randomized into 3 groups: IPC (10 minutes of inflow occlusion followed by 10 minutes of reperfusion before liver transection), APC (sevoflurane administration for 20 minutes before liver transection), and INT (no preconditioning). Patients were also stratified according to the extent of the hepatectomy. Cytoprotection was evaluated by comparing hepatocyte and endothelial dysfunction markers, apoptosis, histologic lesions, and postoperative outcome.*
Results. *No differences were observed in preoperative chemotherapy and steatosis, total warm ischemia time, operative time, or blood loss. Kinetics of transaminases (aspartate aminotransferase,* P = *.137; alanine aminotransferase,* P = *.616), bilirubin (*P = *.980), and hyaluronic acid increase (*P = *.514) revealed no differences. Significant apoptosis was present in 40% of patients, mild-to-moderate leukocyte infiltration and steatosis in 45% and 55%, respectively, and mild sinusoidal congestion in 65%, with a similar distribution in the 3 groups. When patients were stratified by major versus minor resections, no differences were observed in any of the variables studied. Postoperative clinical outcomes were also similar.*
Conclusion. *These results suggest that these protocols of IPC and APC used in this study do not provide better cytoprotection from IR when INT is used. (Surgery 2015;157:249-59.)*

From the Department of Anesthesiology,[a] Hospital Universitari Mútua Terrassa, Terrassa; Department of Anesthesiology,[b] Liver Surgery and Liver Transplant Unit, Hospital Clinic, Barcelona University, Barcelona; Department of Surgery,[c] Liver Surgery, Hospital Universitari Mútua Terrassa, Terrassa; Department of Histopathology,[d] Hospital Universitari Mútua Terrassa, Terrassa; and Department of Anesthesiology,[e] Fundació Puigvert, Barcelona, Spain

Hepatic resection is considered the first-line therapeutic option in the treatment for primary and secondary liver malignancies, even elderly patients, large tumors, fatty livers, and after neoadjuvant chemotherapy.[1,2] These factors and hemorrhage impose additional risks of the hepatectomy, influencing postoperative complication rates and long-term survival.[3,4] Intermittent portal triad clamping (Pringle maneuver) associated with low central venous pressure achieved during the anesthesia procedure decreases intraoperative blood loss during liver transection.[5,6] The sequence of hepatic warm ischemia and reperfusion (IR) has been associated with liver injury. This phenomenon is a dynamic process that involves ischemic organ damage and inflammation-mediated reperfusion injury, including Kupffer cell/neutrophil activation and release of cytokine and reactive oxygen

Supported by a grant from the Fundació Docència i Recerca Mútua de Terrassa (BE 0033).

Accepted for publication September 4, 2014.

Reprint requests: Aurora Rodríguez, MD, Department of Anesthesiology, Hospital Universitari Mutua Terrassa, Plaça Dr. Robert, 5, 08221 Terrassa, Spain. E-mail: aurorarc1@gmail.com.

0039-6060/$ - see front matter

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2014.09.005

species, which increase the risk of hepatocyte and sinusoidal endothelial cell (SEC) death.[7]

After major liver resection under vascular exclusion, IR injury of the remnant liver may be a serious complication, leading to postoperative liver dysfunction and increased morbidity and mortality.[8] Many efforts have been made to modulate IR injury in the remnant liver with protective substances or conditions against noxious stimuli.[9] One strategy is ischemic preconditioning (IPC), which is an endogenous adaptive phenomenon wherein exposure of tissues to a brief period of ischemia followed by a brief period of reperfusion may protect them from subsequent prolonged ischemia insult.[10,11] Another strategy is intermittent ischemia (INT), conducted with several short periods of ischemia, each followed by reperfusion, which is prevailingly used in attempt to limit the warm ischemia time, although it offers less control of blood loss than IPC.[12] Both INT and IPC have been found to attenuate IR injury through a similar and complex mechanism[11,13] by modifying certain key reactions of the IR cascade. The protective effect is believed to mediate the effects, in part, by the generation of reactive oxygen species, which could prime hepatocytes for subsequent stress. In addition, adenosine triphosphate is converted to adenosine, which acts on adenosine A_{2B} receptors in the hepatocytes and induces nitric oxide (NO) synthesis, which in turn induces vasodilation and decreases apoptosis.[14]

In the mid 1980s, anesthetic preconditioning (APC) induced by volatile anesthetics was proposed as a modulator of IR injury in the myocyte.[15] Interestingly, ischemic and APC share many common pathways of intracellular signaling, involving NO generation.[16] Although many studies have reported a protective effect of IPC[10,17] and APC[18] in hepatectomies performed under continuous inflow occlusion, it remains controversial whether ischemic or APC can enhance cytoprotection against IR in liver resections performed under intermittent inflow occlusion.

The main objective of this randomized, controlled trial was to determine whether IPC or APC enhance hepatic cytoprotection against IR in patients undergoing liver resection under intermittent inflow occlusion alone. The second aim was to assess the impact of IPC and APC on postoperative clinical outcome.

PATIENTS AND METHODS

Patients. Between January 2004 and February 2011, 121 consecutive patients undergoing elective partial liver resection under intermittent Pringle maneuver were included in this prospective, randomized study. The clinical protocol was approved by our Institutional Research Ethics Committee and written informed consent was obtained from each patient.

Patients scheduled for resection of ≥2 liver segments were selected to participate in this study. Patients meeting one of the following criteria were excluded: Underlying liver disease, severe preexisting pulmonary, renal, or cardiac disease, or preoperative increases in liver transaminases, bilirubin, and international normalized ratio (INR). All patients were classified as American Society of Anesthesiologists (ASA) physical status I–III. All anesthetic and operative procedures were performed by the same team of experienced hepatic surgeons and anesthesiologists.

Anesthesia management. The same standardized anesthetic protocol was used to manage all patients included in the study. Before general anesthesia, a thoracic epidural catheter was placed (T9–T11) to provide postoperative analgesia. Anesthesia was induced with propofol (2–3 $mg.kg^{-1}$), fentanyl (2 $\mu g.kg^{-1}$), and atracurium (0.5 $mg.kg^{-1}$) and maintained with target-controlled infusion of propofol according to a bispectral index of 40–60, remifentanil (0.1–0.3 $\mu g.kg^{-1}$), fentanyl boluses, and continuous perfusion of atracurium (0.3 $\mu g.kg^{-1}.min^{-1}$) to maintain neuromuscular block. Conventional hemodynamic monitoring included the precordial leads V_2 and V_5, ST analysis, continuous arterial and central venous pressure, and cardiac index obtained with a noninvasive method (CardioQ; Deltex Medical). The bispectral index was also recorded. The therapeutic strategy aimed to maintain mean arterial pressure (MAP) of >65 mmHg, cardiac index of >2.4 $l.min^{-1}/m^2$, and central venous pressure of ≤5 mmHg (a fluid restriction strategy). If the MAP was <60 mmHg, norepinephrine was administered. Intraoperative hemodynamic and clinical events (arterial hypotension defined as MAP ≤ 20%, arterial hypertension as MAP ≥ 20% of preanesthetic values, tachycardia as a heart rate >100 beats/min, and bradycardia as a heart rate <50 beats/min) were recorded. Blood transfusion was considered when hemoglobin was ≤8.5 g/dL. In patients with major resection or with an INR >1.5, 2 U of fresh frozen plasma were administered when the resection was accomplished. Patients were extubated in the operating room and transferred to the recovery room or intensive care unit when needed.

Operative technique. Liver resection was described using Brisbane 2000 terminology.[19] Hepatic lesions were detected preoperatively with computed tomography, MRI, and/or positron emission tomography. The operation was performed via

a subcostal bilateral laparotomy or "J" laparotomy when the resection involved right posterior segments of liver. After liver mobilization, intraoperative ultrasonography was performed in all patients to identify the exact localization of all liver lesions and their relationship with liver vascularization and to exclude/include other misdiagnosed lesions. The type of resection was then decided.

Liver transection was performed with an ultrasonic dissector (Cavitron) and a monopolar coagulation (Tissulink). In all patients, intermittent Pringle maneuvers of 15-minute occlusion of the hepatic pedicle and 5-minute clamp-free intervals were performed to avoid blood loss during liver transection. The resection margin was controlled intraoperatively with ultrasonography during and at the end of the resection. A liver biopsy was obtained before and 1 hour after liver resection.

Study groups and protocol design. After anesthesia induction, patients were assigned randomly to 3 groups (Fig 1): (1) The IPC group, in which patients received a pretreatment consisting of clamping of the hepatic pedicle for 10 minutes followed by a 10 minute clamp-free interval before INT; (2) the APC group, in which, 20 minutes before intermittent occlusion inflow, propofol infusion was discontinued and sevoflurane was administered according to a minimal alveolar concentration of 1.5, after which sevoflurane administration was discontinued and propofol infusion was continued until the end of the operation; and (3) the INT group (without INT or APC). In all patients, anesthesia was maintained by propofol infusion. Preconditioning protocols were according to previous reported protocols.[20,21]

The randomization sequence was computer generated, and patients were distributed in a table of simple random numbers. We also stratified the cohort study according to the extent of hepatectomy, major (>3 segments) versus minor hepatectomy, to assess whether the extent of the hepatectomy would impact on the analysis of preconditioning results.

The effect of protection against IR was evaluated by comparing hepatocyte and endothelial dysfunction markers, caspase-3 activity, histologic lesions, and postoperative clinical outcome. Additionally, inducible NO synthase (iNOS) expression was determined to assess its role in the molecular mechanism of preconditioning.

Blood and tissue samples. *Liver function test.* Blood samples were obtained at baseline, 1 and 6 hours post resection, and every 7 postoperative days. Serum levels of aspartate and alanine transaminases activities (AST and ALT) as an indicator of hepatocellular injury, total bilirubin, and prothrombin ratio (INR) were measured using a Hitachi 7 179A auto biochemical analyzer.

Serum hyaluronic acid. Alterations in liver microcirculation induced by IR injury are associated with a rapid necrosis and apoptosis of SECs. Because hyaluronic acid (HA) in the blood is cleared rapidly by SECs, increases in serum HA indicate functional perturbation of SECs owing to apoptosis induced by warm IR.[22] Serum levels of HA were measured using a commercial radioimmunoassay kit as an index of SEC function. All samples were run in duplicate. They were centrifuged immediately, and plasma was stored at −20°C. Serum HA levels were measured at baseline and at 60 minutes of reperfusion. Results are expressed as μg/L.

Liver histology. To evaluate the warm ischemia injury, liver paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin according to standard procedures. The severity of hepatic micro-vesicular and macrovesicular steatosis was graded by a point-counting method on an ordinal scale (none, ≤10%; mild, >10–≤20%; moderate, >20–≤30%; severe, >30%). The degree of sinusoidal congestion and dilation was classified into grades 1 (minimal centrilobular dilation), 2 (dilation occupying two thirds of the lobule), and 3 (dilation throughout the lobule). Finally, leukocyte infiltration, a hallmark in hepatic IR injury, and necrosis (focal, confluent, or zonal) were evaluated and graded as mild, moderate, or severe. Each biopsy was evaluated by a single pathologist blinded to the treatment allocation.

Caspase-3 enzymatic activity assay. Caspase-3 activation plays a critical role in apoptosis, which is the most important mechanism of cell death after IR.[23] Caspase-3 is activated in response to a variety of apoptoptic inducers. The assay for caspase-3 enzymatic activity was determined by immunohistochemical reaction using a peroxidase–antiperoxidase technique. Paraffin blocks were submitted to 4-μm microtone sections; slides were incubated with the primary antibody, rabbit polyclonal, caspase-3 clone N/A (prediluted; Biocare Medical). Reactions were always compared with a positive control (human amygdala). To evaluate the protein expression, stained cells in each slide were selected. The percentage change in positive cells (nuclear positivity) was calculated in 3 random microscopic fields at a wavelength of 405 nm in an average of 300 cells counted (positive and negative). For quantitative evaluation of apoptotic state, the number of apoptotic cells present in a section expressed as a fraction of the total

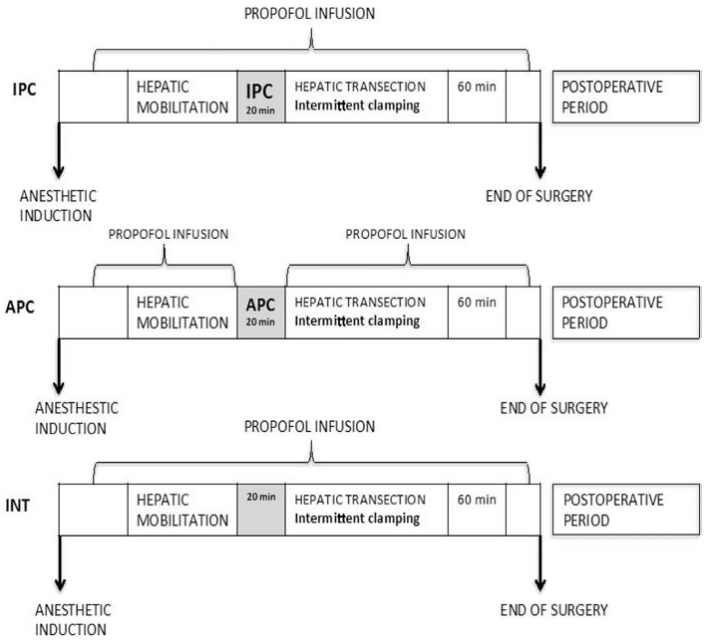

Fig 1. Protocol and study groups. *APC*, Anesthetic preconditioning; *INT*, intermittent ischemia; *IPC*, ischemic preconditioning.

number of hepatocytes, the "apoptotic index,"[24] was calculated for each sample measure.

iNOS mRNA. NO is involved predominantly in molecular mechanisms of liver preconditioning.[14] Expression of iNOS in hepatocytes was determined by RNA isolation and quantitative real-time polymerase chain reaction. Total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. For mRNA quantification, cDNA was synthetized using Taqman RT reagents (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Quantitative real-time polymerase chain reaction was performed in triplicate using Taqman probes for human iNOS (Applied Biosystems) and an iCycler Real-Time Detection System (Biorad). Levels of mRNA were normalized to 18s expression, which was used as a housekeeping gene. Results are expressed as increment of change.

Additionally, we recorded demographic and patient clinical condition, diagnostic criteria, type of liver resection, operative time, total warm ischemia time (the sum of different cycles of INT performed in each patient), number of clampings, blood loss, and need for transfusion.

Postoperative liver function and outcome. Postoperative complications were graded according to the Dindo-Clavien classification.[25] Postoperative liver dysfunction was defined according to the definition of the International Study Group of Liver Surgery.[26] Postoperative variables analyzed included morbidity defined as a complication that prolonged hospital stay or affected outcome, mortality (death during hospital stay or within 30 days of the operation), hospital duration of stay, and 1-year survival.

Statistical analysis. The sample size calculation was based on serum AST levels as the main markers of hepatocyte dysfunction. According to previous studies,[10,20,27] the difference between patients in whom IPC was applied and those in whom it was not is 30% less for the group in which preconditioning is applied. Assuming a difference of 30% over the no-preconditioning group and a level of statistical significance set at .05 and a power of 0.80, using a 1-way analysis of variance test we calculated that 35 patients were required in each study group.

Qualitative variables are expressed as number and percentage, and quantitative variables are expressed as mean (with 95% CI) and median

Table I. Demographic and clinical characteristics, and operative data

Characteristic	*IPC* (n = *36*)	*APC* (n = *34*)	*INT* (n = *36*)	P *value*
Age (y)	60 (21)	65 (12)	62 (20)	.072
Male (%)	15 (42)	23 (67)	20 (59)	.092
BMI (kg/m^2)	25.9 (6.1)	2 (4.8)	25.8 (6.3)	.547
ASA physical status I/II/III (*n*)	1/31/4	0/28/6	2/29/5	.643
Charlson index	6 (0)	7 (1)	6 (1)	.107
Comorbidity (*n*)				
Cardiovascular	14	20	14	.062
Pulmonary disease	5	9	10	.301
Diabetes mellitus	3	9	4	.076
ALT (U/L)	21 (16)	20 (15)	19 (12)	.133
AST (U/L)	24 (16)	22 (15)	20 (9)	.083
Bilirubin (mg/dL)	0.44 (0.38)	0.5 (0.33)	0.5 (0.21)	.924
INR	1 (0.07)	0.99 (0.08)	0.99 (0.08)	.771
Hemoglobin (mg/dL)	13.7 (3.03)	13.5 (1.88)	12.9 (2.57)	.465
Adjuvant chemotherapy (%)	28 (78)	25 (73)	21 (58)	.169
Mild to moderate steatosis (%)	8 (22)	10 (29)	9 (25)	.789
Blood loss (mL)	500 (100)	500 (100)	450 (200)	.593
Patients transfused (*n*)	6	4	5	.559
Ischemia time (min)	50 (22.8)	46.3 (26.6)	52.6 (29.3)	.144
Clamping number	3 (1)	3 (1)	3 (1)	.265
Total operation time (min)	300 (45)	300 (64)	300 (60)	.291
Major/minor resection (*n*)	21/15	18/16	19/17	.866

Data are shown as median (IQR) and number of cases (%).
ALT, Alanine transaminase; *APC*, anesthetic preconditioning; *ASA*, American Society of Anesthesiologists; *AST*, aspartate transaminase; *BMI*, body mass index; *INR*, international normalized ratio; *INT*, intermittent ischemia; *IPC*, ischemic preconditioning.

and interquartile range for non-normalized distribution. The Kruskal–Wallis test or analysis of variance test was used to compare means between groups according to normality distribution of the variables and a Chi-square test to compare proportions. A repeated-measure analysis of variance test was used to analyze hemodynamic and biochemical variables over time. To compare peak biochemical variables, we performed a linear regression test. In addition, we adjusted these comparisons for age, baseline AST, ALT, bilirubin, steatosis, chemotherapy, total warm ischemia time, and type of resection. Correlation between categorical variables was tested by the Cramer V test (between nominal variables) and the Kendal tau-b test (between ordinal variables). Correlation between quantitative variables was tested by Rho Spearman. We used IBM-SPSS Statistics (version 19.0, 2010) for data analysis.

RESULTS

Patient population. We randomized 121 patients, of whom 15 were excluded later: 3 ASA class III patients, 1 in each group, required high norepinephrine doses to tolerate portal triad clamping, and another 12 patients had disseminated disease and no hepatic resection was performed. The final number of patients eligible for analysis was 106.

No differences were observed in clinical, demographic, and laboratory data (Table I). The most prevalent etiology was metastasis from colorectal cancer (80% of patients); primary liver tumors were present in 6% of patients.

Intraoperative data. *Hemodynamic and operative data.* Intraoperative systemic hemodynamic behavior throughout the operative procedure was similar in the 3 groups (data not shown). Arterial hypertension (29%), tachycardia (24%), and low cardiac index (20%) showed the greatest incidences, but with no differences between groups. No differences were observed in the need for norepinephrine. The diagnostic criteria, type of liver resection, total warm ischemia time, number of clampings, operative time, and blood loss were similar in the 3 groups (Table I).

Postoperative liver function behavior. The kinetics of transaminase activity and bilirubin and INR levels over 7 postoperative days was similar in all groups (Fig 2). In all patients, liver enzymes (AST and ALT) showed an early, significant increase in peak levels at 6 hours with respect to baseline levels. Comparing between groups, the AST increase was greater in the IPC group

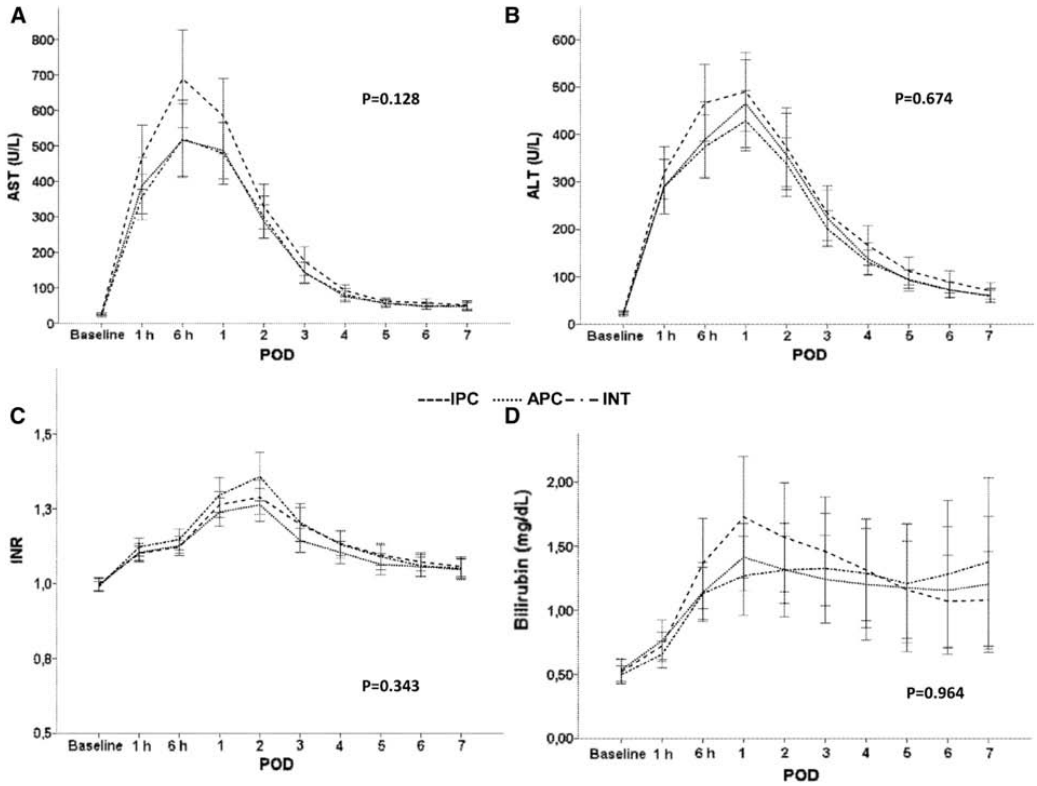

Fig 2. Kinetics of biochemical parameters over postoperative time (A, AST kinetics; B, ALT kinetics; C, INR kinetics; D, bilirubin kinetics). Groups showed an increase ($P < .001$) in the biochemical parameters studied but no differences were observed between study groups (repeated measures analysis of variance). Markers express means and whiskers express 95% CI. Data have been adjusted for age, steatosis, chemotherapy, baseline transaminases, bilirubin, hyaluronic acid, type of resection, and total ischemia time. *ALT*, Alanine transaminase; *APC*, anesthetic preconditioning; *AST*, aspartate transaminase; *INR*, international normalized ratio; *INT*, intermittent ischemia; *IPC*, ischemic preconditioning; *POD*, postoperative days.

($P = .052$) after adjusting for age, preoperative liver enzymes, steatosis, chemotherapy, ischemia time, and type of resection. Bilirubin and INR peaks occurred around 48 postoperative days in all 3 groups (Table II). No correlation was found between these markers and age, preoperative steatosis, and total warm ischemia time.

HA. One hour after resection, serum HA levels increased ($P = .001$) in all groups, but did not reach significance between groups ($P = .514$; Fig 3, *A*). Interestingly, among all variables studied, only HA levels correlated with the postresection bilirubin peak ($r = 0.387$; $P = .002$; Fig 4).

Caspase 3 activity. Apoptosis of the hepatic cells was evaluated indirectly through the caspase 3 expression by immunohistochemistry 1 hour after resection. Apoptosis was present in 40% of patients distributed in a similar manner in the 3 groups. In patients with apoptosis, no differences were found in the apoptotic index among the 3 study groups (IPC, 39%; APC, 35%; INT, 40%; $P = .683$). No correlation was found between apoptotic index and HA, preoperative steatosis, or liver enzymes.

iNOS mRNA. In all patients, 1 hour after liver resection, iNOS tissular expression showed no change from basal levels (Fig 3, *B*).

Histologic analysis. Histologic examination of liver parenchyma demonstrated that 27 patients (25%) had mild-to-moderate hepatic macrovesicular steatosis preoperatively (Table I). One hour after liver resection, steatosis <30% was observed in 52 patients (49%) and steatosis >30% in 6 patients (6%); mild leukocyte infiltration was observed in 51 patients (48%) and moderate leukocyte infiltration in 14 patients (13%); grade 1–2 sinusoidal congestion was observed in 51 patients (48%)

Table II. Peaks of biochemical parameters

	IPC (n = *36*)	*APC* (n = *34*)	*INT* (n = *36*)	P *value*
AST (U/L)	591 (543)	438 (307)	441 (307)	.052
ALT (U/L)	459 (272)	407 (272)	395 (269)	.599
Bilirubin (mg/dL)	1.2 (1.25)	1.3 (0.95)	1.04 (0.63)	.134
INR	1.2 (0.21)	1.2 (0.23)	1.3 (0.33)	.232

Data are shown in median (IQR). Data have been adjusted for age, baseline transaminase, bilirubin, hyaluronic acid, steatosis, chemotherapy, type of resection, and total ischemia time.
ALT, Alanine transaminase; *APC*, anesthetic preconditioning; *AST*, aspartate transaminase; *INR*, international normalized ratio; *INT*, intermittent clamping; *IPC*, ischemic preconditioning.

and grade 3 sinusoidal congestion in 7 patients (7%); finally, grade 1 hepatocellular necrosis was observed in 4 patients (4%; Table III). No differences were found between groups.

Postoperative outcomes. All patients were extubated in the operating room; 12 patients (4 in the IPC group, 3 in the APC group, and 5 in the INT group) were transferred to the intensive care unit. The severity and rate of complications, transfer to intensive care, and hospital stay were similar between groups (Table IV). Fifty-six patients had no complications, and 43 had minor complications. Eight patients had major complications (grade III–IV and V): 1 localized intra-abdominal infection (treated by image-guided drainage), 2 bile leaks that resolved spontaneously, 1 cutaneous necrosis that needed reoperation, and 4 cases (2 patients in the IPC group and 2 in the INT group) of ascites and liver failure that resolved without renal replacement. One patient in the INT group died within 20 days after major hepatectomy (extended right hepatectomy) owing to severe postoperative liver failure. No differences were found in 1-year survival rate stratified by treatment group.

Major and minor hepatectomy. When these 3 groups were stratified by type of hepatectomy (major/minor resection), no differences were found in any of the variables studied (markers of liver function, apoptotic index, histologic lesions, iNOS mRNA, HA, and outcome) (data not shown).

DISCUSSION

The main findings of this study comparing types of preconditioning before hepatectomy can be summarized as follows: (1) Hepatocyte and endothelial cell injury, measured by kinetics of liver enzymes and HA, were similar between groups; (2) cellular apoptosis measured by apoptotic index showed no differences between groups; (3) leukocyte infiltration and steatosis showed no differences between groups; (4) clinical outcomes were similar between groups; and (5) patients matched by the extent of liver resection showed no differences in any of the variables studied.

Ischemic and pharmacologic protective strategies have been developed for organ protection from continuous inflow occlusion.[10,17,18] In animal models, IPC has been shown to have a protective effect against warm ischemia during liver resection, but clinical studies have provided conflicting data.[28-30] In contrast, less is known about preconditioning using INT, and in particular the benefit of APC. Short ischemic insults followed by a short reperfusion period and administration of sevoflurane, a volatile anesthetic agent, are easily applicable therapeutic strategies involving little or no risk to patients. These 2 techniques activate a number of upstream signaling cascades converging in the activation of NO synthase, suggesting that NO is a central event.[14] To our knowledge, this is the first study analyzing the effects of sevoflurane on IR using INT.

In recent years, a number of experimental trials have been designed to demonstrate the effects of heart and liver anesthetic pharmacologic preconditioning.[31] In the clinical setting of liver and noncardiac surgery, it seems complicated to prove the preconditioning effect of anesthetic agents in patients submitted to anesthesia, there seems to be no direct pharmacologic protective effect. In this respect, there are 2 important concerns: First, in the clinical setting, the presence of confounding factors (medical treatment, opioids, corticosteroids, and remote preconditioning by intermittent sequential compression devices) could influence the modulatory markers, such as apoptosis, NO expression, and interleukins; second, all anesthetics (volatile, intravenous, and local) have similar anti-inflammatory modulatory effects, because they inhibit or upregulate of NO.[32] Because in human studies it is not feasible to inhibit or activate the mechanisms involved in anesthetic modulatory protection to assess whether this mechanism is involved, the results are controversial.[18,33]

All these factors should be considered in the setting of liver resection using INT. Recently, clinical studies[34,35] have shown that pretreatment by IPC in major liver resections with INT did not modify postoperative liver enzymes or patient outcomes. In the present study, the 2 preconditioned groups showed no differences in the kinetics of liver enzymes and HA, apoptotic index, liver histology, and clinical outcome compared with patients

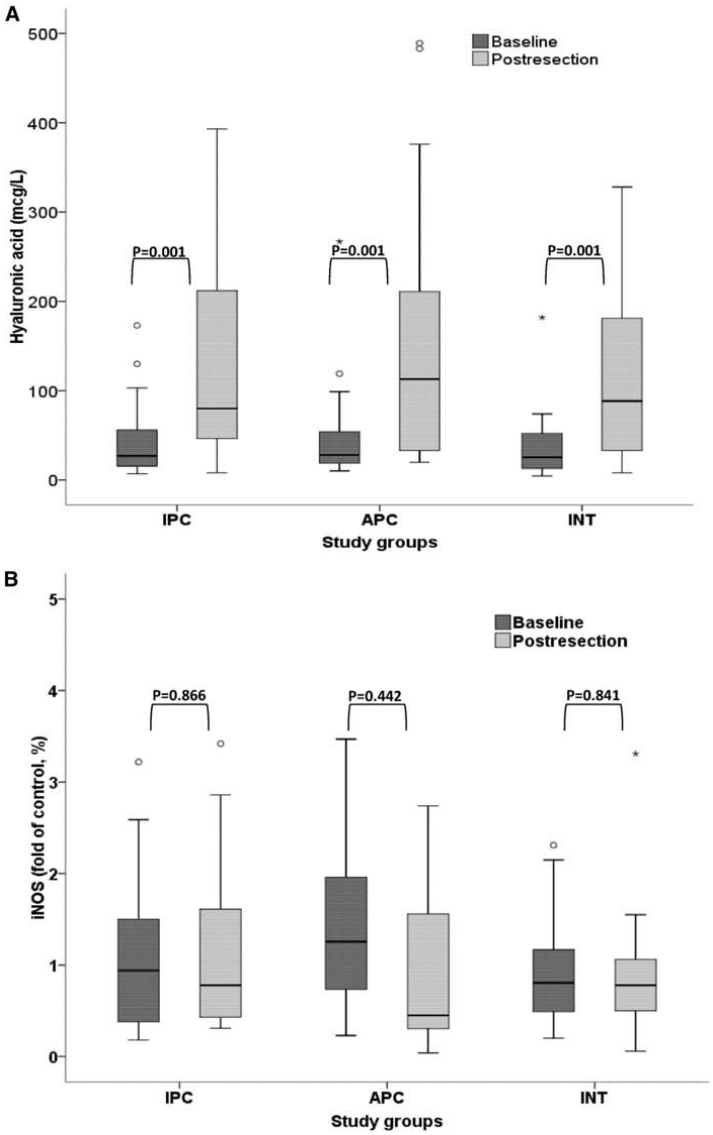

Fig 3. Baseline and postresection levels of (*A*) hyaluronic acid and (*B*) the inducible form of nitric oxide synthase expression (iNOS). Groups of study showed an increase ($P = .001$) in hyaluronic acid 1 hour after resection, but without differences between groups ($P = .514$). iNOS post resection was similar to baseline in all groups studied ($P = .186$). Comparison of means was performed by Mann–Whitney *U* test. *APC*, Anesthetic preconditioning; *INT*, intermittent ischemia; *IPC*, ischemic preconditioning.

without preconditioning. Moreover, when we stratified patients by the extent of liver resection, we were unable to demonstrate any benefit of preconditioning. Patients with ischemic pretreatment showed greater AST levels at 6 hours postoperatively after adjusting for possible confounding

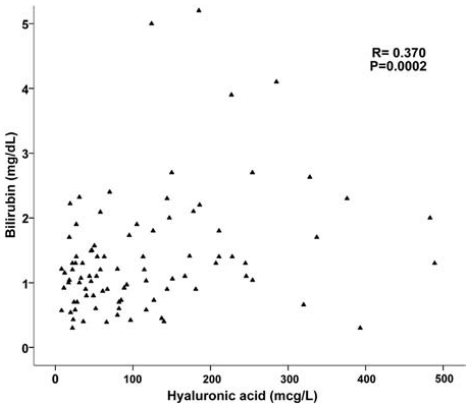

Fig 4. Correlation between peak postoperative levels of bilirubin and hyaluronic acid. Linear correlations were found for all subjects. *R* value, Spearman rank correlation coefficient.

Table III. Liver damage determined by colorimetric method at 1 hour postresection in IPC, APC, and INT groups

Measure	*IPC* (n = *34*)	*APC* (n = *34*)	*INT* (n = *35*)	P *value*
Leukocyte infiltration				
Mild-moderate	23	22	20	.527
Severe	—	—	3	NA
Sinusoidal congestion				
Mild-moderate	22	23	24	.621
Severe	—	—	1	NA
Steatosis				
Mild-moderate	18	18	16	.808
Severe	2	2	2	.536
Hepatocyte necrosis				
Mild-moderate	1	1	2	.536
Severe	—	—	—	NA

Data are shown as number of cases.
APC, Anesthetic preconditioning; *INT*, intermittent ischemia; *IPC*, ischemic preconditioning; *NA*, not available.

factors (age, baseline AST, ALT, bilirubin, steatosis, chemotherapy, total warm ischemia time, and type of resection; $P = .052$).

There was no relation between postoperative enzyme kinetics and structural or functional markers of reperfusion injury. In contrast, a linear correlation between the peak of bilirubin and serum HA levels measured 1 hour after completing the liver resection was present in the 3 study groups. This finding may be related to the fact that the functionality of the cholangiocytes is already affected by the ischemic injury[36] and that

Table IV. Postoperative complications and hospital stay

Complication, n *(%)*	*IPC* (n = *36*)	*APC* (n = *34*)	*INT* (n = *36*)	P *value*
None	20 (59)	19 (53)	17 (47)	.409
Minor	12 (35)	14 (39)	17 (47)	.272
Major	4 (12)	1 (3)	3 (8)	.353
Reoperation	1	—	—	NA
Mortality	—	—	1	NA
Need for ICU	4 (11)	3 (9)	5 (14)	.138
Hospital stay (d)	11.6 (7.0)	11.6 (5.6)	11.8 (6.5)	.986

Data are shown as median (IQR).
APC, Anesthetic preconditioning; *ICU*, intensive care; *INT*, intermittent ischemia; *IPC*, ischemic preconditioning; *NA*, not available.

this alteration causes impairment of the sinusoidal flow, therefore altering the normal function of the SECs responsible for the clearance of the circulating HA. The evaluation of serum HA levels immediately after resection may, therefore, be an early marker of the liver ischemic injury and may be considered a prognostic tool for postoperative complications.

NO is a well-characterized modulator of mitochondrial function and has been implicated in the signaling of IPC and APC,[14,16] but the time course and mechanism of action remain controversial.[37,38] Evidence supports the hypothesis that NO plays a role both in initiating increased enzymatic synthesis of NO through constitutive NO synthase and in mediating delayed protection through the upregulation of iNOS.[39] In the present study, levels of iNOS expression obtained 1 hour after reperfusion did not change from basal values in any group of patients; indeed, we hypothesize that measuring constitutive NO synthase in this early period of reperfusion could improve our understanding of the role of NO in preconditioning treatment.

IPC is linked to decreased apoptotic cell death. Biopsies of the remnant liver obtained 1 hour after resection revealed numerous apoptotic bodies (free or surrounded by cytoplasmic remnants) that could not be distinguished as belonging to any specific cell type (no terminal uridine nick-end labeling assay was performed). The absence of any significant level of apoptosis was observed in 60% of patients in all 3 groups and the apoptotic index was about 38% in all 3 groups. Although experimental data in warm ischemia showed decreased leukocyte accumulation after IPC, evidence indicates that the expression of adhesion molecules is not altered after preconditioning.[29] In the present study, histologic evaluation revealed no differences in leukocyte infiltration between groups.

Importantly, we could find no beneficial impact on postoperative outcome. No complications were observed in 56 patients (53%), minor complications in 43 patients (40%), and severe complications in 8 patients (8%), with no differences between groups. No differences were found in 1-year survival rate stratified by preconditioning treatment.

Limitations of this study should be considered. First, considering that no differences between groups were detected, a larger sample size might have been able to detect a lesser decrease in serum AST, but in such results would not be very relevant clinically. Second, evidence suggests that all anesthetic agents provide cellular protection by upregulating or suppressing inflammatory, cytokine-induced expression of NO synthases; hence, it is conceivable that APC created a methodological challenge.

In conclusion, on the basis of the results of the present study, we hypothesize that INT works as an IPC mechanism and anesthesia itself acts as a pharmacologic pretreatment. Our results suggest that the use of IPC or APC offers no protection against IR injury in the setting of liver resection under intermittent inflow occlusion regardless of the extent of liver resection. Future studies may be considered to determine whether IPC can improve the outcome of major liver resection using INT in high-risk patients with cirrhosis and extensive steatosis.

REFERENCES

1. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. Ann Surg 1999;230:309-21.
2. Khatri VP, Petrelli NJ, Belghiti J. Extending the frontiers of surgical therapy for hepatic colorectal metastases: is there a limit? J Clin Oncol 2005;23:8490-9.
3. Rosen CB, Nagorney DM, Taswell HF, Helgeson SL, Ilstrup DM, van Heerden JA, et al. Perioperative blood transfusion and determinants of survival after liver resection for metastatic colorectal carcinoma. Ann Surg 1992;216:493-505.
4. Rahbari NN, Reissfelder C, Koch M, Elbers H, Striebel F, Buchler MW, et al. The predictive value of postoperative clinical risk scores for outcome after hepatic resection: a validation analysis in 807 patients. Ann Surg Oncol 2011; 18:3640-9.
5. Pringle JH. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. Ann Surg 1908;48:541-9.
6. Melendez JA, Arslan V, Fischer ME, Wuest D, Jarnagin WR, Fong Y, et al. Perioperative outcomes of major hepatic resections under low central venous pressure anesthesia: blood loss, blood transfusion, and the risk of postoperative renal dysfunction. J Am Coll Surg 1998;187:620-5.
7. Zhai Y, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. Am J Transplant 2011;11:1563-9.
8. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. Am J Surg 2001;181:160-6.
9. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. Gastroenterology 2003;125:917-36.
10. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. Ann Surg 2000;232:155-62.
11. Massip-Salcedo M, Roselló-Catafau J, Prieto J, Avíla MA, Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. Liver Int 2007;27:6-16.
12. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, et al. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. Ann Surg 1999;229:369-75.
13. Petrowsky H, McCormack L, Trujillo M, Selzner M, Jochum W, Clavien PA. A prospective, randomized, controlled trial comparing intermittent portal triad clamping versus ischemic preconditioning with continuous clamping for major liver resection. Ann Surg 2006;244:921-30.
14. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpí E, et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. Hepatology 1999; 29:126-32.
15. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986;74:1124-36.
16. Wakeno-Takahashi M, Otani H, Nakao S, Uchiyama Y, Imamura H, Shingu K. Adenosine and a nitric oxide donor enhances cardioprotection by preconditioning with isoflurane through mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive K+ channel-dependent and -independent mechanisms. Anesthesiology 2004;100:515-24.
17. Heizmann O, Meimarakis G, Volk A, Matz D, Oertli D, Schauer RJ. Ischemic preconditioning-induced hyperperfusion correlates with hepatoprotection after liver resection. World J Gastroenterol 2010;16:1871-8.
18. Beck-Schimmer B, Breitenstein S, Urech S, De Conno E, Wittlinger M, Puhan M, et al. A randomized controlled trial on pharmacological preconditioning in liver surgery using a volatile anesthetic. Ann Surg 2008;248:909-18.
19. Strasberg SM. Nomenclature of hepatic anatomy and resections: a review of the Brisbane 2000 system. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2005;12:351-5.
20. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. Ann Surg 2003;238: 842-3.
21. De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, Meeus R, Nelis A, Van Reeth V, et al. Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. Anesthesiology 2004;101:299-310.
22. Garcea G, Ong SL, Maddern GJ. Predicting liver failure following major hepatectomy. Dig Liver Dis 2009;41: 798-806.
23. Rüdiger HA, Graf R, Clavien P-A. Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. J Invest Surg 2003;16: 149-59.
24. Bressenot A, Marchal S, Bezdetnaya L, Garrier J, Guillemin F, Plénat F. Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP

in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma. J Histochem Cytochem 2009; 57:289-300.
25. Clavien PA, Barkun J, de Oliveira ML, Vauthey JN, Dindo D, Schulick RD, et al. The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. Ann Surg 2009;250: 187-96.
26. Rahbari NN, Garden OJ, Padbury R, Brooke-Smith M, Crawford M, Adam R, et al. Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). Surgery 2011;149:713-24.
27. Hannes A, Kang K-J, Sindram D, et al. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. Ann Surg 2002;235:400-7.
28. Gurusamy KS, Kumar Y, Pamecha V, Sharma D, Davidson BR. Ischaemic pre-conditioning for elective liver resections performed under vascular occlusion. Cochrane Database Syst Rev 2009:CD007629.
29. Choukèr A, Martignoni A, Schauer R, Dugas M, Rau H-G, Jauch K-W, et al. Beneficial effects of ischemic preconditioning in patients undergoing hepatectomy: the role of neutrophils. Arch Surg 2005;140:129-36.
30. Smyrniotis V, Theodoraki K, Arkadopoulos N, Fragulidis G, Condi-Pafiti A, Plemenou-Fragou M, et al. Ischemic preconditioning versus intermittent vascular occlusion in liver resections performed under selective vascular exclusion: a prospective randomized study. Am J Surg 2006;192:669-74.
31. Lv X, Yang L, Tao K, Liu Y, Yang T, Chen G, et al. Isoflurane preconditioning at clinically relevant doses induce protective effects of heme oxygenase-1 on hepatic ischemia reperfusion in rats. BMC Gastroenterol 2011;11:31.
32. Toda N, Toda H, Hatano Y. Anesthetic modulation of immune reactions mediated by nitric oxide. J Anesth 2008; 22:155-62.
33. Slankamenac K, Breitenstein S, Beck-Schimmer B, Graf R, Puhan MA, Clavien PA. Does pharmacological conditioning with the volatile anaesthetic sevoflurane offer protection in liver surgery? HPB (Oxford) 2012;14:854-62.
34. Scatton O, Zalinski S, Jegou D, Compagnon P, Lesurtel M, Belghiti J, et al. Randomized clinical trial of ischaemic preconditioning in major liver resection with intermittent Pringle manoeuvre. Br J Surg 2011;98:1236-43.
35. Winbladh A, Bjornsson B, Trulsson L, Offenbartl K, Gullstrand P, Sandstrom P. Ischemic preconditioning prior to intermittent Pringle maneuver in liver resections. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2012;19:159-70.
36. Nieuwenhuijs VB, De Bruijn MT, Padbury RT, Barritt GJ. Hepatic ischemia-reperfusion injury: roles of Ca2+ and other intracellular mediators of impaired bile flow and hepatocyte damage. Dig Dis Sci 2006;51:1087-102.
37. Koti RS, Tsui J, Lobos E, Yang W, Seifalian AM, Davidson BR. Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver. FASEB J 2005; 19:1155-7.
38. Serracino-Inglott F, Virlos IT, Habib NA, Williamson RC, Mathie RT. Differential nitric oxide synthase expression during hepatic ischemia-reperfusion. Am J Surg 2003;185: 589-95.
39. Varadarajan R, Golden-Mason L, Young L, McLoughlin P, Nolan N, McEntee G, et al. Nitric oxide in early ischaemia reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation. Transplantation 2004;78:250-6.

10.2 ABREVIATURAS

Ad-R: Receptores de adenosina

α y β adrenergic-R: Receptores adrenérgicos

ALT: Alanino aminotransferasa

Apaf: Factor activador de las proteasas apoptoicas

APC: Precondicionamiento Anestésico

ASA: "American Society of Anesthesiologists"

AST: Aspartato aminotransferasa

ATP: adenosíntrifosfato

BH3: Homólogo-3 de la proteína Bcl-2

B.I.S: Índice biespectral

BUN: Nitrógeno uréico sanguíneo

C.A.M: Concentración alveolar mínima

Cyt c: Citocromo C

DAG: Diacilglicerol

eNOS: Forma endotelial de la enzima NOS

ET: Endotelina

FC: Frecuencia cardíaca

FLIP: Proteína inhibitoria de FLICE like (complejo regulador de la apoptosis)

Gαs,Gαi,Gαq, GαY: Tipos de proteínas G

GMS-CSF: Factor de estimulación de los granulocitos y macrófagos

HA: Ácido hialurónico

HO-1: Hemoxigenasa 1

HSF1: Factor de transcripción choque térmico 1

HSP-27 y 70: Proteínas choque térmico 27 y 70

IAP: Inhibidor de las proteínas apoptoicas

IC: Índice cardíaco

ICAM: Molécula de adhesión intercelular

IL: Interleuquina

ILGS: Grupo Internacional de Cirugía Hepática

I.M.C: Índice de masa corporal

INF: Interferón

iNOS: Forma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa

INR: Ratio normalizada internacional

INT: Isquemia o clampaje vascular intermitente

IQR: Rango de interquartil

IP3: Inositoltrifosfato

IPC: Precondicionamiento Isquémico

IR: Isquemia-Reperfusión

IRE1: Enzima 1 requeridor de inositol

IRVS: Índice de resistencia vascular sistémica

KC: célula Kupffer

LTB4: Leucotrieno B4

MAPK: Proteinquinasa activadora de la mitogénesis

NFKB: Factor nuclear KB

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintetasa

NPT: Nutrición parenteral total

PAM: Presión arterial media

PAF: Factor de activación plaquetar

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PERK: Proteinquinasa del retículo endoplasmático

PFC: Plasma fresco congelado

PHLF: Insuficiencia hepática posthepatectomía

PIC: Presión intracraneal

PKC: Proteinquinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PMN: Polimorfonucleares

PVC: Presión venosa central

RLO, ROS: Especies reactivas de oxígeno o radicales libres de oxígeno

RNOS: Especies reactivas de nitrógeno

SD: Desviación estándar

SECs: Células sinusoidales endoteliales

SFSS: “Small for size sindrome”

SLP: Proteasa inhibidora de la secreción de leucocitos

SOD: Superóxido dismutasa

T.C.I: Infusión controlada por objetivos

TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa

TNFR: Receptor del TNF

TUNEL: “TdT-mediated d UTP-biotin Nick end-labeling”

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UPR/ER: Respuesta proteica del retículo endoplasmático

VCAM: Molécula de adhesión vascular

X/XOD: Xantina/xantina oxidasa